

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Бабков Денис Александрович

**МИШЕНЬ-ОРИЕНТИРОВАННЫЙ ПОИСК АНТИДИАБЕТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
И ИХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА**

3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук

Научные консультанты:

Спасов Александр Алексеевич,
академик РАН, з.д.н. РФ,
профессор, д.м.н.;
Васильев Павел Михайлович,
профессор, д.б.н.

Волгоград, 2022

Оглавление

Введение	5
Глава 1. Современные подходы к разработке средств терапии сахарного диабета 2-го типа	15
1.1. Сахарный диабета 2-го типа как научная, медицинская и социальная проблема	15
1.2. Сахарный диабет и связанные патологии как иммунометаболические заболевания	26
1.3. Рациональный выбор мишеней для разработки лекарственных средств. Валидированные мишени	27
1.4. Хемоинформатика в разработке лекарственных средств	32
1.5. Мультитаргетные и плейотропные соединения	36
1.6. Заключение	39
Глава 2. Материалы и методы	41
2.1. Соединения и реактивы	41
2.2. Животные	43
2.3. Оборудование и программное обеспечение	44
2.4. Вычислительные методы	45
2.5. Энзимологические методы	47
2.6. Исследования на клеточных культурах	49
2.7. Моделирование экспериментальной патологии лабораторных животных	53
2.8. Методы оценки антидиабетической активности на животных	55
2.9. Изучение острой токсичности соединений	59
Глава 3. Система поиска потенциальных антидиабетических соединений	60
3.1. Валидация выбранных инновационных мишеней для поиска антидиабетических соединений	61
3.2. Формирование библиотек исследуемых соединений	70
3.3. Лиганд-ориентированный скрининг <i>in silico</i>	82
3.4. Формирование мишень-фокусированных библиотек соединений	83
3.5. Анализ и отсеивание ложноположительных соединений (PAINS-анализ)	84
3.6. Заключение	85

Глава 4. Поиск ингибиторов GSK3B. Фармакологические свойства ингибитора GSK3B K-16788	
4.1. Экспериментальный скрининг. Взаимосвязи «структура-активность»	88
4.2. Оценка активности и цитотоксичности выявленных ингибиторов GSK3B на клеточных моделях	91
4.3. Расчетные фармакокинетические и токсикологические характеристики выявленных ингибиторов GSK3B	97
4.4. Антигипергликемическая активность на животных при однократном введении	98
4.5. Антидиабетическая активность при длительном введении	102
4.6. Антитромботическая и антиагрегантная активность	112
4.7. Острая токсичность при пероральном введении	113
4.8. Заключение	115
Глава 5. Поиск активаторов AMPK. Фармакологические свойства активаторов AMPK	117
5.1. Экспериментальный скрининг. Взаимосвязи «структура-активность»	117
5.2. Оценка активности и цитотоксичности выявленных активаторов AMPK на клеточных моделях	119
5.3. Расчетные фармакокинетические и токсикологические характеристики выявленных активаторов AMPK	120
5.4. Гипогликемическая активность на целых животных при однократном введении	122
5.5. Заключение	123
Глава 6. Поиск ингибиторов RTP1B. Фармакологические свойства ингибитора RTP1B/активатора AMPK AZH-141a	125
6.1. Экспериментальный скрининг. Взаимосвязи «структура-активность»	125
6.2. Расчетные фармакокинетические и токсикологические характеристики выявленных ингибиторов RTP1B	128
6.3. Гипогликемическая активность на целых животных при однократном введении	130
6.4. Антидиабетическая активность при длительном введении	130
6.5. Заключение	137
Глава 7. Поиск активаторов глюкокиназы (GSK). Фармакологические свойства активатора GSK NP-0006	138

7.1.	Экспериментальный скрининг. Взаимосвязь «структура-активность».....	138
7.2.	Расчетные фармакокинетические и токсикологические характеристики выявленных активаторов GSK.....	143
7.3.	Цитотоксичность выявленных активаторов GSK.....	145
7.4.	Антигипергликемическая активность на животных при однократном введении.....	146
7.5.	Антидиабетическая активность при длительном введении.....	151
7.6.	Влияние на пролиферацию β -клеток поджелудочной железы.....	161
7.7.	Острая токсичность при пероральном введении.....	167
7.8.	Заключение.....	168
Глава 8. Обсуждение.....		171
Выводы.....		196
Практические рекомендации.....		200
Список сокращений и условных обозначений.....		201
Список литературы.....		202

Введение

Актуальность темы исследования

Сахарный диабет и его отдаленные последствия являются одной из ведущих причин ранней потери трудоспособности, инвалидизации и смертности. В динамике 2016-2021 гг. сохраняется рост распространенности сахарного диабета как в России, так и в мире, преимущественно за счет сахарного диабета 2-го типа (СД2) [59; 104], отмечается уменьшение количества пациентов с достижением целевого уровня HbA1c менее 7% [77]. Смертность от СД2 составила 60,29 на 100 тыс. населения, что втрое превышает суммарную смертность от ВИЧ, туберкулеза, вирусных гепатитов и сепсиса за тот же период [62].

В клинической практике используются 11 классов антидиабетических лекарственных средств, однако они способны лишь замедлить развитие сахарного диабета 2-ого типа, обладая ограниченной способностью корректировать инсулинорезистентность [1; 222]. Исследования показывают, что даже у пациентов, приверженных адекватной комбинированной антигипергликемической терапии, не удается достичь целевых значений гликированного гемоглобина [74]. Современные и находящиеся на поздних стадиях разработки новые методы лечения все еще имеют существенные недостатки, такие как ограниченная эффективность, нежелательные побочные эффекты и субоптимальные фармакокинетические параметры [187]. Разработка и внедрение новых антидиабетических средств, направленных на восстановление активности сигнального пути инсулина, борьбу с системным воспалением и защиту эндокриноцитов поджелудочной железы, может позволить решить принципиально важные проблемы терапии сахарного диабета: остановить потерю функциональной массы β -клеток и гипергликемическое повреждение периферических тканей [331; 439].

Разработка принципиально новых антидиабетических средств и средств профилактики и терапии отдаленных последствий сахарного диабета является крайне актуальной задачей [248]. Её решение и внедрение в практическое здравоохранение новых лекарственных средств способно существенно повысить качество жизни больных и снизить социальные и экономические потери, связанные с растущей заболеваемостью сахарным диабетом.

Степень разработанности темы

В последние годы наблюдается изменение парадигмы лечения СД2. Согласно существующим рекомендациям, применяют комбинации монотаргетных ЛС, влияющих на отдельные патогенетические звенья СД2, с целью достижения строгого гликемического контроля [63]. Однако, согласно клиническим данным, он труднодостижим и не предотвращает прогрессирования заболевания, с течением времени приводя к потере функциональной массы β -клеток и необходимости подключения инсулинотерапии [249].

Становится очевидно, что сложный патогенез СД2, включающий порочные круги липотоксичности, периферической инсулинорезистентности, системного хронического метавоспаления, дисфункции и апоптоза β -клеток, требует столь же комплексной фармакологической коррекции. Наиболее актуальными можно считать терапевтические стратегии, направленные на снижение секреторной нагрузки на β -клетки [429], предотвращение их апоптоза и стимулирование пролиферации [171; 429] с параллельным снижением избыточной массы тела [225] и иммунометаболических нарушений [108], во многом обуславливающих развитие осложнений и повышенный сердечно-сосудистый риск [44; 338]. Учитывая универсальный характер регуляции энергетического, углеводного и липидного обменов клеток-мишеней инсулина, β -клеток и тканевых макрофагов, разработка метаболитических средств создает возможность плеiotропного воздействия на патогенез и течение СД2.

Таким образом, одними из наиболее перспективных мишеней для инновационных антидиабетических средств являются белки-участники сигнальных путей, регулирующих инсулино- и лептинорезистентность гепатоцитов, адипоцитов и миоцитов [3], а также выживаемость и пролиферацию β -клеток поджелудочной железы [331] и активацию иммунокомпетентных клеток [29]. Например, метформин, являющийся «золотым стандартом» терапии СД2, частично реализует свое действие через АМФ-активируемую протеинкиназу (АМРК) [76]. Новые активаторы АМРК в настоящее время проходят клинические испытания [101; 159]. Активаторы глюкокиназы активно изучаются в клинических исследованиях, но пока не были введены в практику [230]. Ингибиторы киназы гликогенсинтазы типа 3В активно изучаются в качестве нейропротекторных средств для лечения нейродегенеративных заболеваний [85]. Ингибиторы РТР1В доказали антидиабетическую эффективность в доклинических исследованиях, а также безопасность и переносимость в клинических испытаниях 2-ой фазы [414]. В настоящее время в клинической практике отсутствуют лекарственные средства, реализующие свой эффект за счет прямого влияния на активность указанных белков-мишеней (АМРК, РТР1В, GSK3В, GSK). Идентификация низкомолекулярных соединений, способных восстановить физиологический уровень активности сигнального пути инсулина, предотвращать апоптоз β -клеток и стимулировать их пролиферацию является предметом активных исследований [331].

Ожидаемая стоимость разработки нового препарата сегодня достигла 1-2 миллиардов долларов США, средний срок разработки составляет 15-20 лет, в итоге регистрируются для клинического применения не более 5% соединений [55]. Многие фармацевтические компании сокращают расходы на инновационные исследования, фокусируясь на менее рискованных и затратных проектах, таких как внедрение воспроизведенных лекарственных препаратов. С другой стороны, многочисленные академические научные центры заняты фундаментальными и

прикладными биомедицинскими исследованиями, особенно в областях выявления новых мишеней воздействия на метаболические дефекты СД2 и ранних этапов разработки лекарственных средств [182]. При этом, как правило, они не обладают достаточными ресурсами для выполнения масштабных доклинических и клинических исследований. В тоже время, разработка открытых программных инструментов и общедоступных баз данных химической и биологической информации создает условия для разработки ресурсо-эффективных подходов к ранним этапам разработки ЛС [195].

Цель исследования

Разработка системы мишень-ориентированного поиска соединений – регуляторов активности киназ, обладающих комплексными антидиабетогенными свойствами – снижающих периферическую инсулинорезистентность и системное воспаление, стимулирующих пролиферацию β -клеток поджелудочной железы, нормализующих метаболизм глюкозы и липидов в условиях СД2.

Задачи исследования

1. Разработка технологии мишень-ориентированного поиска высокоактивных соединений, обладающих плейотропной антидиабетической активностью – снижающих инсулинорезистентность за счет восстановления активности сигнального пути рецептора инсулина, подавляющих апоптоз или стимулирующих пролиферацию β -клеток поджелудочной железы, нормализующих гомеостаз углеводов и липидов, корректирующих системные иммунометаболические нарушения – с использованием комплекса информационных технологий валидации мишеней, компьютерного прогноза лекарственного подобия и биологической активности химических соединений (методов молекулярного подобия и фармакофорного анализа).
2. Проведение экспериментального скрининга новых гетероциклических производных *in vitro* для определения их влияния на целевые белковые мишени: киназу гликогенсинтазы типа 3β , АМФ-активируемую протеинкиназу, протеинтирозинфосфатазу типа 1B, глюкокиназу. Изучение взаимосвязей структура-активность.
3. Оценка антидиабетической активности наиболее перспективных ингибиторов GSK3B на клеточных моделях и при однократном и/или длительном введении на моделях сахарного диабета *in vivo* с оценкой влияния на углеводный и жировой обмен, инсулинорезистентность, системное воспаление, оценку антитромботической активности. Определение острой токсичности наиболее

активных соединений и обоснование перспективности их доклинического изучения для лечения сахарного диабета, метаболического синдрома и ожирения.

4. Исследование антидиабетической активности наиболее перспективных активаторов AMPK на клеточной модели воспаления и при однократном и/или длительном введении по влиянию на гликемический контроль экспериментальных животных. Изучение острой токсичности наиболее активных соединений. Обоснование перспективности доклинического изучения новых фармакологически активных соединений для лечения сахарного диабета, метаболического синдрома и ожирения.
5. Определение антидиабетической активности наиболее перспективных ингибиторов РТР1В при однократном и/или длительном введении на моделях сахарного диабета *in vivo* с оценкой влияния на гомеостаз глюкозы, липидный обмен и инсулинорезистентность. Оценка острой токсичности наиболее активных соединений. Обоснование перспективности их доклинического изучения для лечения сахарного диабета, метаболического синдрома и ожирения.
6. Оценка антидиабетической активности наиболее перспективных активаторов GSK при однократном и/или длительном введении на моделях сахарного диабета *in vivo*, включая определение чувствительности к инсулину, влияние на метаболизм глюкозы и липидов, системное воспаление, пролиферацию β -клеток. Изучение острой токсичности наиболее активных соединений и обоснование перспективности их доклинического изучения для лечения сахарного диабета.

Научная новизна

Показана возможность плейотропного воздействия на ключевые звенья патогенеза СД2 через GSK3B, РТР1В, AMPK, GSK-опосредованную регуляцию активности внутриклеточных сигнальных каскадов и метаболических путей. Выявлены новые фармакологически активные соединения, перспективные для дальнейшего доклинического изучения.

Выявлено, что соединение К-167 (*Z*-3-(пиридин-2-илметил)индолин-2-он) является наномолярным ингибитором GSK3B, нецитотоксично для нормальных клеток, обладает противовоспалительной и плейотропной антидиабетической активностью на животной модели сахарного диабета 2-го типа, нормализуя гиперинсулинемию, снижая инсулинорезистентность, улучшая толерантность к глюкозе, уменьшая массу висцеральных жировых отложений и триглицериды печени, корректируя маркеры системного воспалительного процесса, а также обладает выраженным антитромботическим действием.

Показано, что соединения В1F-68 и В1F-69 (гидробромид 4'-(3,4-дигидро-пиримидо-[1,2-а]бензимидазол-10(2*H*))-ил-метил)бифенил-2-карбонитрила и гидробромид 4'-(2,3,4,5-

тетрагидро-1*H*[1,3]дiazепино[1,2-*a*]-бензимидазол-1*H*-ил-метил)бифенил-2-карбонитрила) являются субмикромольными активаторами АМРК и ингибируют синтез оксида азота ЛПС-стимулированными макрофагами, обладая низкой цитотоксичностью.

Выявлено соединение AZH-141a (1-(2-диметиламиноэтил)-3-(бифенил-4-ил)метил-2-имино-бензамидазолия гидробромид), микромолярный ингибитор РТР1В и активатор АМРК, обладающее плейотропной антидиабетической активностью на животной модели сахарного диабета 2-го типа, улучшая толерантность к глюкозе и гликемию натощак, а также корректирует липидный гомеостаз, снижая концентрацию общего холестерина и липопротеинов низкой плотности плазмы крови, массу висцеральных жировых отложений и массу тела животных.

Установлено, что соединение NP-0006 (бис(3,4-дигидроксиметил-5-гидрокси-6-метилпиридин-2-илметил)сульфан) является микромолярным активатором GSK и обладает плейотропной антидиабетической активностью на животной модели сахарного диабета 2-го типа, снижая гиперинсулинемию, инсулинорезистентность, улучшая толерантность к глюкозе, ингибируя глюконеогенез, восстанавливая синтез гликогена, снижая массу тела животных за счет уменьшения ретроперитонеальных и мезентериальных висцеральных жировых отложений и корректируя маркеры системного воспаления. NP-0006 повышает пролиферативную активность эндокриноцитов островков Лангерганса поджелудочной железы мышей с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа.

Теоретическая и практическая значимость работы

Предложена оригинальная методология комплексного направленного поэтапного мишень-ориентированного поиска новых антидиабетических соединений с последовательным изучением *in silico*, *in vitro* и *in vivo*, позволяющая эффективно выявлять новые активные соединения с благоприятными фармакокинетическими и токсикологическими характеристиками. Система отличается рациональным выбором биологических мишеней, использованием методов хемоинформатики для отсева соединений с низким лекарственным подобием и выбора для экспериментального изучения структур, фармакофорно близких к известным модуляторам мишени с последующей валидацией соединений-лидеров. Проведен виртуальный скрининг 2309 структур, 303 отобранных соединения экспериментально изучены по влиянию на активность 4 целевых белковых мишеней. Эффективность предложенной системы поиска подтверждена выявлением новых химических классов и скаффолдов ингибиторов GSK3В и РТР1В, активаторов АМРК и GSK.

Показано, что 3-арилиден-2-оксиндолы являются перспективным скаффолдом для поиска и разработки ингибиторов GSK3В. Найдены 2'-карбонитрилбифенил-конъюгированные бензо[*d*]имидазо[1,2-*a*]имидазолы, перспективные для поиска активаторов АМРК. Выявлено, что бифенил-замещенные 2-аминобензамидазолы и 2-иминобензамидазолы являются

перспективным скаффолдом для поиска новых ингибиторов РТР1В. Установлено, что бис-пиридоксиновые соединения с линкерным серусодержащим алифатическим фрагментом являются новым и перспективным скаффолдом для поиска и разработки активаторов GSK.

Доказана антидиабетическая активность наиболее перспективных веществ. Показана возможность плеiotропного воздействия на метаболические дефекты СД2 через регуляцию активности внутриклеточных сигнальных каскадов. Доказана перспективность поиска полифункциональных антидиабетических соединений. Комплексное исследование фармакологических свойств наиболее эффективных соединений обосновало перспективность доклинического изучения ингибитора GSK3В K-167, ингибитора РТР1В/активатора АМРК АЗН-141а и активатора GSK NP-0006. Заложены основы создания лекарственных препаратов с оригинальным механизмом действия для улучшения лечения социально значимых заболеваний.

Методология и методы исследования

Использовались геномные и протеомные данные, агрегированные в системах OpenTargets, TargetMine, Pharos. Хемоинформатический и фармакофорный анализ выполнен с помощью пакета DataWarrior и базы данных ChEMBL, web-сервисов ADMETlab, ADMETsar, SwissADME, Pro-Tox II.

Биохимический скрининг проводился с использованием платформы ADP-Glo™, люминесцентного, спектрофотометрического и флуориметрического анализа с использованием рекомбинантных АМРК, GSK3В, РТР1В и GSK человека.

Использованы модели сахарного диабета на нелинейных крысах, нелинейных мышах и мышах C57bl/6j с индукцией стрептозотоцином, высокожировой диетой или их комбинацией. При исследовании показателей углеводного обмена животных определялась гликемия, толерантность к глюкозе и инсулинорезистентность, гликоген печени. Жировой обмен оценивался по липидному профилю крови и триглицеридам печени, мофрометрии висцеральных жировых отложений и массе тела животных. Тромбоз моделировался аппликацией раствора хлорида железа (III) на сонную артерию. Количество и пролиферация β -клеток поджелудочной железы определялись иммуногистохимически с использованием антител к инсулину, глюкогону, маркеру пролиферации Ki-67 с последующей морфометрической обработкой данных. Острая токсичность определялась при 2-недельном наблюдении. Все исследования с использованием животных были одобрены Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер IRB0005839 IORG0004900 (OHRP), протоколы № 2090-2016 от 23 декабря 2016 г. и № 2021/042 от 29 апреля 2021 года.

Реализация результатов исследования

Разработанная методология поиска и изучения потенциальных противодиабетических соединений внедрена в научно-исследовательскую работу Научного центра инновационных

лекарственных средств с опытно-промышленным производством ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, включена в учебно-методический процесс на кафедрах фармакологии и биоинформатики, фармакологии и фармации Института НМФО ВолгГМУ, фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России.

Полученные данные о взаимосвязях структура-активность используются в направленном синтезе новых химических соединений на кафедре медицинской химии и тонкого органического синтеза Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, в Научно-исследовательском институте физической и органической химии Южного федерального университета, Научно-образовательном центре фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета, кафедрах органической и биомолекулярной химии Уральского федерального университета им. первого Президента России Б.Н. Ельцина и Института органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН.

Значительная часть исследований, изложенных в работе, выполнена в рамках проекта Российского Научного Фонда № 14-25-00139 от 7 августа 2014 г. «Создание системы мишень-ориентированного поиска биологически активных соединений, влияющих на патогенетически важные звенья нарушения углеводного обмена при сахарном диабете типа 2, с использованием технологий компьютерного моделирования и медицинской химии».

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанная оригинальная система мишень-ориентированного поиска антидиабетических средств, основанная на рациональной приоритизации мишеней, вычислительной оценке лекарственного подобия, токсичности, фармакокинетических свойств и фармакофорного подобия соединений, валидации активных соединений *in vitro*, на клеточных и животных моделях, позволяет отсеивать неперспективные соединения и эффективно отбирать, идентифицировать и валидировать новые соединения, перспективные для поиска антидиабетических средств.
2. 3-Арилиден-2-оксиндолы являются перспективным скаффолдом для поиска и разработки ингибиторов GSK3B.
3. Соединение К-167 (Z-3-(пиридин-2-илметил)индолин-2-он) является наномолярным ингибитором GSK3B (IC_{50} 4 нМ), проявляет низкую цитотоксичность, подавляет провоспалительную активацию макрофагов и обладаетплейотропной антидиабетической активностью на животной модели сахарного диабета 2-го типа (мыши C57BL/6J с алиментарным ожирением) при 3-х месячном пероральном введении, нормализуя гиперинсулинемию, снижая инсулинорезистентность, улучшая толерантность к глюкозе, снижая массу

висцеральных жировых отложений и триглицериды печени, а также корректирует маркеры системного воспалительного процесса. Соединение К-167 в дозе 30 мг/кг оказало более выраженное антиромботическое действие, чем препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в дозе 150 мг/кг. К-167 относится к 5-му классу токсичности (нетоксичные соединения).

4. 2'-Карбонитрилбифенил-конъюгированные бензо[*d*]имидазо[1,2-*a*]имидазолы являются перспективным скаффолдом для поиска и разработки активаторов АМРК.
5. Соединения ВIF-68 и ВIF-69 (гидробромид 4'-(3,4-дигидро-пиримидо- [1,2-*a*]бензимидазол-10(2*H*)-ил-метил)бифенил-2-карбонитрила и гидробромид 4'-(2,3,4,5-тетрагидро-1*H*[1,3]дiazепино[1,2-*a*]-бензимидазол-1*H*-ил-метил)бифенил-2-карбонитрила) являются субмикромольными активаторами АМРК (EC_{50} 0,34 мкМ и 0,44 мкМ, соответственно) и ингибируют синтез оксида азота ЛПС-стимулированными макрофагами, обладая низкой цитотоксичностью.
6. Бифенил-замещенные 2-аминобензимидазолы и 2-иминобензимидазолы являются перспективным скаффолдом для поиска и разработки ингибиторов РТР1В.
7. Соединение АZH-141a (1-(2-диметиламиноэтил)-3-(бифенил-4-ил)метил- 2-имино-бензо[*d*]имидазолия гидробромид) является микромольным ингибитором РТР1В (IC_{50} 30,5 мкМ) и микромольным активатором АМРК (EC_{50} 21,7 мкМ) и обладает плейотропной антидиабетической активностью на животной модели сахарного диабета 2-го типа (крысы с алиментарным ожирением и индукция стрептозотоцином) при 21-дневном пероральном введении, значимо улучшая толерантность к глюкозе и гликемию натощак, а также корректирует липидный гомеостаз, снижая концентрацию общего холестерина и липопротеинов низкой плотности плазмы крови, массу висцеральных жировых отложений и массу тела животных. АZH-141a относится к 3-му классу токсичности (умеренно токсичные соединения).
8. Бис-пиридоксиновые соединения с линкерным серусодержащим алифатическим фрагментом являются перспективным скаффолдом для поиска и разработки активаторов GCK.
9. Соединение NP-0006 (бис(3,4-дигдроксиметил-5-гидрокси-6-метилпиридин-2-илметил)сульфан) является микромольным активатором GCK (EC_{50} 18,6 мкМ; E_{max} 150,6±1,8%) и обладает плейотропной антидиабетической активностью на животной модели сахарного диабета 2 типа (мыши C57BL/6J с алиментарным ожирением) при 3-х недельном внутрибрюшинном введении, снижая гиперинсулинемию, инсулинорезистентность, улучшая толерантность к глюкозе, ингибируя глюконеогенез, восстанавливая синтез гликогена, снижая массу тела животных за

счет уменьшения ретроперитонеальных и мезентериальных висцеральных жировых отложений и корректируя маркеры системного воспаления. NP-0006 повышает пролиферативную активность эндокриноцитов островков Лангерганса поджелудочной железы мышей с экспериментальным СД1 при однократном введении в дозе 50 мг/кг. NP-0006 относится к 4-му классу токсичности (малотоксичные соединения).

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов и методических подходов, соответствующих поставленным задачам. Сформулированные в диссертации выводы были подтверждены экспериментальным материалом, анализом литературы, точностью статистической обработки полученных результатов.

Основные положения диссертационной работы докладывались, обсуждались и представлялись на 22-ом Открытом межрегиональном конгрессе «Volga Pharma Summit» (г. Волгоград, 2017 г.), Всероссийской конференции «MedChem Russia 2019» (г. Екатеринбург, 2019 г.), XXV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (г. Москва, 2018 г.), Всероссийской научной конференции молодых ученых «Достижения современной фармакологической науки» (г. Рязань, 2018 г.), 76-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (г. Волгоград, 2018 г.), Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (г. Москва, 2019 г.), XXIV Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области (г. Волгоград, 2019 г.), 77-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (г. Волгоград, 2019 г.), 78-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (г. Волгоград, 2020 г.), XXV Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области (г. Волгоград, 2020 г.), Весенней школе-конференции по медицинской химии «МедХимРар-21» (г. Москва, 2021 г.); 79-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (г. Волгоград, 2021 г.), XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (г. Екатеринбург, 2016 г.), конференции 26th Young Research Fellows Meeting (Франция, г. Париж, 2019), Всероссийской конференции «MedChem Russia 2022» (г. Волгоград, 2022 г.).

По теме диссертации опубликовано 24 печатных работ, из них 13 в ведущих научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 1 учебное пособие и 1 монография. Получено 6 патентов на изобретения РФ.

Личный вклад автора

Вклад автора заключается в определении направления и планировании исследования, непосредственном участии во всех этапах исследования. Автором разработана методология поиска новых антидиабетических соединений, выполнены этапы компьютерной обработки и отбора соединений. Вклад в выполнение экспериментальной работы заключался в планировании, личном участии в проведении экспериментов, анализе и интерпретации полученных данных. При написании диссертационной работы автором выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы, сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и практических рекомендаций, оформление рукописи. Автором выполнена подготовка, написание и подготовка к публикации статей по материалам исследования в научных изданиях, подготовка заявок на регистрацию изобретений.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 237 страницах машинописного текста и состоит из введения, 7 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, перечня сокращений и условных обозначений и списка литературы. Работа иллюстрирована 72 рисунками и 28 таблицами. Библиографический указатель включает 460 источников, из них 12 отечественных, 448 иностранных.

Глава 1. Современные подходы к разработке средств терапии сахарного диабета 2-го типа

1.1. Сахарный диабет 2-го типа как научная, медицинская и социальная проблема

1.1.1. Социальная значимость

Согласно данным Всемирной федерации диабета в 2019 году насчитывается около 463 миллиона человек с данным заболеванием среди возрастной группы 20-79 лет, согласно прогнозам, к 2045 году их численность возрастет уже до 700 миллионов, что является глобальной проблемой здравоохранения [104]. Считается, что около 46% случаев заболевания являются недиагностированными. Порядка 72% людей с диабетом принадлежат к трудоспособному возрасту (20-64 лет). Число смертей, ассоциированных с СД в 2019 году, оценивается в 4,2 миллиона. По данным Государственного регистра больных сахарным диабетом в Российской Федерации, на 27 мая 2021 г. было зарегистрировано 4,867 млн человек с диагнозом «сахарный диабет» [2]. Однако ряд клинико-эпидемиологических исследований, проводившихся в России, показал, что реальная распространенность СД может превышать зарегистрированную. В частности, по оценкам IDF 2019 года, в России проживают около 8,3 миллиона больных СД в возрасте от 20 до 79 лет, распространенность заболевания составляет 7,8% (95% Д.И. 6,0–9,8%), число диабет-ассоциированных смертей составило 110 530,2 (95% Д.И. 80 778,9–134 463,0). Растущая заболеваемость связывается с распространением ожирения, снижением физической активности и изменением диетических привычек.

Наиболее остро стоит проблема сахарного диабета 2-го типа (СД2), на долю которого приходится до 90% от общего числа больных. Заболевание характеризуется прогрессирующим течением и развитием ряда острых (диабетический кетоацидоз, гиперосмолярная кома, гипогликемия) и поздних осложнений (атеросклероз, инфаркт миокарда и инсульт [257], ретинопатия [353], нефропатия [319], сенсорная нейропатия [387], нарушение заживления ран [254; 342]), зачастую приводя к временной потере трудоспособности, инвалидизации и ранней смерти, в первую очередь из-за высокого сердечно-сосудистого риска [224].

Общие прямые расходы системы здравоохранения на диабет во всем мире по данным экспертов ВОЗ, полученным на основании модели IDF, для людей в возрасте 20-79 лет оцениваются в 153-286 миллиардов долларов США. Проблема СД в России также представляет собой тяжелое экономическое бремя. По данным IDF, общие затраты, связанные с диабетом в 2019 году, составили 10,6 миллиарда рублей. Средние годовые затраты на пациента с СД 1-го

типа (СД1) составляют 81,1 тыс. руб., а на пациента с СД2 – 70,8 тыс. руб. В случае СД2 наличие осложнений приводит к трехкратному увеличению медицинских затрат [61].

1.1.2. Этиопатогенез сахарного диабета 2-го типа

Сахарный диабет 2-ого типа (СД2) – гетерогенное заболевание, связанное с разнообразными нарушениями углеводного, жирового и белкового обмена. Ключевыми звеньями этиопатогенеза служат периферическая инсулинорезистентность и дисфункция панкреатических β -клеток [45]. Инсулинорезистентность периферических тканей, таких как печень, мышцы и адипоциты, предшествует манифестации сахарного диабета 2-го типа. Она запускает порочный круг, в котором инсулинорезистентные периферические ткани заставляют панкреатические β -клетки увеличивать выделение инсулина, а устойчивые высокие концентрации инсулина вызывают дальнейшее развитие резистентности к инсулину. В настоящее время существуют две основные гипотезы, описывающие механизм ее развития: первая выделяет «липидную перегрузку» в гепатоцитах и мышечных клетках в качестве ключевого фактора, вторая акцентируется на роли накопления липидов в адипоцитах, что приводит к гипертрофии жировой ткани и, как следствие, повышенному уровню адипонектинов и хроническому местному воспалению [199].

Повышенная на первых этапах заболевания секреция инсулина истощает адаптационные возможности островкового аппарата поджелудочной железы. Сопутствующая глюкотоксичность, липотоксичность и оксидативный стресс ведут к прогрессирующему снижению функциональной массы β -клеток [222]. В сочетании с нарушением утилизации глюкозы в инсулин-зависимых тканях (печень, мышцы, жировая ткань, головной мозг) это сопровождается чрезмерным печеночным выбросом глюкозы за счет глюконеогенеза и гликогенолиза. В комплексе эти процессы приводят к постоянной гипергликемии и считаются основными патофизиологическими дефектами при СД2 [189]. Кроме того, генетическая предрасположенность, возраст и ожирение общеприняты в качестве ведущих факторов, усугубляющих течение заболевания [35].

Чаще всего, сахарный диабет 2 типа является проявлением метаболического синдрома, включающего помимо нарушенной толерантности к глюкозе и дисфункции островкового аппарата поджелудочной железы следующие основные компоненты: артериальную гипертензию, нарушения в системе свертываемости крови, способствующие развитию тромбозов, нарушения липидного обмена, выражающиеся в развитии ожирения абдоминального типа, гипертриглицеридемии и гиперхолестеринемии.

1.1.3. Существующие подходы к терапии сахарного диабета 2-го типа

С момента открытия инсулина в 1921 г. в лечении сахарного диабета наблюдается устойчивый прогресс. В настоящее время для клинического применения одобрены 11 классов антидиабетических лекарственных средств, и многие другие находятся в разработке, однако ни один из используемых препаратов не способен последовательно остановить, обратить, или излечить СД2. Кроме того, современные и находящиеся на поздних стадиях разработки методы лечения все еще имеют существенные недостатки, такие как ограниченную эффективность, нежелательные побочные эффекты и субоптимальные фармакокинетические параметры [194].

К основным классам пероральные гипогликемических препаратов относятся:

1. Сульфонилмочевины (глипизид, глибурид, гликлазид, глимепирид)
2. Меглитиниды (репаглинид и натеглинид)
3. Бигуаниды (метформин)
4. Тиазолидиндионы (росиглитазон, пиоглитазон)
5. Ингибиторы α -глюкозидазы (акарбоза, миглитол, воглибоза)
6. Ингибиторы DPP-4 (ситаглиптин, саксаглиптин, вилдаглиптин, линаглиптин, алоглиптин)
7. Ингибиторы SGLT2 (дапаглифлозин и канаглифлозин)
8. Агонист центральных D₂-дофаминовых рецепторов бромокриптин

Применяемые в настоящее время пероральные антидиабетические средства могут быть разделены на пять групп, исходя из механизма действия:

1. Замедляющие абсорбцию моносахаридов в кишечнике – ингибиторы α -глюкозидазы, такие как акарбоза.
2. Стимулирующие секрецию (экзоцитоз) инсулина – производные сульфонилмочевины и другие стимуляторы АТФ-зависимого калиевого канала, например, репаглинид, натеглинид и др.
3. Средства, сенсibiliзирующее периферические ткани к инсулину и обладающие плейотропным действием на метаболизм углеводов и липидов – бигуаниды, такие как метформин, и активаторы гамма-рецептора, активируемого пролифератами пероксисом, такие как росиглитазон и пиоглитазон.
4. Потенцирующие действие инкретинов – эксенатид, аналог глюкагоноподобного пептида-1 продолжительного действия, и глиптины, ингибиторы дипептидилпептидазы типа 4, отвечающей за деградацию инкретинов.
5. Аналоги амилина – прамлинтид [117].

Кроме того, в комбинированной терапии СД2 применяются препараты инсулина, особенно при неудовлетворительном гликемическом контроле [97]. Комбинированная терапия инсулином и пероральными ЛС необходима при истощении островкового аппарата поджелудочной железы, кроме того, она позволяет уменьшить дозировки других антигипергликемических средств и, следовательно, частоту и выраженность их нежелательных эффектов. С другой стороны, пероральные ЛС повышают эффективность эндогенного инсулина, улучшая гликемическую стабильность [421].

1.1.4. Дисфункция β -клеток и смена парадигмы лечения сахарного диабета 2-го типа

Ожирение и повышение уровня свободных жирных кислот считается ключевым фактором развития инсулинорезистентности периферических тканей, включая мышцы, жировую ткань и печень. Неспособность β -клеток поджелудочной железы согласовывать секрецию инсулина с повышенной потребностью в инсулине является движущей силой развития тяжелой гипергликемии [450]. Несмотря на то, что оптимальный гликемический контроль значительно снижает риск и скорость развития микрососудистых осложнений и в некоторой степени макрососудистых событий, многим пациентам не удается достичь индивидуальных целей лечения, что приводит к значительной заболеваемости и смертности. Естественно, прогрессирующее течение болезни сопряжено с ухудшением гликемического контроля с течением времени, несмотря на комбинированную гипогликемическую терапию. Ряд крупномасштабных исследований, в том числе Программа перспективного диабета Соединенного Королевства (UKPDS) [320], Исследование прогрессирования исходов диабета (ADOPT) [84] и Белфастское диетическое исследование [252], показали, что ухудшение гликемического контроля происходит из-за непрерывного снижения функции β -клеток (получено из оценки гомеостатической модели (НОМА-В) или инсулиногенного индекса [70]), которое может усугубляться вызванным апоптозом снижением массы β -клеток [376].

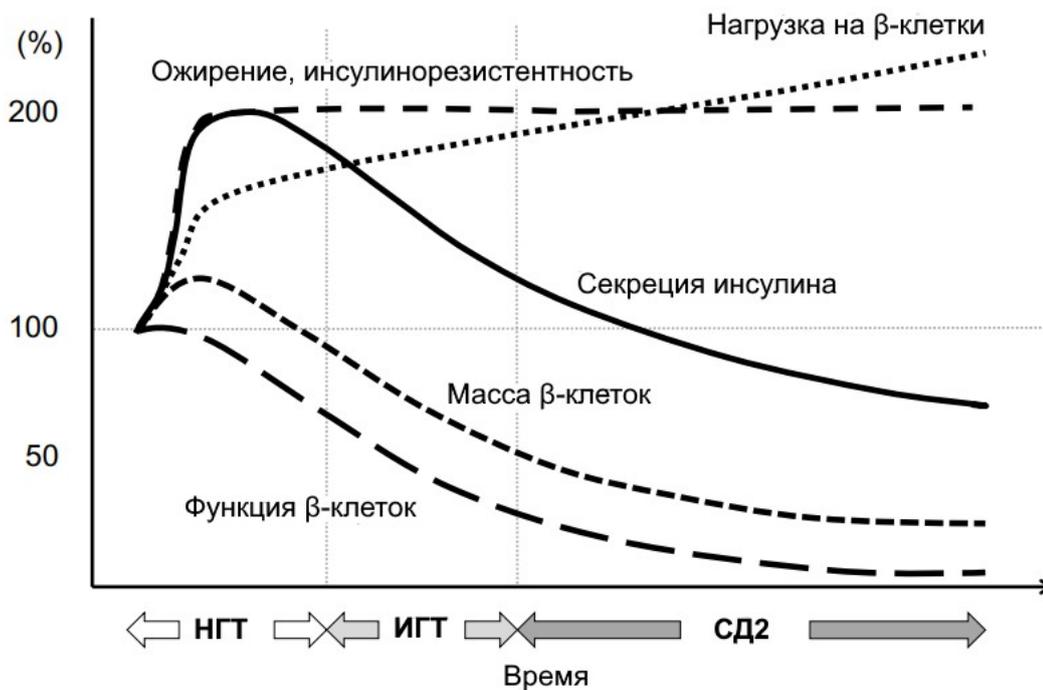


Рисунок 1 – Изменение функциональной массы β -клеток во время развития СД2 (адаптировано из [430]).

Потеря β -клеток связана с различными стрессорными факторами, хотя неясно, какой из путей нарушается первым [218]. В человеческих β -клетках хронически повышенный уровень глюкозы может стимулировать агрегацию β -клеточного островкового амилоидного полипептида (IAPP) с образованием токсичных агрегатов [346; 378], стимулировать провоспалительный ответ с миграцией макрофагов [336; 338] и, возможно, вызывают стресс эндоплазматического ретикулума (ЭР) и оксидативный стресс [75]. Следует иметь в виду, что многие представления о механизмах дисфункции β -клеток при СД2 исходят из исследований на грызунах и требуют подтверждения на людях, поскольку мы знаем, что человеческие β -клетки реагируют на стресс иначе, чем клетки грызунов [441], и имеют меньшую способность к регенерации [277]. Повреждающие факторы также могут способствовать снижению массы β -клеток, что было продемонстрировано в при аутопсии у пациентов с СД2 [251].

Гликемический контроль может быть достигнут стимуляцией высвобождения эндогенного инсулина из островков ПЖЖ. Примерами являются давно доступные препараты класса сульфонилмочевины и более современные агонисты рецептора глюкагоноподобного пептида GLP-1 длительного действия и ингибиторы дипептидилпептидазы DPP-4. Однако, хотя эти ЛС улучшают гликемический контроль, они также увеличивают секреторную нагрузку на β -клетки, и вполне вероятно, что длительная стимуляция β -клеток секреторагами инсулина, которые и так подвержены постоянной гипергликемии, неблагоприятна в длительной перспективе [273]. Действительно, воздействие на островки недиабетических доноров-людей *in vitro* 20 мМ глюкозы в течение 10-13 дней приводит к истощению запасов инсулина из-за

непрерывного секреторного стресса и неспособности биосинтеза проинсулина удовлетворить потребности, а также к секреции незрелого проинсулина [37]. Однако данные этих исследований *in vitro* с использованием очень высоких концентраций глюкозы в течение длительных периодов времени не вполне соответствуют условиям *in vivo*. Кроме того, островки человека, которые культивировали в течение 2 дней при умеренно повышенных концентрациях глюкозы (8 мМ), также показали нарушение глюкозо-стимулированной секреции инсулина. Интересно, что секреторный ответ инсулина восстановился после кратковременного воздействия низких уровней глюкозы [285]. Хотя восстановление недиабетических островков человека, которые были трансплантированы диабетическим мышам (глюкоза крови >20 мМ), было ограничено даже после восстановления гликемии [334; 374], доказательные исследования на людях указали на положительные результаты метаболического покоя β -клеток. Например, у пациентов с СД2 диазоксид (ингибирует высвобождение инсулина за счет гиперполяризации мембраны β -клеток) при сопутствующей терапии инсулином улучшал функцию β -клеток после прекращения лечения [411].

Дисфункция β -клеток ассоциирована с высоким уровнем гликированного гемоглобина (>9%), длительным течением заболевания и долговременным приемом препаратов, стимулирующих секрецию инсулина [214]. Сейчас именно недостаточная масса β -клеток считается необходимым фактором развития заболевания [457]. Развитие наших знаний о патогенезе СД2 и введение в клиническую практику новых ЛС привело к изменению парадигмы лечения от гликемического контроля к защите β -клеток, важность которой подчеркивает все большее число исследований [171; 429]. Далее будут рассмотрены основные терапевтические подходы к лечению СД2 исходя из экспериментальных и клинических данных об их влиянии на сохранение функциональной массы β -клеток.

1.1.5. Улучшение гликемического контроля за счет стимуляции секреции эндогенного инсулина

Производные сульфонилмочевины

Производные сульфонилмочевины вводились в клиническую практику в 1984-1995 гг. Сульфонилмочевины являются препаратами второй линии при неэффективности метформина во многих клинических практических рекомендациях, поскольку они широкодоступны и имеют относительно благоприятный профиль безопасности, недостатками являются риск гипогликемии и увеличения массы тела [46]. Сульфонилмочевины стимулируют секрецию инсулина, связываясь с АТФ-чувствительным калиевым каналом, что приводит к деполяризации плазматической мембраны β -клеток. Это происходит независимо от уровня глюкозы в крови и

без устранения патологических процессов, протекающих в β -клетках. Хотя секретируемый инсулин может эффективно снижать уровень глюкозы в первый год, несколько клинических испытаний, включая UKPDS [320] и ADOPT [84], показали, что лечение сульфонилмочевинной связано с ускоренным ухудшением гликемического контроля. Это прогрессирующее снижение гликемии было связано с недостаточностью β -клеток, поскольку маркеры функции β -клеток (включая HOMA-B и инсулиногенный индекс) со временем ухудшались.

Инкретиномиметики: агонисты рецепторов GLP-1 длительного действия и ингибиторы DPP-4

Иная ситуация характерна для позднее введенных в практику классов ЛС, стимулирующих секрецию инсулина – GLP-1 и других инкретиномиметиков. Пептид GLP-1 снижает уровень глюкозы в крови как за счет глюкозозависимой стимуляции выработки и секреции инсулина β -клетками, так и за счет ингибирования высвобождения глюкагона из альфа-клеток. Кроме того, GLP-1 обладает несколькими экстра-панкреатическими глюкозоснижающими эффектами, включая замедление опорожнения желудка, уменьшение поглощения глюкозы в кишечнике, подавление выработки эндогенной глюкозы и стимуляцию насыщения, что приводит к снижению потребления пищи и снижению веса [245; 314]. Агонисты рецептора GLP-1 вызвали большой интерес, поскольку лираглутид [361] и семаглутид [268] показали способность улучшать сердечно-сосудистые исходы при СД2, в то время как ликсисенатид [363] и ингибиторы DPP-4 ситаглиптин [290] и алоглиптин [238] подтвердили снижение уровня глюкозы при обеспечении сердечно-сосудистой безопасности, но не пользы, в недавних исследованиях. Показано, что ингибиторы DPP-4 улучшают функцию и выживаемость островков человека *in vitro*. Таким образом, GLP-1 защищает β -клетки человека от токсичности глюкозы и липидов [447]. Также, GLP-1 предотвращал стресс ER и образование агрегатов IAPP в островках человека [315; 448]. Наконец, было показано, что аналог GLP-1 эксендин-4 снижает экспрессию нескольких провоспалительных цитокинов в изолированных островках человека [243]. Хотя эти данные позволяют предположить, что GLP-1 может сохранять функцию и выживаемость β -клеток человека, пока нет достаточных свидетельств, подтверждающих возможность того, что агонисты рецептора GLP-1 или ингибиторы DPP-4 вызывают устойчивые существенные улучшения функции β -клеток и гликемии пациентов после прекращения терапии [250; 293; 362]. Кроме того, устойчивость улучшения функции β -клеток при терапии агонистами рецептора GLP-1 и ингибиторов DPP-4 к неясна, поскольку положительные эффекты этих ЛС были продемонстрированы в исследованиях относительно короткой продолжительности (обычно 24-52 недели). Более длительные, но неконтролируемые открытые расширенные исследования этих программ фазы III в большой степени субъективны по отношению к систематической ошибке отбора, поскольку пациенты, получившие наибольшую пользу в

исходном исследовании, с большей вероятностью продолжают терапию. Таким образом, долгосрочные эффекты терапии на основе GLP-1 у людей в настоящее время остаются неясными, в том числе есть свидетельства об их неблагоприятном влиянии [412]. Клинические испытания ситаглиптина не показали сохранения функции β -клеток у пациентов с сахарным диабетом 1-ого типа [263]. Однако, мета-анализ испытаний ингибиторов DPP-4 у пациентов с СД2 подтвердил значимое улучшение функции β -клеток, превосходящее эффект ингибиторов альфа-глюкозидазы и SGLT-2 [265; 292].

1.1.6. Восстановление гликемического контроля при обеспечении покоя β -клеток

Изменение образа жизни

Диета и физические упражнения для снижения массы тела являются первым шагом в лечении раннего СД2 почти во всех рекомендациях, а также краеугольным камнем для предотвращения заболевания у людей с ожирением из группы высокого риска. За счет снижения массы тела повышается чувствительность к инсулину, что обычно сопровождается снижением уровня свободных жирных кислот, что приводит к снижению нагрузки на β -клетки. В программе профилактики диабета (DPP) изменение образа жизни снизило заболеваемость диабетом на 58% [167], и это преимущество сохранялось в течение 15 лет в последующем исследовании результатов DPP (DPPOS) [278]. Также, у пациентов с диагностированным СД2 коренное изменение диеты при потреблении 600 ккал/день, приводящее к отрицательному энергетическому балансу, может быстро улучшить функцию β -клеток, что было подтверждено методом гипергликемического клэмп [420]. Эффект сохранялся более 6 месяцев у 40% участников другого исследования, в котором использовалась очень низкокалорийная диета. Примечательно, что у участников было установлено восстановление первой фазы секреции инсулина [455]. Хотя снижение потребления калорий с увеличением физических упражнений может, без сомнения, предотвратить или обратить вспять (недавно начавшийся) СД2 у многих людей, к сожалению, многие пациенты неспособны на длительное время изменять образ жизни, кроме того, заболевание часто выявляется на более поздних этапах, что делает необходимым начало фармакологической коррекции.

Метформин

Метформин снижает уровень глюкозы за счет снижения выработки глюкозы в печени и повышения периферической чувствительности к инсулину. Благодаря хорошей переносимости, благоприятному профилю побочных эффектов, низкой стоимости и положительному эффекту для сердечно-сосудистой системы, наблюдаемым в исследовании UKPDS, метформин является препаратом первого выбора во всех руководствах по диабету [368]. Ряд исследований на

островках поджелудочной железы крыс и целых животных показали, что метформин защищает β -клетки от глюкозотоксичности [382] и снижает инсулин-секреторную нагрузку [380], защищая их от декомпенсации [381].

В тоже время, клинические данные не столь однозначны. Например, метформин снижал риск прогрессирования СД2 в исследовании DPP [167] в сочетании с улучшением функции β -клеток [426], но в исследовании UKPDS метформин не мог предотвратить ухудшение гликемического контроля [320], что также было показано в исследовании ADOPT [70; 84]. Аналогичные результаты были получены в ряде исследований эффективности метформина у подростков. Исследование TODAY показало, что для более чем половины молодых людей с диагностированным СД2, получавших монотерапию метформином, характерно быстрое разрушение β -клеток и ранняя потребность в лечении инсулином [228]. Исследование восстановления секреции инсулина RISE показало, что даже у молодых людей с преддиабетом или недавно диагностированным диабетом 2 типа лечение метформином не смогло предотвратить ухудшение функции β -клеток [423]. Также, 2-летняя терапия метформином не сохраняла функции β -клеток у подростков с ожирением в исследовании HIP [206]

Ранняя интенсивная терапия инсулином

В мета-анализе различных исследований, проведенных у пациентов с недавно диагностированным СД2, было показано, что интенсивное краткосрочное лечение инсулином сохраняет функцию β -клеток, что приводит к поддержанию нормогликемии после прекращения приема инсулина без дополнительных глюкозоснижающих терапий [419]. Важно отметить, что пациенты с наибольшим улучшением функции β -клеток после инсулинотерапии с большей вероятностью сохраняли гликемическую ремиссию. Наблюдаемое улучшение функции β -клеток может быть связано с уменьшением гипергликемии; однако положительные эффекты кратковременного интенсивного лечения инсулином также наблюдались по сравнению со снижением уровня глюкозы пероральными гипогликемическими средствами [287], особенно глибенкламидом [294]. В мета-анализе было показано, что краткосрочный курс инсулинотерапии без других ЛС привел к ремиссии у 46% пациентов через год с заметным улучшением функции β -клеток [354]. Хотя большинство проанализированных исследований были неконтролируемыми по дизайну и проводились на пациентах из азиатских стран (ограничивая экстраполяцию этих данных на другие части мира), эти исследования в целом подтверждают вывод о том, что инсулинотерапия улучшает функцию β -клеток. Кроме того, в большом многоцентровом исследовании ORIGIN лечение инсулином гларгином показало тенденцию к снижению заболеваемости диабетом у пациентов с преддиабетическим состоянием в фазе последующего наблюдения после отмены инсулина, показывая при этом улучшение сердечно-сосудистых исходов

[246]. Механизмы, с помощью которых инсулин улучшает функцию и/или выживаемость β -клеток, помимо снижения уровня глюкозы как такового, до конца не изучены.

Тиазолидиндионы

Тиазолидиндионы (TZD) являются агонистами гамма-рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPAR- γ), при этом пиоглитазон в настоящее время доступен клинически. TZD улучшают чувствительность к инсулину жировой ткани, скелетных мышц и печени, тем самым снижая уровень глюкозы и липидов крови [259]. Такой механизм действия сам по себе снижает секреторную нагрузку на β -клетки и снижает оксидативный стресс, кроме того, TZD также могут напрямую улучшать функцию β -клеток человека [323]. У людей как статические параметры функции β -клеток, так и функция β -клеток, измеренная с помощью гипергликемического клэмпса, улучшались после лечения TZD [259]. В соответствии с этими наблюдениями, долгосрочные клинические испытания, такие как ADOPT (рис. 1А), последовательно показали, что TZD значительно улучшают гликемический контроль при СД2, сохраняя функцию β -клеток [273]. Также у лиц с высоким риском развития диабета сохранение β -клеток привело к снижению заболеваемости диабетом на 52-81%, как было показано в исследованиях DPP [405] и TRIPOD [404] для троглитазона, PIPOD [288] и ACT NOW [157; 397] для пиоглитазона, DREAM для розиглитазона [289]. Последующее 1,5-летнее наблюдение за участниками исследования DREAM (исследование DREAM-ON) продемонстрировало стойкие положительные эффекты лечения розиглитазоном на заболеваемость диабетом после прекращения терапии [365]. Таким образом, существуют убедительные доказательства того, что лечение TZD приводит к устойчивому гликемическому контролю за счет снижения потребности в инсулине и прямого улучшения функции β -клеток как у пациентов с СД2, так и у субъектов с высоким риском развития СД2. Однако из-за профиля неблагоприятных побочных эффектов пиоглитазона, включая увеличение массы тела, повышенный риск задержки жидкости [157], сердечной недостаточности [396] и переломов костей у женщин [364; 458], его использование в клинической практике стало ограниченным. В тоже время, существует мнение, что положительный эффект пиоглитазона превосходит потенциальные риски [398].

Ингибиторы SGLT-2

Самым последним дополнением в арсенале пероральных гипогликемических ЛС являются ингибиторы натрий-глюкозного переносчика SGLT-2. Они снижают уровень глюкозы в плазме крови за счет уменьшения ее реабсорбции в проксимальных канальцах почек и увеличению экскреции с мочой [435]. В числе других метаболических и гемодинамических эффектов ингибитор SGLT-2 эмпаглифлозин вызывает значительное снижение сердечно-сосудистой смертности и госпитализаций из-за сердечной и почечной недостаточности [297]. Ингибиторы SGLT-2 действуют независимо от механизмов, связанных с чувствительностью к

инсулину или секрецией инсулина. Действительно, было обнаружено, что ингибитор SGLT-2 дапаглифлозин не влияет на секрецию инсулина и парадоксальным образом увеличивает секрецию глюкагона островками человека *in vitro* [340]. Тем не менее, данные ЛС могут сохранить функцию β -клеток за счет уменьшения гипергликемии и секреторного стресса β -клеток. Действительно, в краткосрочных исследованиях было показано, что ингибирование SGLT-2 улучшает различные параметры функции β -клеток, включая чувствительность β -клеток к глюкозе, при фактическом снижении концентрации инсулина или С-пептида [377; 400; 433]. В сравнительном исследовании в комбинации с метформином дапаглифлозин имел более низкий начальный эффект по снижению HbA1c, чем глипизид (-0,4% против -0,8%), однако для дапаглифлозина снижение уровня глюкозы было более устойчивым и сопровождалось снижением массы тела при наблюдении в течение 208 недель [366]. Влияние ингибиторов SGLT-2 на функцию β -клеток человека при длительном применении пока не изучено.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика основных классов антидиабетических средств [429]

Группа ЛС	Снижение HbA1c	Риск гипогликемии	Влияние на массу тела	Защита β -клеток
Метформин	От среднего до сильного	Низкий	Нейтральное или снижает	Да
Ингибиторы DPP-4	Среднее	Низкий	Нейтральное	Да
Агонисты рецепторов GLP-1	Сильное	Низкий	Снижает	Да
Ингибиторы SGLT2	Среднее	Низкий	Снижает	Да
Ингибиторы α -глюкозидазы	Небольшое	Низкий	Нейтральное	Да
Тиазолидиндионы	Среднее	Низкий	Увеличивает	Да
Инсулин	Очень сильное	Высокий	Увеличивает	Да
Производные сульфонилмочевины	Сильное	Высокий	Увеличивает	Нет
Глиниды	От небольшого до среднего	От низкого до среднего	Нейтральное	Нет

Агонисты рецепторов GLP-1 короткого действия

Агонисты рецепторов GLP-1 короткого действия, включая эксенатид и ликсисенатид, уменьшают постпрандиальную гипергликемию иначе, чем агонисты длительного действия, несмотря на связывание с тем же рецептором [376]. Агонисты короткого действия принимаются перед завтраком и ужином (эксенатид) или только перед завтраком (ликсисенатид) и ослабляют секрецию инсулина после приема пищи [266; 300; 444]. Снижение постпрандиального уровня глюкозы в основном достигается за счет снижения моторики желудка, поглощения глюкозы кишечником, глюконеогенеза в печени и секреции глюкагона [372]. Кроме того, за счет снижения

аппетита ограничивается количество потребляемых калорий [314]. Все эти факторы приводят к снижению постпрандиального уровня глюкозы и, следовательно, уровня инсулина. Таким образом, можно предположить, что агонисты рецептора GLP-1 короткого действия, в отличие от их аналогов длительного действия, способны обеспечить покой β -клеток вместо стимуляции секреции инсулина. Показано, что 3-летнее лечение эксенатидом увеличивало чувствительность β -клеток к глюкозе и скорость секреции инсулина у пациентов с СД2, также по сравнению с пациентами, получавшими гларгин, с аналогичным гликемическим контролем [300].

1.2. Сахарный диабет и связанные патологии как иммунометаболические заболевания

Имунометаболизм в настоящее время рассматривается как основной механизм регуляции адаптивного и врожденного иммунитета. В конечном итоге, основная цель данной области – применить результаты иммунометаболических исследований в разработке новых терапевтических стратегий для широкого спектра заболеваний, включая опухолевые, аутоиммунные заболевания и метаболический синдром [125]. Существует множество свидетельств того, что метаболические пути тесно связаны с передачей сигналов и дифференцировкой клеток, как следствие, различные субпопуляции иммунных клеток принимают уникальные метаболические программы, специфичные для их состояния и клеточного окружения. За последние двадцать лет связи между метаболическими и иммунными процессами стали очевидны. Действительно, известно, что воспаление опосредует многие патологии метаболического синдрома. И наоборот, метаболические программы отдельных клеток иммунной системы находятся под жестким контролем и значительно влияют на функцию и дифференцировку клеток. Хотя иммунодепрессивный эффект недостаточного питания давно известен [332], только в основополагающей для области работе 1993 г. Notamisligil и соавт. показали [327], что жировая ткань продуцирует TNF α в моделях ожирения и СД2 у мышей, продемонстрировав, что переизбыток может способствовать воспалению. Воспаление, в свою очередь, вызывает периферическую инсулинорезистентность и связано с патогенезом диабета и метаболического синдрома [326]. В 2003 г. работы Weisberg и соавт. [391] и Xu и соавт. [262] показали, что аккумуляция провоспалительно активированных макрофагов в жировой ткани ассоциирована с развитием инсулинорезистентности при ожирении.

Другим следствием хронического метаболического воспаления и метавоспаления, ведущих к нарушению обмена веществ во многих тканях, является оксидативный стресс. В результате иммунометаболические нарушения часто возникают в виде кластеров заболеваний (ожирение, метаболический синдром, сахарный диабет, сердечно-сосудистые заболевания, рак, нейродегенерация) и способствуют старению, инвалидизации и преждевременной смерти [99].

Несмотря на различные запускающие события, общей для этих патологий особенностью является хроническая активация иммунных клеток, в частности резидентных макрофагов жировой и мышечной ткани и купферовских клеток печени [145]. Показано, что иммунные реакции непосредственно участвуют в развитии резистентности к инсулину и оксидативного стресса [200].

Мыши со сниженным митохондриальным окислительным фосфорилированием (OxPhos) вследствие делеции CR6-взаимодействующего миторибосомного фактора 1 (Crif1) характеризуются M1-провоспалительной поляризацией макрофагов, воспалительными маркерами жировой ткани и системной инсулинорезистентностью. Таким образом, сниженная окислительная функция макрофагов контролирует системную резистентность к инсулину и воспаление жировой ткани, которое можно корректировать с помощью GDF15, что приводит к улучшению окислительной функции макрофагов [166]. Было показано, что повышение уровня GDF-15 вызывает метформин, что, по крайней мере частично, опосредует эффект снижения массы тела [310].

Позднее было показано, что резидентные макрофаги жировой ткани у мышей с ожирением секретируют miRNA-содержащие экзосомы, которые нарушают толерантность к глюкозе и вызывают инсулинорезистентность при введении нормальным мышам. Напротив, экзосомы, полученные от нормальных мышей, улучшают толерантность к глюкозе и чувствительность к инсулину при введении животным с ожирением. Мишенью одной из сверхэкспрессируемых в экзосомах miRNA (miR-155) является PPAR γ [13].

Таким образом, метаболические нарушения, метавоспаление, и оксидативный стресс являются взаимозависимыми звеньями патогенеза метаболических нарушений при метаболическом синдроме и СД2, что обуславливает необходимость комплексной оценки иммунометаболических процессов при поиске средств их фармакокоррекции.

1.3. Рациональный выбор мишеней для разработки лекарственных средств.

Валидированные мишени

Одним из важнейших факторов, определяющих возможность успешной реализации проекта разработки нового ЛС, является научно обоснованный выбор терапевтической мишени. Особое внимание следует сосредоточить на таких аспектах потенциальной мишени, как ее роль в патогенезе заболевания, безопасность, пригодность для регуляции малыми молекулами и анализа их эффекта, а также конкурентные преимущества перед существующими методами лечения. Рекомендуемые подходы и ключевые вопросы при оценке мишеней, особенно в практике академических исследований, изложены в ряде работ [55; 106; 212; 282] и

предназначены для повышения надежности и эффективности трансляционных исследований, а также для облегчения сотрудничества между академическими кругами и фармацевтической отраслью [355].

Основные причины неспособности новых ЛС показать эффективность в клинических испытаниях включают отсутствие данных, демонстрирующих причинно-следственную связь лекарственной мишени с заболеванием или плохое понимание роли мишени в патофизиологии этого заболевания [357]. Таким образом, критически важными являются доказательства того, что модуляция интересующей мишени приводит к клинически значимым физиологическим эффектам. Имеющиеся модели и анализы для доклинической валидации мишени часто неадекватно оценивают причинно-следственные связи, имеющие непосредственное отношение к человеческому организму, и не предоставляют однозначных доказательств в поддержку или опровержение терапевтической гипотезы для мишени [281]. Таким образом, доклинические данные легче переводятся в клиническую ситуацию, когда они основаны на сходящихся доказательствах по меньшей мере двух, предпочтительно более, независимых экспериментальных процедур, каждая из которых фиксирует различные признаки моделируемого расстройства [349].

Чтобы повысить достоверность, важно различать «ассоциацию» (например, мишень имеет измененную экспрессию, распределение или активность в условиях болезни, но не вызывает развития заболевания) и «причинно-следственную связь» – патофизиологические изменения в результате модуляции мишени [227]. Функциональные изменения в мишени во время заболевания обычно обеспечивают большую уверенность, чем изменения уровней экспрессии мишени. Высокоселективные манипулятивные процессы (такие как нокаут-технологии) предпочтительнее косвенно или неселективно индуцированных изменений (таких как ингибирование гистоновых деацетилаз). Изменение фенотипа путем манипулирования мишенью двунаправленным образом также обеспечивает высокую степень уверенности в ее функциональной роли [272].

При анализе данных таких исследований строгие статистические критерии, установленные перед сбором и интерпретацией данных, могут помочь избежать предвзятости и обеспечить верную интерпретацию. При большом размере выборки значение p для наблюдения может быть низким, даже если размер эффекта мал и биологически не имеет значения. И наоборот, при небольших размерах выборки или большой изменчивости значение p для наблюдения может составлять $>0,05$, хотя размер эффекта достаточно велик, чтобы быть биологически значимым [209; 279; 402; 442]. Поэтому следует критически рассмотреть, имеют ли размеры эффекта, наблюдаемые в экспериментальной модели, величину, которая была бы клинически значимой, если бы она была подтверждена у пациентов.

Хронические заболевания, в том числе СД2, часто развиваются как следствие сочетания множества генетических и экологических факторов. Если существует несколько потенциальных мишеней для лекарственных средств, процессы отбора и приоритизации должны включать рассмотрение причинно-следственной связи и размеров эффекта, наблюдаемых при их модуляции. Однако в этом контексте следует признать, что некоторые доклинические модели не могут быть дополнительно улучшены с учетом нынешнего состояния технологий. Это означает, что две или более мишени могут иметь одинаково высокие оценки. В этой ситуации было бы полезно продолжить работу на начальном этапе над обеими мишенями и выявить различия в эффективности и безопасности в процессе исследования.

Токсическое воздействие лекарств-кандидатов является второй основной причиной прекращения проекта, или может привести к ограничению дозировки и/или ограничению применимости для конкретных групп пациентов, если проект будет продолжен. Проблемы безопасности могут возникать в результате токсических эффектов при воздействии на мишень или связанных с ней токсических эффектов, вызванных модуляцией биологической функции интересующей мишени («on-target» токсичность), и/или токсических эффектов, не связанных с самой мишенью, но вызванных влиянием ЛС на другие мишени или пути, что связано с природой тестируемого соединения, такими как отсутствие селективности или токсичные метаболиты («off-target» токсичность) [322].

Раннее выявление потенциальных рисков безопасности, связанных с мишенью, и более глубокое понимание лежащих в их основе молекулярных механизмов могут направлять прогресс проекта и способствовать разработке стратегий смягчения последствий [357; 424]. Первым шагом является обзор генетических баз данных человека и животных для выявления известных мутаций потери функции или усиления функции мишени, которые могут иметь отношение к заболеванию или токсическим эффектам, что также может отражать гетерогенность в популяции пациентов, представляющих интерес [427]. Кроме того, базы данных об одобрении лекарств или клинических испытаниях являются потенциальными источниками информации, имеющей отношение к токсичности, если препараты, модулирующие цель, уже существуют [303]

Важно исследовать и понять экспрессию гена, РНК и белка мишени у людей и животных, так как можно предположить, что чем шире экспрессия мишени, тем выше риск побочных эффектов, возникающих в результате введения лекарственного средства, которое системно модулирует целевую активность [424]. Исследования с соединениями, селективно модулирующими мишень, если таковые имеются, могут дополнительно помочь подтвердить проблемы безопасности, связанные с мишенью, наблюдаемые с использованием генетических подходов. Кроме того, неактивные энантиомеры могут быть мощным средством контроля для исследования безопасности, связанной с мишенью, поскольку токсичность, связанная с

мишенью, должна быть минимальной, а другие токсические эффекты, связанные со структурой соединений, должны быть сопоставимы с эффектами активного изомера [427; 459].

На потенциал инновационной и перспективной молекулярной мишени при разработке ЛС влияют аспекты, связанные с технической осуществимостью проекта, такие как «терапевтическая пригодность» (от англ. “druggability”) и «анализируемость» мишени (от англ. “assayability”), а также доступность биомаркеров, которые необходимо учитывать на раннем этапе при планировании проекта. Терапевтически пригодная мишень должна быть доступна молекуле ЛС и производить измеримую биологическую реакцию как следствие взаимодействия с молекулой [212; 282]. Ценной информацией является первичная последовательность белка и его трехмерная структура, полученная кристаллографически, криоэлектронной микроскопией или вычислительным конформационным анализом. Модели мишени и/или близких гомологов могут использоваться для выявления пригодных для ЛС центров связывания и впоследствии облегчить структурно-ориентированный дизайн и исследования взаимодействия лигандов с мишенью [295; 392; 432].

Необходимо рассмотреть доступные методы анализа функциональной активности мишени. В целом, большинство используемых методик основаны либо на цельноклеточных системах, либо на очищенных белках-мишенях, непосредственно измеряющих влияние разрабатываемых ЛС. Независимо от формата анализа или видового происхождения мишени, при разработке скрининговых методик [406; 431] необходимо учитывать несколько факторов, например, включение известных эндогенных лигандов, кофакторов или белков-партнеров мишени для обеспечения адекватности условий анализа реальной клеточной среде; воспроизводимость анализа между отдельными планшетами и днями скрининга в течение всего проекта; выбор типоразмера планшетов, реагентов и объема проб для минимизации затрат на анализ; качество анализа, определяемое Z'-фактором, который основан на соотношении и дисперсии сигналов и высоких и низких контролей [217]; совместимости анализа с концентрацией растворителя, используемой для пробоподготовки соединений; наличии вторичных и подтверждающих методов валидации выявленных активных соединений после установления надежных кривых концентрация-эффект в первичном анализе.

Биомаркеры позволяют провести прямую корреляцию между модуляцией мишени и эффективностью потенциального ЛС, обеспечивая суррогатные критерии для значимых конечных точек, применимых в клинических испытаниях, особенно на ранних стадиях разработки. В этом отношении раннее выявление механистических биомаркеров, способных подтвердить механизм действия молекулы, может иметь решающее значение. Биомаркер, который подтверждает модуляцию/вовлечение мишени или мишень-зависимого пути, но без какой-либо терапевтической пользы, ставит под сомнение обоснованность мишени/пути в

качестве нового подхода к лечению [106]. Ключевым шагом является идентификация биомаркеров, которые надежно отражают те же физиологические результаты, индуцированные целевой модуляцией в доклинических моделях, что и у людей, тем самым повышая транслируемость исследований с животного на человека [210].

Необходимо учитывать стратегические аспекты оценки мишени, которые важны для потенциальных инвесторов и отраслевых партнеров, включая ландшафт интеллектуальной собственности, связанной с мишенью, степень неудовлетворенных медицинских потребностей в отношении заболеваний, при которых мишень актуальна, и наличие конкурентов, которые могут влияют на коммерческий потенциал препарата. Оценка существующего ландшафта интеллектуальной собственности имеет важное значение. Анализ свободы действий исследует способность разрабатывать и коммерциализировать новый (основанный на мишени) подход к лечению [460]. Можно рассмотреть несколько вариантов, если свобода действий не может быть установлена из-за существующих патентов, которые представляют собой потенциальное препятствие для коммерциализации. Эти варианты включают поиск альтернативных способов разработки продукта, выходящего за рамки блокирующего патента; получение лицензии по блокирующему патенту; противодействие/признание недействительными блокирующих патентов; и корректировка сроков проекта на основе даты истечения срока действия блокирующего патента или с учетом территориальных ограничений блокирующего патента [345; 389]

Термин «нершенная фармакотерапевтическая проблема» (англ. «unmet medical need») является широко используемым в области здравоохранения, нет общепринятого определения и метода для оценки и сравнения медицинских потребностей, удовлетворяемых различными проектами по разработке ЛС. Одним из способов исследования неудовлетворенных медицинских потребностей является четкое определение области клинического интереса в начале проекта. Масштаб неудовлетворенных медицинских потребностей может быть оценен путем определения смертности, симптомов и бремени болезни, побочных эффектов, неудобств лечения, восприятия пациентов и времени до выздоровления или ремиссии, и т.д. [307]. То, как новый подход к лечению отличается от существующих ЛС, часто упускается из виду в академических проектах. Однако для того, чтобы проект по разработке ЛС для мишени был привлекательным для инвесторов или отраслевых партнеров, конкурентное преимущество должно быть объективно оценено. Требуется предоставить информацию о том, как потенциальное новое лекарственное средство, модулирующее мишень, может быть дифференцировано от существующих или будущих конкурентов и какой тип данных должен быть получен для наилучшей демонстрации его ценности. Дифференциация может быть проведена с точки зрения специфичности, сниженной или более узкой токсичности или более широкой и большей эффективности, и должна

также учитывать удовлетворенность пациентов и врачей существующими терапевтическими средствами, а также потенциальными методами лечения, которые разрабатываются другими компаниями. Для определения жизнеспособности возможных стратегий дифференциации для конкуренции на рынке в оценку конкурентного ландшафта может быть включен SWOT-анализ, который выявляет и оценивает сильные и слабые стороны, возможности и угрозы, связанные с определенным продуктом [384].

1.4. Хемоинформатика в разработке лекарственных средств

Существует несколько определений хемоинформатики [247; 367; 375; 454]. Термин «хемоинформатика» был предложен в 1998 году Фрэнком Брауном как «смешение информационных ресурсов для преобразования данных в информацию и информации в знания с целью ускорения принятия решений в области идентификации и оптимизации лекарственных препаратов» [367]. На научной конференции в 1999 году Грег Пэрис дал более широкое определение: «Хемоинформатика – это общий термин, охватывающий дизайн, создание, организацию, управление, поиск, анализ, распространение, визуализацию и использование химической информации» [27]. Gasteiger и Funatsu дали еще более широкое определение: «Хемоинформатика – это применение методов информатики для решения химических проблем» [308]. Это последнее определение связано с терминами, предложенными ранее: «химическая информатика», определяемая как «применение информационных технологий в химии», и «хеометрия», обычно понимаемая как количественный анализ химических данных с использованием математических и статистических методов [8].

Методы хемоинформатики находят широкое применение практически на всех этапах разработки ЛС, включая выбор биологических мишеней, создание виртуальных библиотек выбор соединений, виртуальный высокопроизводительный скрининг, интеллектуальный анализ данных, QSAR и прогнозирование ADMET характеристик. Обзор основных хемоинформатических методов, включая создание, кодирование, хранение и поиск химической информации в базах данных и ее анализ обобщен в работе Engel [71]. К основополагающим работам в данной области следует отнести книги 2018 г. Engel и Gasteiger «Chemoinformatics: Basic Concepts and Methods» [299] и «Applied Chemoinformatics: Achievements and Future Opportunities» [298]. Duffy и др. [286] представили подробный анализ роли, которую методы хемоинформатики играют в идентификации соединений-хитов и их последующей оптимизации. В частности, авторы описали применение вычислительных методов, таких как дизайн библиотек, расчет свойств и анализ скаффолдов на ранних стадиях разработки ЛС. Обзор достижений

хемоинформатики в разработке ЛС и перспектив ее развития дан в работе Martinez-Mayorga [195].

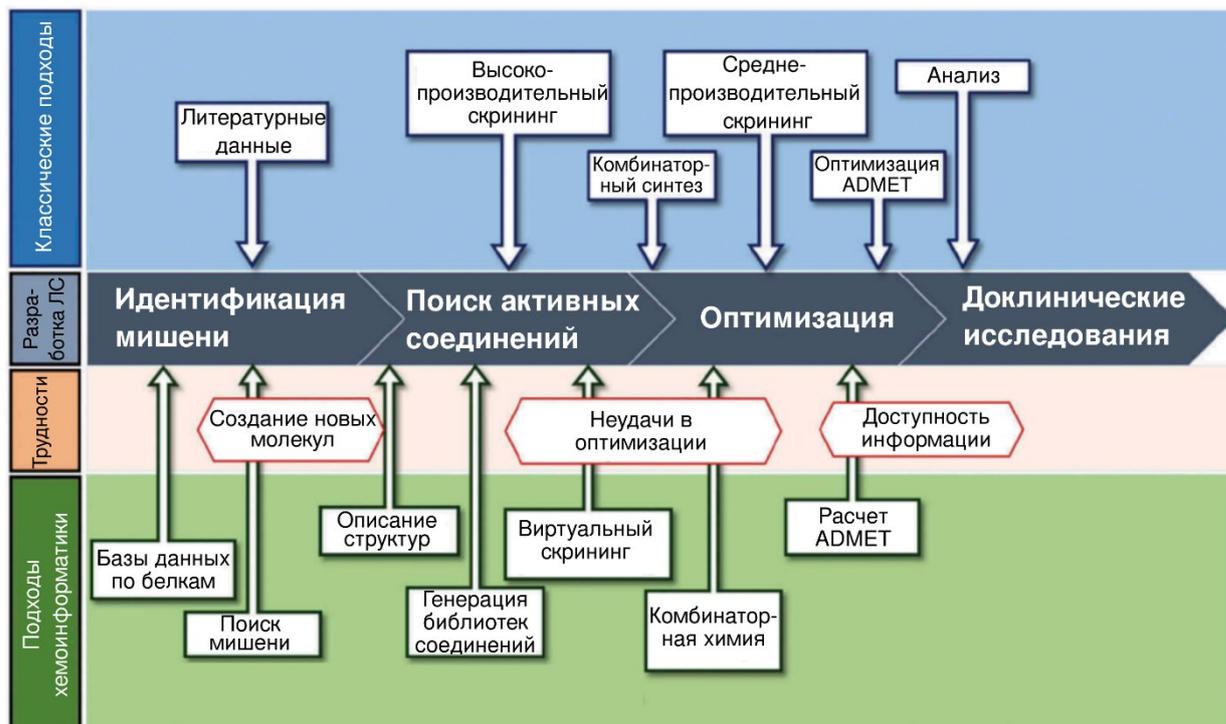


Рисунок 2 – Применение вычислительных методов и информационных технологий на разных этапах разработки ЛС (адаптировано из [360]).

1.4.1. Оценка лекарственного подобия

В течение последних десятилетий отмечается снижение доли клинических испытаний, заканчивающихся успешным выводением лекарственных кандидатов на рынок [351]. Ряд выдвинутых объяснений снижения результативности фармацевтической исследований включают неоптимальные физико-химические свойства фармакологически активных соединений и препаратов для клинических исследований, определяющие их неоптимальные фармакокинетические свойства (всасывание, распределение, биотрансформацию, выведение и токсичность, ADMET) и, следовательно, ограничивающие их терапевтическую ценность [211; 401]. Для рационализации процесса принятия решений и повышения вероятности быстрого обнаружения и разработки кандидатов для доклинических исследований были разработаны различные многопараметрические критерии лекарственного подобия, также называемые правилами. Первыми и наиболее классическими являются 5 правил, сформулированных в работе Lipinski 1997 г. (Ro5, [302]). Именно они впервые подчеркнули важность различий между биологически активным веществом и потенциальным ЛС.

Очевидно, что правила Lipinski не могут быть универсальными для всех лекарственных соединений. Keller и соавт. [350] отмечают следующие основные ограничения Ro5: во-первых,

они основаны и направлены на выявление перорально биодоступных соединений; во-вторых, применимы только к соединениям, проникающим через мембраны пассивно; и в-третьих, одно только соответствие соединения Ro5 не является гарантией его «лекарственной пригодности». Ряд эффективных и широко применяемых лекарственных средств не отвечают правилам Липинского, например, метформин. Следовательно, Ro5 следует использовать, осознавая их ограниченность, и при необходимости привлекать более точные характеристики лигандной эффективности (LE, от англ. «*ligand efficiency*»). Также понятно, что Ro5 Липинского, повышающие вероятность успешной разработки низкомолекулярных перорально биодоступных ЛС, обычно не распространяется на лекарства, полученные из крупных соединений, таких как макроциклы, пептиды, или те, которые действуют на сложные неклассические мишени, такие как белок-белковые взаимодействия.

Для преодоления вышеизложенных ограничений был предложен ряд других наборов правил. Расширенные Ro5 (eRo5) и «за пределами» Ro5 (bRo5) [100], связывание лиганда термодинамические и кинетические профили [385], а в последнее время – использование индексов LE, также известных как метрики LE [113].

Таблица 2 – Основные правила лекарственного подобия для пероральных ЛС

Правила	Мол. масса, Да	cLogP или cLogD	Доноры водородных связей, шт.	Акцепторы водородных связей, шт.	Площадь полярной поверхности, Å ²
Ro5 Липинского	≤500	≤5	≤5	≤10	
Расширенные Ro5 ¹			≤12		≤140
«За пределами» Ro5 ²	>500	<0 или >7,5	>5	>10	>200
Pfizer [395]		>3			<75
GSK [82]	<400	<4			
«Золотой треугольник» [348]	200–500	2–5			
Ro4 [451]	≤400	≤4	≤4	≤8	≤120
Ro3 ³ [313]	<300	≤3	≤3	≤3	

¹ Дополнительно 10 связей, допускающих свободное вращение.

² Дополнительно >20 связей, допускающих свободное вращение.

³ Дополнительно 3 связи, допускающие свободное вращение.

Необходимо отметить, что любые правила лекарственного подобия являются в известной мере условными ориентирами и не должны трактоваться как догмы. Они формулируются для решения конкретных задач и неизбежно субъективны, т.к. основаны на химическом пространстве известных ЛС. Их главное предназначение – отсеивать на ранних этапах соединения, с высокой вероятностью не подходящих для разработки клинических кандидатов, главное преимущество –

простота расчета и возможность обработки больших массивов химических структур с низкой затратой машинного времени.

1.4.2. Роль и применение анализа скаффолдов соединений

Методы анализа скаффолдов были предложены и активно используются как для оптимизации процесса выбора соединений для скрининговых библиотек, так и для валидации впервые выявленных активных соединений. Анализ скаффолдов имеет важное значение для оптимизации процессов идентификации активных соединений. Скаффолд часто рассматривают как наименьшую базовую циклическую подструктуру молекулы, которая является общей для ряда соединений. Для оценки синтетической и структурной сложности соединений используются различные метрики [51]. Важным фактором при составлении библиотек для скрининга является обеспечение «избыточности» скаффолдов для повышения вероятности обнаружения активных соединений. В последнее время разработано много системных подходов кластеризации соединений по общим компонентам подструктуры. Эти методы основаны на систематической идентификации кольцевых систем в химических структурах с помощью алгоритмов [196; 213]. Сочетание анализа структурного сходства молекул и их скаффолдов может ускорить и оптимизировать выбор соединений, повышая вероятность успеха скрининга [286; 330].

При реализации структурно-ориентированных проектов поиска ЛС, количественные результаты расчетов докинга имеют большие погрешности, тогда как группировка соединений по химическому сходству и сходству скаффолдов обеспечивает некоторую дополнительную уверенность в том, что, если скаффолд сам по себе активен, один из его представителей будет обнаружен во время экспериментального скрининга.

Общий размер и структурное разнообразие библиотеки соединений для скрининга могут стать неподходящими или слишком дорогими, поскольку существуют, вероятно, миллионы возможных скаффолдов. В настоящее время эффективный подход к формированию библиотек соединений включает необходимость сбалансировать количество скаффолдов и их представителей для поддержания избыточности основных каркасов [138; 158]. Этот метод составления библиотек используют преимущества принципа, согласно которому любой активный кластер (т.е. серия подобных соединений), как ожидается, будет состоять приблизительно из 20-30% активных соединений на основе принципа свойства подобия [126]. Следовательно, чтобы идентифицировать серию как возможно активную, необходимо и достаточно подтвердить активность хотя бы одного соединения. Таким образом, библиотеки можно составлять с учетом множества аналогов, сохраняя при этом общий размер библиотеки пригодным для экспериментальной проверки.

Единичные представители каркаса или кластера, иначе известные как «singletons», потенциально являются единственными отправными точками для новой серии, и поэтому их включение в библиотеку может значительно увеличить разнообразие библиотеки. Включение таких одноэлементных кластеров может улучшить производительность библиотеки, хотя это улучшение должно быть сбалансировано с необходимостью контролировать ее общий размер.

1.5. Мультитаргетные и плеiotропные соединения

1.5.1. Феномен мультитаргетности

За последние десятилетия достижения в области молекулярной биологии существенно продвинули наше понимание патогенеза многих заболеваний. Параллельно шел переход от фенотипической разработки лекарств к сегодняшнему редукционистскому подходу, сосредоточенному на отдельных молекулярных мишенях. Объектами исследования и первичного фармакологического воздействия вместо животных моделей стали изолированные белки и клеточные модели. Помимо очевидных преимуществ, таких как возможность рациональной структурно-ориентированной оптимизации и высокой производительности скрининга, эти изменения имели и негативные последствия, в первую очередь, выдвинули на первый план проблемы стратегически правильного выбора мишеней и транслируемости полученных данных на человека как целостную и сложную систему.

В этом контексте разработка ЛС стала направлена, главным образом, на открытие малых молекул, способных модулировать биологическую функцию одного белка-мишени, чего, как предполагается, будет достаточно для эффективного лечения заболевания. Прилагаются большие усилия для достижения селективности в отношении данной конкретной мишени для минимизации нежелательных лекарственных реакций. Действительно, в настоящее время доступно много лигандов, обладающих выдающейся селективностью *in vitro*. Эта парадигма привела к открытию многих современных ЛС и, вероятно, останется актуальной еще долгие годы. Однако следует отметить, что высокоселективный лиганд не всегда становится клинически эффективным препаратом. Это может быть связано с тем, что лиганд не распознает мишень в условиях *in vivo*, не достигает места действия либо взаимодействие с соответствующей мишенью не оказывает воздействия, достаточного для эффективной коррекции патогенетических нарушений. Причины последнего могут заключаться как в многофакторной природе многих заболеваний, так и в том, что эффект соединения может компенсироваться изменением экспрессии мишени или включением альтернативных метаболических и сигнальных путей [135].

С другой стороны, специфичность (селективность) малых молекул является одной из самых больших трудностей в процессе оптимизации соединений-лидеров в клинические кандидаты. Как обсуждалось выше, это необходимо как для реализации выбранного механизма действия, так и по соображениям токсичности. Однако реальность такова, что абсолютная специфичность практически не может быть достигнута, учитывая огромный размер протеома человека. Установлено, что одобренные препараты взаимодействуют в среднем с 3-6 мишенями, а 50% всех ЛС проявляют активность в отношении более чем пяти мишеней [271; 328; 347].

1.5.2. Плейотропность антидиабетических соединений

Как показано выше, несмотря на наличие большого арсенала антидиабетических средств, монотерапия способна обеспечить удовлетворительный контроль уровня глюкозы крови лишь в начальной стадии заболевания. Типичной ситуацией с фармакологическим лечением СД2 заключается в поэтапном добавлении ЛС с различными механизмами действия [221], что обусловлено необходимостью коррекции сразу нескольких метаболических эффектов. Эффективность комбинированной терапии, как и любого полифармакологического подхода, ограничивается рядом побочных эффектов и нежелательных взаимодействий между ЛС, а также низкой комплаентностью пациентов. Альтернативной стратегией может стать использование соединений, которые модулируют несколько релевантных мишеней или несколько патогенетических звеньев одновременно, обеспечивая плейотропный фармакологический эффект.

В качестве примера можно привести метформин, препарат первой линии фармакотерапии СД2. Механизм его действия до сих пор является объектом изучения [76]. Установлено, что одной из главных мишеней метформина служит I комплекс цепи переноса электронов митохондрий, что ограничивает окислительное фосфорилирование и образование АТФ. В свою очередь, увеличение соотношения АМФ/АТФ активирует АМФ-активируемую киназу. Помимо снижения уровня глюкозы крови, это оказывает инсулин-сенситизирующее действие на многие ткани, включая печень, скелетные мышцы, эндотелий, жировую ткань и яичники. Наиболее важным аспектом действия метформина считается подавление глюконеогенеза печени, что связывается разными исследователями с активацией АМПК, ингибированием глицерол-3-фосфатдегидрогеназы или протеинкиназы А через истощение цАМФ [93]. Кроме того, метформин влияет на метаболизм желчных кислот, стимулирует секрецию инкретинов, снижает аппетит, подавляет активность RAGE/NF κ B [131], стимулирует фактор GDF15 [310]. Показано, что метформин изменяет состав и метаболическую активность микробиоты кишечника, что само по себе улучшает толерантность к глюкозе [119; 129], вероятно, посредством снижения

образования бактериальных лигандов TLR4 (коротокоцепочечных жирных кислот, ЛПС) и нормализации иммунометаболизма [76; 130]. К сожалению, монотерапия метформином эффективна только в ограниченном периоде времени и имеет несколько побочных эффектов (лактоацидоз, непереносимость), которые снижают приверженность пациентов [264].

Неэффективность монотерапии и ограничения существующих режимов комбинированной терапии СД2 способствовал разработке полифармакологических подходов, многочисленные примеры которых изложены в обзоре [453]. Полифармакологию можно определить, как разработку или использование фармакологических средств, которые воздействуют на несколько молекулярных мишеней или множество биохимических путей [160].

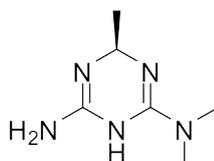


Рисунок 3 – Структурная формула имеглимина.

Одним из наиболее изученных и успешных примеров реализации такого подхода стал имеглимин, первый представитель глиминов – нового класса пероральных антигипергликемических средств. Уникальность этого соединения заключается в его способности воздействовать на три ключевых в патофизиологии СД2 органа, печень, мышцы и поджелудочную железу. Механизм действия имеглимина напоминает метформин и связан с модуляцией биоэнергетики митохондрий [373], что стимулирует глюкозо-стимулированную секрецию инсулина посредством активации TRPM2 [231] и улучшает чувствительность к инсулину при одновременном ингибировании печеночного глюконеогенеза [449]. Кроме того, соединение защищает β -клетки поджелудочной железы от апоптоза и окислительного повреждения [105]. В клинических испытаниях 2-ой фазы имеглимин показал эффективность, сравнимую с метформином или ситаглиптином [399] и успешно прошел испытания 3-ей фазы [352].

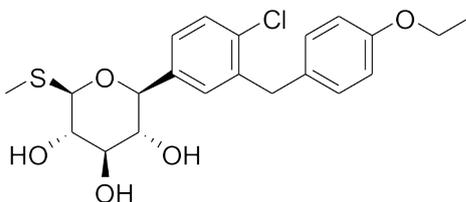


Рисунок 4 – Структурная формула сотаглифлозина.

Сотаглифлозин действует путем ингибирования как SGLT1, так и SGLT2 и, таким образом, уменьшает всасывание глюкозы в кишечнике, а также реабсорбцию глюкозы почками [239]. Этот препарат предназначен для лечения как сахарного диабета 1 типа (СД1), так и СД2

либо в качестве монотерапии, либо в качестве дополнительной терапии к другим противодиабетическим средствам [438]. Несмотря на то, что использование препарата связано с повышенным риском диабетического кетоацидоза, диареи и инфекций мочевыводящих путей [291], двойное действие дает ему преимущество перед селективными ингибиторами SGLT2. Сотаглифлозин завершил 3-ю фазу клинических испытаний для лечения СД1 [325] и показал снижение сердечно-сосудистого риска в 3-ей фазе испытаний для лечения СД2 [437]. Европейское агентство по лекарственным средствам (EMA) недавно объявило об одобрении сотаглифлозина в Европейском союзе в качестве дополнения к инсулинотерапии для больных сахарным диабетом 1-ого типа.

1.6. Заключение

Сахарный диабет 2-ого типа (СД2) является глобальной эпидемией, которая представляет собой серьезную проблему для систем здравоохранения. Улучшение метаболического контроля для приближения к нормальной гликемии (где это практически осуществимо) значительно улучшает долгосрочные прогнозы и оправдывает раннее, эффективное, устойчивое и заботящееся о безопасности вмешательство. Улучшения в понимании сложного патогенеза СД2 легли в основу разработки сахароснижающих терапий с дополнительными механизмами действия, которые расширили варианты лечения и облегчили индивидуализированные стратегии управления. За последнее десятилетие было лицензировано несколько новых классов сахароснижающих агентов, включая агонисты глюкагоноподобных пептидных рецепторов 1 (GLP-1R), ингибиторы дипептидилпептидазы 4 (DPP-4) и ингибиторы котранспортера натрия / глюкозы 2 (SGLT-2). Эти агенты могут использоваться по отдельности или в сочетании с хорошо зарекомендовавшими себя методами лечения, такими как бигуаниды, сульфонилмочевины и тиазолидиндионы. В настоящее время доступно множество различных методов лечения, снижающих уровень глюкозы, для решения различных аспектов патогенеза СД2 посредством различных действий, и эти методы лечения различаются по эффективности, удобству, побочным эффектами стоимости. Потенциальная «ценность» терапии включает в себя больше, чем анализ затрат и выгод, и основана на комплексе характеристик, который учитывает долгосрочную безопасность, переносимость, риск гипогликемии и увеличения веса и пригодность при наличии сопутствующих заболеваний и других лекарств. Индивидуализированная терапия должна быть адаптирована к потребностям и предпочтениям пациентов, с учетом их обстоятельств, понимания и приверженности.

Ингибиторы DPP-4, GLP-1RA и SGLT2 имеют низкий риск гипогликемии (за исключением случаев, когда они сочетаются с инсулином или сульфонилмочевинной) и связаны

либо с потерей веса, либо с нейтральностью веса, но они дороже, чем более старые агенты, такие как сульфонилмочевина и меглитиниды. Данные, касающиеся профилей безопасности многих из этих новых агентов, обнадеживают и свидетельствуют об их ценности в задаче обеспечения раннего, эффективного и устойчивого гликемического контроля при СД2. Хотя метформин остается предпочтительной начальной фармакотерапией (при переносимости), для оценки целей лечения и их достижения наиболее безопасным способом требуется индивидуальный подход.

СД2 характеризуется постепенным снижением функции β -клеток поджелудочной железы, что определяет прогрессирующее течение болезни. В то время как недостаточность β -клеток является важным фактором гипергликемии, хроническая гипергликемия сама по себе также пагубно сказывается на функции β -клеток, вероятно, в силу длительного секреторного стресса на β -клетки, а также за счет прямых глюкозотоксических механизмов, которые полностью не определены. В течение многих лет проводились исследования в поисках методов лечения гипергликемии, которые сохраняли бы долгосрочную функцию β -клеток при СД2, и этот поиск все еще продолжается. Текущие стратегии направлены на улучшение гликемического контроля либо за счет стимуляции секреции эндогенного инсулина, например, сульфонилмочевины, либо за счет механизмов, которые могут косвенно воздействовать на β -клетки, например, обеспечение покоя β -клеток посредством лечения инсулином. Хотя общий долгосрочный успех ограничен доступными в настоящее время вмешательствами, что стратегии, которые вызывают покой β -клеток, имеют значительный потенциал для сохранения долгосрочной функции β -клеток. Эти выводы основаны на исследованиях с использованием островков человека, а также клинических исследованиях с использованием интенсивной инсулиновой терапии, тиазолидиндионов, бариатрической хирургии, агонистов рецепторов глюкагоноподобного пептида GLP-1 короткого действия и многообещающего нового класса лекарств от диабета. ингибиторы связанного натрий-глюкозного транспортера SGLT-2. Тем не менее, отсутствие долгосрочных клинических исследований, посвященных функции β -клеток для новых глюкозоснижающих средств, а также широко используемых комбинированных терапий, не позволяет сделать однозначный вывод.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Соединения и реактивы

Для исследований использованы реактивы: РТР1В SRP0215 (Sigma, США), 4-нитрофенилфосфата динатриевой соли гексагидрат SRE0026 (Sigma, США), гидроокись калия (ООО АГАТМЕД, Россия), глюкокиназа печени человеческая рекомбинантная SRP6045 (Sigma, США), кальций хлористый 2-водный, D-глюкоза (безводная), калий хлористый, магний хлористый 6-водный, магния сульфат, калий фосфорнокислый однозамещённый, калий фосфорнокислый двузамещённый, натрий хлористый, натрий фосфорнокислый двузамещённый, натрия хлорид 0,9 % (Эском, Россия), хлорид железа (III) (ч., «Мосреактив» Россия); сульфат железа (Диа-М, Россия); трис-гидрохлорид, трис(гидроксиметил)аминометан (Serva Feinbiochemica, Германия), стандарт-титр соляной кислоты 0,1 Н (ООО АО РЕАХИМ, Россия), серная кислота 95–98 % (ООО АО РЕАХИМ, Россия), этанол 96 % (Россия), диметилсульфоксид (ДМСО) (Fisher Scientific, США), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (MP Biomedicals, Inc., Франция), таблетки фосфатно-солевого буфера pH 7,4 (ООО «ПанЭко», Россия), HEPES (GERBU, Германия), Tween 20 (Fisher Scientific, США), Tween 80 (Fisher Scientific, США), АДФ (Sigma, США), люминол (Serva, Германия), соли Хенкса (HBSS), не содержащие Ca, Mg, бикарбонат Na и фенол. кр. (Biosera, Франция), пенициллин-стрептомицин 100-х лиофил. (ООО «ПанЭко», Россия), трихлоруксусная кислота (ТХУ) (Fisher Scientific, США), 1,4- дитиотреитол (ДТТ) (Sigma, США), динатриевая соль аденозин-5-трифосфорной кислоты (АТФ) (Sigma, США); натриевая соль β-никотинамидадениндинуклеотид фосфата (Sigma, США), тромбин (Sigma, США), перекись водорода 30% (ООО АО РЕАХИМ, Россия), стрептозотонин (Sigma, США, физиологический раствор (ООО «Мосфарм» Россия), хлоралгидрат (Panreac Química S.L.U., Испания), двухфазный инсулин «ХУМУЛИН М3» (Eli Lilly, Франция), коллаген (Sigma, США), цитрат натрия (ч.д.а., Реахим, Россия), бычий сывороточный альбумин (BSA) фракции V (BioWest, Франция), ЛПС *E. coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, США), раствор МТТ (Sigma, США), Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США), реактив Элмана (дитионитробензойная кислота) (Sigma, США), стерильный раствор Хенкса (ПанЭко, Россия), реактив Грисса (Sigma, США), среда DMEM с глутамином, содержание глюкозы 4,5 г/л («ПанЭко», Россия); сыворотка крови эмбриональная телячья (Biosera, Франция); гентамицин («НПО Микроген», Россия), пептон ферментативный («ДиаМ», Россия), («ПанЭко», Россия), бальзам канадский для микроскопии («Panreac», Испания), зимозан А («Sigma», США), комплемент сухой (НПО «Микроген», Россия), акридиновый оранжевый («ПанЭко», Россия), нитросиний тетразолий-п (хлорид)

(НСТ) >90 % («Sigma», США), натрия хлорид, раствор для инфузий 0,9 % (ОАО НПК «Эском», Россия), среда RPMI 1640 («ПанЭко», Россия).

Наборы: набор для измерения активности киназ GSK3 β и AMPK $\alpha_1\beta_1\gamma_1$ с детекцией ADP-Glo™ (Promega, США) V9371 и V9021, набор для определения концентрации общего белка в моче и ликворе методом с пирогаллоловым красным (кат. В 06.03, «Витал Девелопмент Корпорэйшн», Россия); набор для определения концентрации глюкозы в плазме крови глюкозооксидазным методом («Фармацевтика и клиническая диагностика», Россия), набор для количественного определения инсулина в сыворотке и плазме крови Human Insulin ELISA Kit, набор для определения фактора некроза опухолей Rat TNF- α ELISA Kit (Cloud-Clone Corp., Китай) набор для определения фактора некроза опухолей Mice TNF- α ELISA Kit (BD Biosciences Pharmigen, США), набор реагентов для определения концентрации триглицеридов в сыворотке и плазме крови Triaglyceroly Liquid 250S (Erba Lachema, Чехия).

Красители: краситель Азур-Эозин по Романовскому Минимед (ООО «МиниМед», Россия), фиксатор-краситель по Май-Грюнвальду Минимед (ООО «МиниМед», Россия).

В качестве препаратов сравнения были использованы: SB216763 (Sigma, США), вилдаглиптин (Novartis, Россия), метформин (ООО Озон, Россия), вилдаглиптин (Новартис, Россия); ацетилсалициловая кислота (Sigma, США); кверцетин (Диа-М, Россия); дексаметазон (Sigma, США); целекоксиб (ВЕРТЕКС АО, Россия).

Объектами исследования были 2268 соединений, синтезированных в следующих учреждениях:

1. Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза (г. Москва) под руководством к.х.н. Н.А. Лозинской, 42 соединения.
2. Научно-исследовательский институт физической и органической химии Южного федерального университета (г. Ростов-на-Дону), ведущим научным сотрудником, к.х.н. В.А. Анисимовой, главным научным сотрудником, д.х.н. А.С. Морковником, научным сотрудником, к.х.н. О.Н. Жуковской под руководством академика РАН В.И. Минкина, 1525 соединений.
3. Научно-образовательный центр фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета (г. Казань) под руководством д.х.н., профессора Ю.Г. Штырлина, 54 соединения.
4. Уральский федеральный университет им. Первого президента РФ Б.Н. Ельцина (г. Екатеринбург), под руководством директора химико-технологического института УрФУ, члена-корреспондента РАН, проф., д.х.н. В.Л. Русинов, 113 соединений.

5. Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского (г. Екатеринбург) на кафедре органической и биомолекулярной химии, под руководством доцента, к.х.н. Г.Л. Русинова, 117 соединений.
6. Самарский государственный технический университет (г. Самара), к.х.н. М.В. Леоновой под руководством Ю.Н. Климочкина, д.х.н., профессора, заведующего кафедрой, проректора по научной работе, 151 соединение.
7. Башкирский государственный медицинский университет (г. Уфа) под руководством заведующего кафедрой фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии, д.фарм.н., профессора, Ф.А. Халиуллина, 151 соединение.
8. Волгоградский государственный технический университет, кафедра технологии органического и нефтехимического синтеза (г. Волгоград) к.х.н. В. С. Лобасенко и к.х.н. Т.К. Корчагиной под руководством заведующего кафедрой, д.х.н., профессора Ю.В. Попова, 67 соединений.
9. Волгоградский государственный медицинский университет, кафедра фармацевтической и токсикологической химии (г. Волгоград) под руководством заведующего кафедрой д.х.н., профессора А.А. Озерова, 48 соединений.

2.2. Животные

В исследовании использовались следующие виды животных: мыши C57BL/6J, самцы, масса 22-25 г, полученные из питомника ООО «НИЦ БМТ», ветеринарное свидетельство № 1376917942 от 24.01.19 г. – 150 особей; мыши белые беспородные, обоего пола, масса 22-25 г, полученные из питомника ООО «НИЦ БМТ», ветеринарное свидетельство № 0725507 от 01.09.17 г. – 200 особей; крысы нелинейные, самцы, масса 230-250 г, полученные из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, ветеринарное свидетельство № 860665249 от 01.10.18 г. – 180 особей; кролики породы Шиншилла, самцы, масса 3,3-3,6 кг, полученные из питомника ООО «НИЦ БМТ» (Москва) – 5 особей. В помещениях для содержания животных НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России были обеспечены стандартные условия в соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 №51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» на специальном гигиеническом наполнителе древесном (ООО «Производственный комплекс «ГлавРезерв»). Температурный режим помещения вивария поддерживался от +18 до +22 °С. Освещение вивария совмещенное (естественное и люминесцентное). В помещении вивария

проводилась бактерицидная обработка стационарным настенным облучателем-рециркулятором. Животные имели круглосуточный свободный доступ к поилкам и получали воду, соответствующую ГОСТ 2874-82 «Вода питьевая» и СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода, отстоянная в течение 1 суток вода из централизованных систем питьевого водоснабжения». Замена воды в поилках производилась ежедневно. После прибытия в виварий и до начала исследований период акклиматизации составлял не менее 14 дней. На момент выполнения исследований животные были здоровыми, без изменений поведения, режима сна и бодрствования, аппетита. Исследование было одобрено Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер IRB0005839 IORG0004900 (OHRP), протоколы № 2090-2016 от 23 декабря 2016 г. и № 2021/042 от 29 апреля 2021 года. Эвтаназию животных проводили согласно требованиям, изложенным в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1997).

2.3. Оборудование и программное обеспечение

Термошейкер для планшетов PST-60HL (Biosan, Латвия), рН-метр рН213 (HANNA Instrumento, Германия), магнитная мешалка MSH-300 (Biosan, Латвия), весы лабораторные Adventurer AR2140 (OHAUS Europe, Швейцария), холодильник-морозильник ХМ-6021-000 (ЗАО «Атлант», Беларусь), Камера для счета форменных элементов крови (камера Горяева), 4-х сет., исп. 3 (ООО «МиниМед», Россия), весы Scout Pro SPU601 (OHAUS, США), центрифуга MultiCentrifuge CM-6M (Elmi, Латвия), микроцентрифуга Minispin (Eppendorf, Германия), вортекс Elmi V-3 (Elmi, Латвия), микропланшетный ридер Infinite M200 (Tecan, Швейцария), гомогенизатор Ultra Turrax T10 (Ikawerk, Janke and Kunkel Inc., Германия), термостат воздушный BINDER BD 115 (115 л) (Германия), металлический гастральный зонд (ОАО «МИЗ-Ворсма», Россия), ультразвуковой доплерограф («Минимакс-Допплер-К» Санкт-Петербург), биохимический анализатор Biosen C_Line (EKF Diagnostics, Германия), ультразвуковая ванна 4,0 л (Сапфир, Россия), центрифуга SIGMA 2-16KL универсальная с охлаждением, до 15 300 об./мин (Sigma Laborzentrifugen, Германия); глюкометр «Глюкокард» (ООО «АРКРЭЙ», Россия); тест-полоски для глюкометра «Глюкокард Сигма-Мини» (ООО «АРКРЭЙ», Россия); ветеринарный тонометр для измерения ВГД (Tonovet, Финляндия); агрегометр Viola 220 LA (ООО НФП «Биола», Россия); двухканальный анализатор агрегации тромбоцитов ChronoLog-700 Lumi-Aggregomete (Chronolog, США), кюветы стеклянные (Chronolog, США), планшет Nunc 96 Flat Bottom White (Nunc 267350 U96 Microwell, Дания), 96-луночные прозрачные планшеты (SPL Life Sciences Co., Ltd., Корея), планшет 96-луночный с плоским дном черный (Greiner #655076, Австрия), планшет 96-луночный с плоским дном UV-прозрачный (Corning #3635, Австрия);

чашки Петри («Минимед», Россия); ламинарный шкаф SafeFAST Elite – S/D, 2-й класс защиты (Faster, Италия); микроскоп медицинский «МИКМЕД-6» (люминесцентный) с цифровой камерой высокого разрешения (АО «ЛОМО», Россия); CO₂-инкубатор (Binder, Германия); установка Open-field 47432 (Ugo Basile, Италия).

Для исследований использовано следующее программное обеспечение: пакет ChemOffice 8.0 (CambridgeSoft, США), программное обеспечение i-control™ для микропланшетных ридеров Tecan (Tecan, Швейцария), DataWarrior 5.2.1 (Idorsia, Inc., США), химический редактор MarvinSketch 17.1.23 (MarvinSketch, США), веб-сервсы и базы данных Open Targets [144; 146; 145], TargetMine [194; 240], ChEMBL, Bioactivity-explorer [36], Aggregator Advisor (<http://advisor.bkslab.org/search/>) [23], Hit Dexter 2.0 (<https://nerdd.univie.ac.at/hitdexter/>) [98].

Статистическую обработку данных проводили с использованием программных пакетов Prism 8.0 (GraphPad Inc., США), Microsoft Excel 2016 (Microsoft Office, США).

2.4. Вычислительные методы

2.4.1. Подготовка структур соединений

Информация о структуре исследуемых соединений экспортировалась из исходных .cdx или графических файлов в виде SMILES-кодов с учетом стереохимии и вносилась в базу данных OSIRIS DataWarrior (Idorsia, Inc.) [123] с использованием внутреннего формата .dwar при визуальном контроле валентности и зарядов атомов. Соединениям присваивались идентификаторы согласно лабораторным шифрам.

2.4.2. Расчетные характеристики соединений

Для всех исследуемых соединений с использованием внутренних средств DataWarrior выполнены расчеты физико-химических свойств, лекарственного подобия и вероятность проявления некоторых видов специфической токсичности. Были определены величины молекулярной массы, показателя липофильности cLogP, количества доноров и акцепторов водородных связей. Оценка риска проявления мутагенных, канцерогенных, раздражающих свойств и репродуктивной токсичности DataWarrior основана на подструктурном анализе и выявлении фрагментов, известных как маркеры соответствующих видов токсичности.

2.4.3. Расчет молекулярного подобия

В качестве описания молекул при расчете молекулярного подобия использовался дескриптор DataWarrior Flexophore, позволяющий прогнозировать сходство 3D-фармакофоров, т.е. характеристик связывания молекулы с белком. Высокое сходство флексофоров указывает на то, что значительная часть конформеров обеих молекул подобна по форме, размеру, гибкости и точкам фармакофора. В отличие от обычных подходов создания 3D-фармакофоров, основанных на одном энергетически минимизированном фармакофоре, этот дескриптор соответствует целым наборам конформеров, а не сравнивает отдельные конформеры, что приводит к более высокой предсказуемости и учету молекулярной гибкости.

Вычисление дескриптора Flexophore начинается с создания репрезентативного набора до 250 конформеров с использованием алгоритма, основанного на самоорганизации, для построения небольших жестких фрагментов молекулы, которые затем соединяются с учетом вероятных торсионных углов. Затем обнаруживаются и классифицируются атомы молекулы, которые потенциально могут каким-либо образом взаимодействовать с атомами белка. Для описания атомов как точки взаимодействия используется расширенное типирование атомов MM2. В некоторых случаях несколько атомов вносят вклад в одну суммарную точку взаимодействия, например, в ароматических кольцах. Дескриптор флексофора молекулы состоит из сокращенного, но полного графа исходной молекулы, при этом точки взаимодействия считаются узлами графа. Ребро графа между двумя узлами кодируется как гистограмма расстояний между этими узлами по всем конформерам. Поскольку дескриптор Flexophore представляет собой полный граф, каждая комбинация любых двух узлов кодируется и сохраняется как часть дескриптора.

Вычисление сходства между дескрипторами Flexophore двух соединений включает в себя сопоставление максимально возможных подграфов при попытке максимизировать сходство ребер и узлов. Сходства ребер графов вычисляются из перекрытия гистограмм расстояний, а сходства узлов из матрицы сходства точек взаимодействия (расширенный тип атома MM2), которая была первоначально получена из анализа взаимодействия лиганд-белок базы данных PDB.

2.4.4. Расчет фармакокинетических и токсикологических характеристик

Оценка комплекса фармакокинетических и токсикологических характеристик наиболее активных соединений производилась расчетным путем с использованием публично доступных web-сервисов: ADMETlab [14], ADMETlab 2.0 [235], admetSAR 2.0 [15], SwissADME [270],

ProTox-II [161]. Предварительно учитывалась релевантность структуры соединения конкретной предсказательной модели или обучающей выборке (англ. «*applicability domain*»). Для получения наиболее точных результатов использовался консенсус оценок, полученных с использованием разных вычислительных подходов (среднее арифметическое для числовых значений и наиболее частое для категориальных), там, где это было возможно.

2.5. Энзимологические методы

2.5.1. Определение активности глюкокиназы (GCK) *in vitro*

Активность глюкокиназы (ГК человеческой печени рекомбинантная, экспрессированная в *E. coli*, Sigma #SRP6045, США) определяли посредством сопряженной реакции образования глюкозо-6-фосфата с генерацией NADH с помощью глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ *L. mesenteroides*, 550-1100 ЕД/мг, Sigma #G2921, США). Анализ проводили при 37 °С в 96-луночном прозрачном полистироловом планшете с плоским дном (Costar 9018, США) в конечном инкубируемом объеме 210 мкл. Инкубационная смесь содержала: 25 мМ HEPES (рН 7,2), 25 мМ KCl, 5 мМ D-глюкозы, 1 мМ АТФ, 1,8 мМ NAD, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT, тестируемое соединение или 5% ДМСО, 1,8 ЕД/мл Г6ФДГ и 2 мкг/мл GCK. Тестируемые соединения вносили в 5% ДМСО и предварительно инкубировали с GCK в термостатируемом шейкере PST-60HL (Biosan, Латвия) в течение 10 мин. до достижения температурного равновесия, а затем инициировали реакцию введением 10 мкл раствора D-глюкозы [162]. За меру активности GCK принимали повышение оптической плотности при длине волны 340 нм в течение 20 мин. инкубирования после начала реакции. Измерения проводили с помощью микропланшетного ридера Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия). В качестве положительного контроля использовали экспериментальный активатор глюкокиназы PF-04937319 [205].

2.5.2. Определение активности АМФ-активируемой киназы (АМПК) *in vitro*

Реакционная смесь: 50 нг АМПК ($\alpha 1/\beta 1/\gamma 1$), 100 мкМ АТФ, 100 мкМ АМФ, 0,2 мг/мл SAMStide (HMRSAMSGHLVKRR), полученного из мышинной ацетил-коэнзим А карбоксилазы α (аминокислоты 73–85) в конечном объеме 25 мкл. Реакционный буферный раствор: 40 мМ Трис (рН 7,5), 20 мМ MgCl₂, 0,1 мг/мл БСА, 50 мМ ДТТ. Инкубация: 60 мин. при 25 °С. Детекция: измерение люминесценции микропланшетным ридером Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия), время интегрирования 500 мс. Исследуемые вещества вносились в реакционную смесь в реакционном буферном растворе, содержащем 1,25% ДМСО и исследовались в конечной

концентрации 100 мкМ в двух повторениях в соответствии с СОП и руководством производителя реактивов [115] в планшет 96-луночным белом (Thermo Scientific NUNC #165306, США). Активность фермента рассчитывалась по отношению к отрицательному контролю – 100 мкМ АМФ, вызывающему максимальное АМФ-индуцированное активирование согласно предварительным исследованиям. В качестве положительного контроля использовали 2-{[2-(2-бром-4-метилфенокси)этил]тио}-пиримидин (ZLN024) [390].

2.5.3. Определение активности протеинтирозинфосфатазы типа 1В (РТВ1В) *in vitro*

В 96-луночный планшет вносили 10 мкл 10× конечных концентраций (конечная концентрация 100 мкМ) исследуемых веществ или 10% раствор ДМСО (v/v) в 1× РТВ1В-рабочем буфере для контрольных лунок, затем вносили по 50 мкл (60 нг) 1,2 мкг/мл раствора РТВ1В (конечная концентрация 7,9 нМ). Дополнительно в несколько лунок планшета вносили только 100 мкл 1× РТВ1В-рабочего буфера (нулевые пробы). Смесь преинкубировали в термошейкере при 30 °С 15 мин. Затем для инициирования реакции при температуре 30 °С в лунки, уже содержащие смесь РТВ1В/соединения, добавляли 40 мкл 2,5× конечных концентраций (конечная концентрация 2 мМ) субстрата *n*-нитрофенилфосфата (pNPP) [107]. Измеряли начальное значение оптической плотности реакционной смеси при длине волны 405 нм на микропланшетном ридере Infinite M200 PRO (Tecan). Условия проведения реакции: 30 °С; pH 7,5. Затем реакционную смесь перемешивали и инкубировали в термошейкере 20 мин. при 30 °С, после чего регистрировали прирост оптической плотности при длине волны 405 нм. В качестве положительного контроля использовали экспериментальный ингибитор NSC-87877 [141].

2.5.4. Определение активности киназы гликогенсинтазы типа 3β (GSK3B) *in vitro*

Активность GSK3B (человеческая активная рекомбинантная) определяли биолюминесцентным методом с помощью набора ADP-Glo™ Kinase Assay (Promega, США). Анализ проводили при 27 °С в 96-луночном белом планшете с плоским дном (Greiner Lumitrac 655074, США) в конечном инкубируемом объеме 25 мкл. Инкубационная смесь содержала 5 нг GSK3B, 0,2 мкг/мл субстрата GSK3B YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQ(pS)EDEEE, полученного из человеческой мышечной гликогенсинтазы типа 1 (аминокислоты 636–661) и 25 мкМ АТФ в буферном растворе, содержащем 40 мМ Трис-НСl (pH 7,50), 20 мМ MgCl₂, 0,1 мг/мл БСА, 50 мкМ ДТТ. Тестируемые соединения вносили в 1,25% растворе ДМСО и инкубировали в термостатируемом шейкере PST-60HL (Biosan, Латвия) в течение 60 мин. [16; 90]. Измерение люминесценции проводили с помощью микропланшетного ридера Infinite M200 PRO (Tecan,

Австрия), время интегрирования 1000 мс. В качестве положительного контроля использовали экспериментальный ингибитор GSK3B 3-(2,4-дихлорфенил)-4-(1-метил-1*H*-индол-3-ил)-1*H*-пиррол-2,5-дион (SB-216763, >98% по ВЭЖХ, Sigma, США) [337].

2.5.5. Определение тиольной реактивности

Раствор исследуемых соединений вносили в раствор 100 мМ дитиотреитола в фосфатном буферном растворе (рН 7,4) до конечной концентрации 20 мкМ и инкубировали в 96-луночном планшете с УФ-прозрачным дном (Eppendorf 30741048 UV-VIS 96/F) в темноте при 25 °С. Измеряли убыль оптической плотности за 20 мин. инкубации при длине волны 230 нм с помощью микропланшетного ридера Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия).

2.6. Исследования на клеточных культурах

2.6.1. Выделение перитонеальных макрофагов

Перитонеальные макрофаги (ПМ) выделяли из перитонеального экссудата белых беспородных мышей. Для аккумуляции ПМ внутрибрюшинно вводили 1 мл 3% раствора пептона. Через 2 часа (для нейтрофилов) или 3 суток (для макрофагов) мышей подвергали эвтаназии цервикальной дислокацией. Клетки перитонеального экссудата получали, асептически промывая брюшную полость 5 мл стерильного раствора Хенкса (+4-6 °С) без ионов кальция и магния. Подсчет общего количества клеток и оценку их жизнеспособности проводили в счетной камере Горяева (Россия) окраской 0,4% трипановым синим (Sigma-Aldrich, США). Доля живых клеток превышала 95%. Концентрацию клеток доводили до $1,0 \times 10^6$ клеток/мл в полной питательной среде DMEM (Gibco), дополненной 2 мМ L-глутамин (Gibco), 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сывороткой (BioClot, Германия), с добавлением 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (Gibco). Высевали 200 мкл/лунку в 96-луночные прозрачные планшеты (SPL Life Sciences Co., Ltd., Корея). Оставляли на 2 ч. при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% CO₂, после чего лунки промывали для удаления неадгезивных клеток. После 24 часов инкубации отбирали 20 мкл супернатанта и вносили 20 мкл растворов тестируемых веществ.

2.6.2. Выделение моноцитов периферической крови

Кровь была взята у доноров-людей для выделения мононуклеарных клеток периферической крови после подписания информированного согласия. Около 20 мл крови было

собрано путем венопункции от здоровых, некурящих, молодых взрослых доноров в стерильные пробирки, содержащие гепарин. Кровь разбавляли равным объемом фосфатно-буферного физиологического раствора (PBS), осторожно перемешивали путем инверсии и наслаивали на 5 мл Ficoll-PaqueTM Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, США) в пластиковых пробирках объемом 15 мл [38]. Содержимое пробирок центрифугировали при 2000 об./мин. в течение 30 мин. при комнатной температуре. Надосадочную жидкость удаляли и отбрасывали, а слой мононуклеарных клеток собирали, переносили в другие пробирки объемом 15 мл и трижды промывали PBS центрифугированием при 1000 об./мин. в течение 10 мин. при комнатной температуре. Супернатант отбрасывали, а гранулированные клетки ресуспендировали в 1,0 мл модифицированной среды Eagle's Medium от Dulbecco (DMEM, Gibco, Великобритания). Для подсчета клеток и оценки жизнеспособности клеток использовали гемоцитометр. Жизнеспособность клеток >95% определяли с помощью 0,4% трипанового синего (Sigma-Aldrich, США). Концентрацию клеток доводили до $1,0 \times 10^6$ клеток/мл в полной среде DMEM (Gibco) с добавлением 2 мм L-глутамина (Gibco), 10% инактивированной при нагревании фетальной бычьей сыворотки (BioClot, Германия), 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (Gibco), а затем наносили 0,2 мл/лунка в 96-луночные планшеты (SPL Life Sciences, Корея). Культуре давали возможность развиваться в течение 1 ч. при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% CO₂, после чего лунки промывали для удаления неадгезивных клеток, а затем заполняли 0,2 мл полной среды DMEM.

2.6.3. Получение культуры сердечных фибробластов

Работу проводили на нелинейных крысах. Суспензию клеток желудочков сердец новорожденных 1–2-суточных животных получали с помощью метода протеолитической диссоциации, описанного ранее. Для освобождения культуры от клеток эндотелия и клеток крови полученную суспензию клеток сердца центрифугировали при 200 g в течение 5 мин. Для того чтобы отделить более адгезивные фибробласты от медленно прикрепляющихся кардиомиоцитов, использовали метод селективной адгезии [103; 301]. После центрифугирования, осадок ресуспендировали в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки («ПанЭко», Россия) и гентамицином («НПО Микроген», Россия, 50 мкг/мл) и высевали на чашки Петри («Минимед», Россия) и помещали в CO₂-инкубатор на 60 мин. Среду, содержащую неприкрепившиеся клетки, включая клетки гладких мышц сосудов, эндотелиальные клетки и оставшиеся кардиомиоциты, осторожно собирали и переносили на новые чашки Петри. Процедуру повторяли дважды. При этом на старой чашке оставалась культура, обогащенная фибробластами, которую в дальнейшем использовали для получения чистой культуры сердечных

фибробластов. Первично адгезированные клетки растили до монослоя (80% конfluence) и снова рассеивали в соотношении 1:2. Жизнеспособность клеток оценивали перед каждым последующим пассажем путем их окрашивания 0,4% раствором трипанового синего («ПанЭко», Россия). Контроль чистоты клеточной культуры и состояния клеток в ходе экспериментов наблюдали с помощью инвертированного микроскопа («Zeiss», Германия). Высокая чистота культуры фибробластов характеризовалась отсутствием взрослых кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток и гладкомышечных клеток сосудов. В дальнейшем на протяжении всего эксперимента фибробласты культивировали в полной питательной среде DMEM с 10% сывороткой и гентамицином (50 мкг/мл) при 37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Все эксперименты с фибробластами проводили на клетках первых двух пассажей [208].

2.6.4. Определение влияния соединений на захват глюкозы первичными фибробластами

Для изучения влияния веществ на утилизацию глюкозы для культивирования неонатальных фибробластов использовалась питательная среда DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л. После их инкубирования с соединениями в течение 24 ч. отбирали по 5 мкл супернатанта для определения содержания глюкозы глюкозооксидазным методом («Фармацевтика и клиническая диагностика», Россия). Концентрация полученного хромогена определялась спектрофотометрически при длине волны 450 нм.

2.6.5. Определение оксида азота (NO)

Накопление нитрит-аниона (стабильного конечного продукта распада NO, продуцируемого iNOS) в супернатантах определяли с помощью стандартного реактива Грисса, который основан на диазотировании нитрит-аниона в кислой среде сульфаниламидом и взаимодействии диазосоединения с *N*-(1-нафтил)этилендиамином с образованием окрашенного производного. Для этого 50 мкл супернатантов, отобранных спустя 22 часа после инкубации ПМ с тестовыми и контрольными соединениями, смешивали с 50 мкл 1% сульфаниламида в 2,5% H₃PO₄ и 50 мкл 0,1% *N*-(1-нафтил)этилендиамина в 2,5% H₃PO₄. После инкубации при 23 °С в течение 10 минут в термостатируемом шейкере определяли оптическую плотность при длине волны 550 нм. Преобразование оптической плотности в мкМ NO проводили по стандартной кривой (0-100 мкМ NaNO₂, разведенного в среде DMEM).

2.6.6. Определение цитокинов

Клеточный супернатант центрифугировали при 1000 g 20 минут и определяли концентрацию фактора некроза опухоли альфа (TNF- α) и интерлейкина 6 (IL-6) путем ИФА с помощью коммерческих наборов (Cloud-clone ELISA kit) на микропланшетном ридере Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия).

2.6.7. Определение жизнеспособности клеток (МТТ-тест)

После 24 ч. инкубации клеток с тестируемыми соединениями в каждую лунку вносили 20 мкл раствора МТТ, инкубировали при 37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂, в течение 4 часов. Культуральную среду удаляли, клетки лизировали и растворяли кристаллы формазана в 150 мкл ДМСО. Планшеты встряхивали при комнатной температуре в течение 10 минут и измеряли оптическую плотность в микропланшетном ридере Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия) при длине волны 565 нм.

2.6.8. Определение жизнеспособности клеток (ЛДГ-тест)

Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в клеточном супернатанте определяли спектрофотометрически по убыли NADH в смеси содержащей пируват: 10 мкл супернатантов, отобранных спустя 24 часа после инкубации ПМ с тестовыми и контрольными соединениями, смешивали с 250 мкл 0,194 нМ/л раствора NADH растворенного в 54 мМ фосфатном буферном растворе, рН 7,5. Затем к смеси добавляли 25 мкл 6,48 мМ раствора пирувата. Определяли оптическую плотность при длине волны 340 нм в течении 20 мин. Преобразование оптической плотности в клеточную жизнеспособность проводили по стандартной кривой (интактные клетки + ДМСО – 100%, интактные клетки + Тритон X-100 – 0%).

2.6.9. Анализ цитотоксичности в опухолевых клеточных линиях

Клетки культивировали в среде DMEM в присутствии 10% FBS, 2 мм L-глутамина и 1% гентамицина в качестве антибиотика при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Клетки A549 и HEK293 высевали в количестве $1,0 \times 10^4$ клеток/200 мкл в 96-луночные планшеты и инкубировали при 37 °С в увлажненной атмосфере с содержанием 5% CO₂. После 24 ч. предварительной инкубации в каждую лунку добавляли различные концентрации тестируемых соединений (100-1,56 мкМ), и инкубировали в аналогичных условиях в течение 72 ч. Все соединения растворяли в ДМСО. Конечная концентрация ДМСО в каждой лунке не превышала

0,1% и не была токсичной для клеток. Лунки со специфической культурой клеток, содержащей 0,1% раствор ДМСО в среде, контролировали в качестве контроля. После инкубации в каждую лунку добавляли 20 мкл реагента МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид, 5 мг/мл], и инкубировали еще 2 ч. Среду удаляли и в каждую лунку добавляли по 100 мкл ДМСО. Оптическую плотность измеряли при длине волны 530 нм вычитая фоновое поглощение при 620 нм с помощью микропланшетного ридера Victor3 (PerkinElmer, США).

2.7. Моделирование экспериментальной патологии лабораторных животных

2.7.1. Стрептозотоцин-индуцированный сахарный диабет 1-го типа у мышей

СД1 моделировали у белых нелинейных мышей однократным введением высокой дозы стрептозотоцина (STZ), как описано в [306]. Животных рассаживали по 5 особей на клетку, взвешивали и случайным образом распределяли в контрольную и интактную группы. За 4 ч. до начала эксперимента лишали животных пищи при свободном доступе к воде. Непосредственно перед введением готовили 20 мг/мл раствор STZ в цитратном буфере (pH 4,5). Вводили раствор STZ внутрибрюшинно в дозе 200 мг/кг (10 мл/кг). Животным интактной группы вводили равный объем цитратного буфера (pH 4,5). Возвращали животных в клетки, предоставляя еду и 10% раствор сахарозы в качестве питья для купирования гипогликемии, вызванной массовым разрушением β -клеток. Наблюдали за состоянием животных каждые 2 ч. в течение первых 8 часов, затем каждые 12 ч. На третий день эксперимента заменяли раствор сахарозы водой. На 14-ый день проверяли развитие гипергликемии после 6 часов голодания, измеряя концентрацию глюкозы в образце крови, взятой из хвостовой вены, с помощью глюкометра и тест-полосок Глюкокард-Сигма (Arkray, Россия).

2.7.2. Стрептозотоцин индуцированный сахарный диабет 2-го типа у крыс с алиментарным ожирением

Для моделирования СД2 готовили высокожировую диету, включающую: комбикорм для крыс экструдированный (13000 кДж/кг; белок 19%, жиры 5%, клетчатка 4%, лизин 1.2%, метионин + цистеин 0.7%, кальций 0.6-0.9%, фосфор 0.6-0.9%, натрий 0.20-0.25%), жир свиной, казеин, метионин, витаминно-минеральный премикс «Ушастик» (Россия). В 1 кг премикса содержится витамина А – 1000000 МЕ, витамина D3 – 300000 МЕ, витамина Е – 1,0 г, витамина В2 – 0,6 г, витамина В12 – 12 мг, железо – 20 г, медь – 4 г, марганец – 6 г, цинк – 10 г, кобальт

– 0,08 г, йод – 0,4 г. Компоненты отвешивали в соответствии с Таблицей 3 из расчета 30 г смеси на 1 животное в сутки, измельчали и перемешивали до однородности. Хранили при +4 °С.

Животных взвешивали и рандомизировали на 2 группы. Опытная группа получала высокожировую диету (58% жиров, 25% белка, 17% углеводов от общего количества калорий), контрольная группа получала нормальную диету в том же количестве при свободном доступе к воде. Через 1 неделю регистрировали вес животных и уровень глюкозы крови натощак, как описано выше. Через 2 недели животным опытной группы вводили 35 мг/кг раствор STZ в цитратном буфере (рН 4,5) внутривентриально (2 мл/кг), животным контрольной группы – 2 мл/кг цитратного буфера (рН 4,5) внутривентриально. Возвращали животных в клетки, предоставляя еду и 10% раствор сахарозы в качестве питья для купирования гипогликемии, вызванной массовым разрушением β -клеток. Наблюдали за состоянием животных каждые 2 ч. в течение первых 8 часов, затем каждые 12 ч. На третий день после введения STZ заменяли раствор сахарозы водой. Через 3 недели после начала эксперимента регистрировали вес животных и уровень глюкозы крови натощак повторно. Проверляли развитие СД2, проводя интраперитонеальный тест толерантности к глюкозе и инсулину. Отбирали по 4 животных из опытной и контрольной групп. За 3 часа до начала эксперимента они были лишены еды с сохранением свободного доступа к воде. Всем животным вводили 1 мг/кг глюкозы и 0,175 МЕ/кг инсулина (Хумулин, Eli Lilly, США) в изотоническом растворе натрия хлорида интраперитонеально. Образцы крови забирали из хвостовой вены перед инъекцией, на 5-ой, 10-ой, 15-ой и 30-ой минуте и измеряли концентрацию глюкозы.

Таблица 3 – Состав высокожировой диеты

Компонент	Масса, г/кг
Комбикорм	370
Жир свиной	313
Казеин	253
Витаминно-минеральная смесь	61
Метионин	3

2.7.3. Сахарный диабет 2-го типа у мышей C57BL/6J с алиментарным ожирением

СД2 моделировали у мышей C57BL/6J содержанием на высокожировой диете, как описано в [33]. Животных рассаживали по 5 особей на клетку, взвешивали и случайным образом распределяли в контрольную и интактную группы. Опытная группа получала высокожировую диету, приготовленную, как описано выше (58% жиров, 25% белка, 17% углеводов от общего

количества калорий), контрольная группа получала нормальную диету в том же количестве при свободном доступе к воде. Через каждые 30 дней животных взвешивали и проверяли развитие гипергликемии после 6 часов голодания, измеряя концентрацию глюкозы в образце крови, взятой из хвостовой вены, с помощью глюкометра и тест-полосок Глюкокард-Сигма (Arkray, Россия). После получения статистически достоверных различий между опытной и контрольной группами по *t*-тесту (как правило, к концу 3-его – 5-ого месяца диеты) проверили развитие СД2, проводя тест толерантности к глюкозе. Рандомизировали животных с развившимся СД2 в экспериментальные группы по массе тела и глюкозе крови натошак, исключая животных с крайними значениями.

2.8. Методы оценки антидиабетической активности на животных

2.8.1. Определение глюкозы крови

Кровь отбирали из хвостовой вены мерным капилляром типа «end-to-end» объемом 20 мкл и гемолизировали в 1 мл раствора глюкоза/лактат гемолизирующего. Уровень глюкозы в плазме крови определяли с помощью биохимического анализатора Biosen C_Line (EKF Diagnostics, Германия).

2.8.2. Определение гипогликемической активности

Самцы нелинейных крыс были рандомизированы в контрольные и экспериментальные группы по массе тела и концентрации глюкозы крови после 6 ч. голодания при сохранении свободного доступа к воде. Животным вводили исследуемые соединения или препарат сравнения метформин, солюбилизированные в 0,1% растворе натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы в объеме 10 мл/кг с помощью внутрижелудочного зонда. Животным контрольной группы вводили равный объем растворителя. Образцы крови брали из хвостовой вены отбирали непосредственно перед введением соединений, а также на 2-м, 4-м и 6-м часе после введения.

2.8.3. Пероральный тест толерантности к глюкозе

Животные были рандомизированы в контрольные и экспериментальные группы по массе тела и концентрации глюкозы крови после 6 ч. голодания при сохранении свободного доступа к воде. В момент времени –30 мин. животным опытных групп вводили исследуемые вещества или 10 мг/кг вилдаглиптина в качестве препарата сравнения в 0,1% растворе натрий-карбоксиметилцеллюлозы (Sigma-Aldrich, США) внутривентально (10 мл/кг). Животным

контрольной группы вводили равный объем растворителя. В момент времени 0 всем животным вводили 2 г/кг глюкозы в изотоническом растворе хлорида натрия внутривенно. Образцы крови брали из хвостовой вены в –30, 0, 30, 60, 90, и 120 мин. с помощью сквозного капилляра объемом 20 мкл и гемолизировали в 1 мл коммерческого гемолитического раствора глюкозы/лактата. Концентрацию глюкозы в образцах определяли с помощью биохимического анализатора Biosen C_Line (EKF Diagnostics, Германия).

2.8.4. Определение инсулина и липидов крови

Для биохимического анализа крови из подязычной вены (при прижизненном взятии) или брюшной аорты (после эвтаназии) образцы оставляли для коагуляции при комнатной температуре и центрифугировали при 10 000 g в течение 15 мин. при 4 °C. Образцы сыворотки исследовали с помощью коммерческих наборов для определения уровня триглицеридов (TG 250, Erba Lachema, Чехия), общего холестерина (CHOL 250 S, Erba Lachema, Чехия), холестерина липопротеинов высокой и низкой плотности (HDL 80 и LDL 80, Erba Lachema, Чехия) и инсулина (CSB-E05070r Rat Insulin ELISA kit, Cusabio, Китай) в соответствии с инструкциями производителя.

2.8.5. Оценка висцеральных жировых отложений

После окончания введения исследуемых соединений животных выводили из эксперимента введением хлоралгидрата (400 мг/кг внутривенно) и взвешивали. Ретроперитонеальные, мезентериальные и эпидимальные жировые отложения аккуратно выделяли, промывали холодным физиологическим раствором, высушивали на марлевых салфетках и взвешивали.

2.8.6. Определение количества лейкоцитов в крови

В пробирку с 0,38 мл 3% раствора уксусной кислоты, подкрашенного для окраски ядер лейкоцитов раствором метиленового синего, вносили 0,02 мл стабилизированной гепарином крови и перемешивали. Каплю содержимого пробирки помещали в счетную камеру Горяева. Заполненную камеру оставляли в горизонтальном положении на 1 мин. для оседания лейкоцитов. Затем помещали её на столик микроскопа и при малом увеличении (окуляр 10×, объектив 10×) подсчитывали лейкоциты в 100 больших квадратах. Расчет лейкоцитов проводили по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 250 \cdot 20}{100} = a \cdot 50, \text{ где} \quad (1)$$

X – число лейкоцитов в 1 мкл крови; а – число лейкоцитов в 100 больших квадратах; 20 – разведение крови; 100 – число больших квадратов; 250 – коэффициент пересчета на 1 мкл, т.к. объем одного большого квадрата равен 0,004 мкл (сторона квадрата 0,2 мм, высота 0,1 мм). Практически для расчета количества лейкоцитов в 1 мкл крови их число в 100 больших квадратах умножали на 50, а в 1 л – полученную величину умножали еще на 10^6 . На основании полученных данных оценивали наличие и выраженность воспалительной реакции у экспериментальных животных.

2.8.7. Определение лейкоцитарной формулы

Мазки крови высушивали на воздухе. Фиксацию проводили фиксатором-красителем по Май-Грюнвальду (3 мин.), окрашивали по Романовскому-Гимзе. Непосредственно перед окраской готовили рабочий раствор: смешивали краситель с нейтральной (pH 7,0) дистиллированной водой в соотношении 1:10 с последующей фильтрацией. Зафиксированные мазки крови помещали в рабочий раствор красителя, по истечении 30 мин. препараты промывали проточной водой 1-2 сек, высушивали на воздухе и микроскопировали (иммерсионная система, объектив 100×, окуляр 10×). На каждом стекле суммарно просчитывали не менее 100 клеток, учитывая отдельные виды лейкоцитов.

2.8.8. Тест «Открытое поле»

Исследуемых животных помещали в центр круглой установки с диаметром арены 44 см и высотой стенок 32 см Open-field 47432 (Ugo Basile, Италия) при комнатном освещении интенсивностью 300 люкс. В течение 5 мин. наблюдения записывали поведение животных на видеокамеру, по записи регистрировали следующие параметры: горизонтальная двигательная активность; вертикальная двигательная активность; время, проведенное в центральной части установки; количество выходов в центральную часть установки; поисковая активность.

2.8.9. Иммуногистохимическое исследование β -клеток поджелудочной железы

При изучении влияния активаторов глюкокиназы на процессы регенерации β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы мышей при стрептозотоцин-индуцированном диабете были использованы методики [139; 152]. В исследовании использовали мышей с STZ-индуцированным СД1 с концентрацией глюкозы крови не менее 15,0 мМ. Животным опытных групп были введены исследуемое вещество NP-006 и препарат сравнения PF-04937319 в дозе 50 мг/кг внутрибрюшинно в 0,1% растворе натрий-карбоксиметилцеллюлозы (10 мл/кг веса).

Животным интактной группы вводили растворитель в равном объеме. Вывод животных из эксперимента проводился через 16 ч. методом цервикальной дислокации. Ткань поджелудочной железы фиксировалась в 10% растворе нейтрального забуференного формалина (pH 7,4) в течение 24 ч. с последующей заливкой в парафин по общепринятым гистологическим методикам. На роторном микротоме «Microm HM 325» (ThermoScientific, США) изготавливались парафиновые срезы толщиной 3-5 мкм, которые монтировались на адгезивные стекла с поли-L-лизинном (Sigma-Aldrich, США). После депарафинизации микропрепаратов проводили иммунофлюоресцентное окрашивание с первичными антителами к инсулину, глюкагону и протеину Ki-67 (табл. 4) по протоколам фирм производителей антител с температурной демаскировкой антигенов в «Dewax and HIER Buffer L» буфере (ThermoScientific, США) при температуре 98 °С 40 мин. После трёхкратной промывки блокировали неспецифическое окрашивание раствором 10% нормальной сыворотки осла (Sigma-Aldrich, США) при комнатной температуре в течение 60 мин. После промывки в TRIS-буфере инкубировали срезы с первичными антителами в термостате во влажной камере при 37 °С 24 ч. После двукратной промывки в TRIS-буфере по 60 мин. инкубировали со вторичными антителами (табл. 4) во влажной камере в термостате при 37 °С 24 ч. Затем дважды промывали в TRIS-буфере по 60 мин. и инкубировали в растворе DAPI (ThermoScientific, США, 0,0002%) при комнатной температуре 15 мин. Заключали в монтирующую не флюоресцирующую среду.

Анализ препаратов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа «Axioimager.A2» (Carl Zeiss, Германия), при начальном увеличении $\times 200$, $\times 400$ и $\times 630$ с использованием программного обеспечения «Isis» (MetaSystems, Германия) и блоков светофильтров.

Таблица 4 – Характеристика используемых антител

№ п/п	Наименование первичных антител	Фирма производитель, клон	Наименование вторичных антител	Производитель, флюорохром
1.	Морской свинки, анти-инсулин	Abcam, поликлональные, IgG	Козьи, анти-морской свинки	Abcam, alexafluor 647, IgG
2.	Кроличьи, анти-Ki-67	Abcam, моноклональные (клон SP6), IgG	Ослиные, анти-кроличьи	Abcam, alexafluor 488, IgG
3.	Кроличьи, анти-глюкагон	Dako, поликлональные, IgG	Ослиные, анти-кроличьи	Abcam, alexafluor 488, IgG
4.	Мышиные, анти-глюкагон	Dako, моноклональные, IgG	Козьи, анти-мышинные	Abcam, alexafluor 488, IgG

2.9. Изучение острой токсичности соединений

Исследование острой токсичности проводилось на нелинейных мышах-самцах массой 20–30 г (ООО «НИЦ БМТ», ветеринарное свидетельство № 0725507 от 01.09.17 г.). Животные были разделены на 2 группы: контрольная и исследуемая. Контрольной группе животных перорально или внутривентриально вводили растворитель в объеме 2 мл / 100 г веса животного. Исследуемой группе животных перорально вводили исследуемое вещество в заданной дозе в объеме 2 мл / 100 г веса животного тем же путем. Введение производилось после 12-часовой пищевой депривации [143]. Через 4 часа после введения животные получали свободный доступ к еде и воде. Оценивалась смертность животных в первые 24 часа и затем в течение 2 недель после введения. Ежедневно измерялся вес животных.

Глава 3. Система поиска потенциальных антидиабетических соединений

Разработка ЛС – это время-, ресурсо- и трудозатратный процесс, главными препятствиями для успеха которого можно считать недостаток наших знаний системной биологии (в частности, невозможность предсказать характер и динамику эффекта при воздействии на конкретную мишень или при воздействии нового соединения на протеом организма) и ограниченность доступных ресурсов. Вследствие этого особую важность приобретает вопрос валидации белков как терапевтических мишеней и приоритизация соединений, т.е. отбор наиболее перспективных молекул из обширного доступного химического пространства. Последняя проблема приобретает особенно большое значение в условиях академической науки. Для достижения поставленной в исследовании цели оптимальным образом с использованием современных подходов к мишень-ориентированной разработке ЛС была разработана система поиска фармакологически активных соединений (см. Рисунок 5).

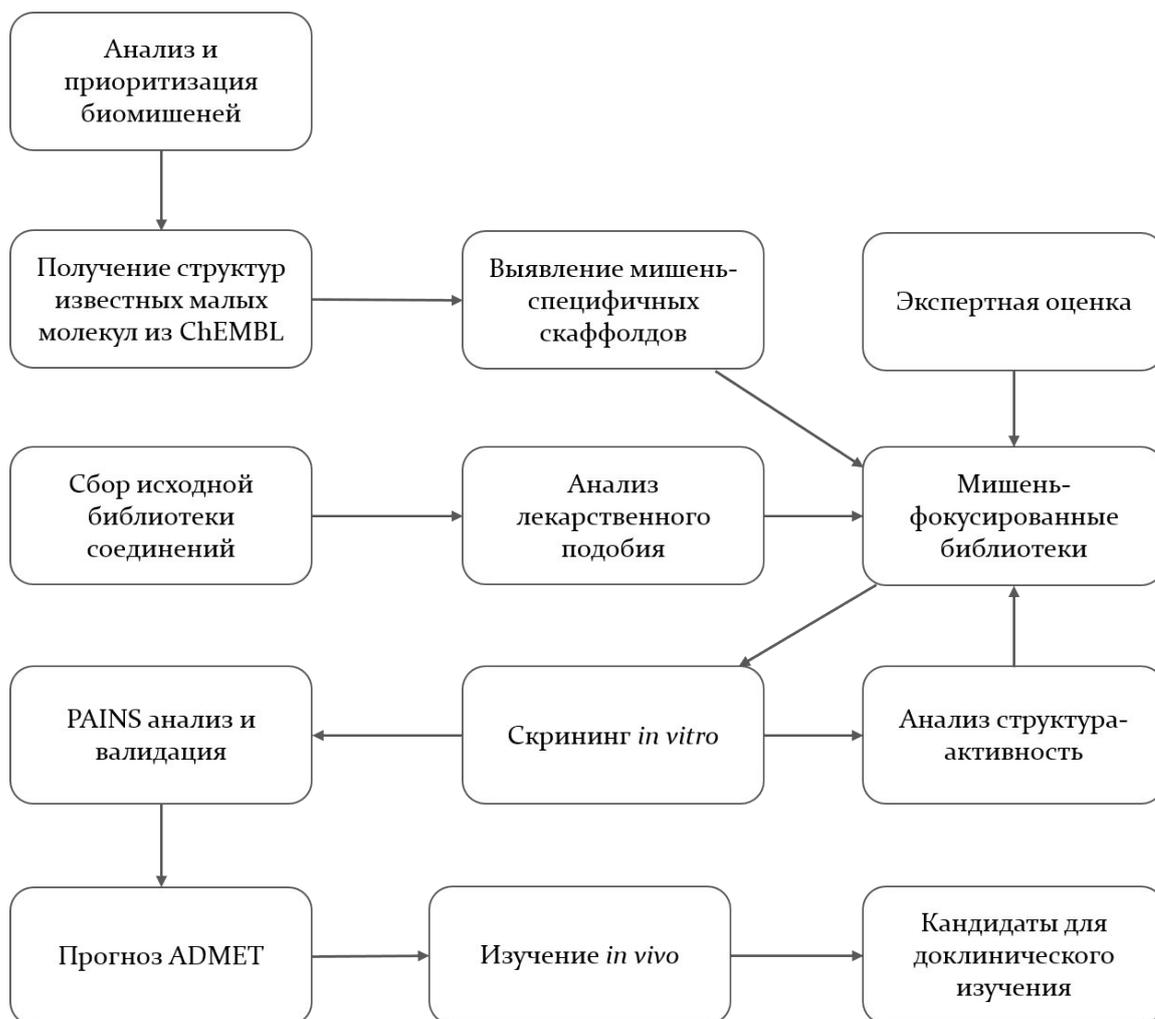


Рисунок 5 – Система мишень-ориентированного поиска.

Данная система позволяет реализовать поэтапный *in silico-in vitro-in vivo* отбор перспективных соединений с использованием комплекса информационных технологий и

открытых источников биомедицинской информации. Основными принципами ее построения являлись:

1. Рациональный выбор целевых биомишеней на основе их валидированности в развитии СД2, пригодности для разработки новых ЛС, безопасности и эффективности известных низкомолекулярных регуляторов.
2. Приоритизация соединений с наибольшей вероятностью проявления целевой активности и благоприятными расчетными физико-химическими свойствами, отсев заведомо токсичных соединений. Рациональный отбор наиболее перспективных для экспериментального изучения соединений из большого числа доступных для исследования.
3. Валидация идентифицированных активных соединений для отсева ложноположительных результатов.

3.1. Валидация выбранных инновационных мишеней для поиска антидиабетических соединений

Первой задачей исследования стал обоснованный выбор целевых биологических мишеней для разработки средств терапии СД2. Ее решение одновременно облегчается и затрудняется обилием доступной в наши дни биомедицинской информации. Так, известно более 3000 мишеней, релевантных СД2. Для рационального выбора и приоритизации мишеней был использован методический подход, предложенный в работах [26; 55; 106; 212]. Источником интегрированных данных о мишенях служили информационные сервисы, агрегирующие релевантную информацию о роли целевого белка в норме и патологии, его строении, функциях, известных малых молекулах-регуляторах, степени и возможности ее разработки как мишени действия ЛС, степени его валидированности для конкретной нозологии и возможных on-target побочных эффектах:

1. Платформа Open Targets [146; 148; 147] объединяет данные генетики, геномики, транскриптомики, лекарственных средств, животных моделей и научной литературы для оценки и ранжирования ассоциаций "мишень-болезнь" для идентификации мишеней лекарств.
2. Платформа TargetMine [197; 244] – хранилище данных для содействия приоритизации мишеней путем интеграции источников по ассоциации генов и заболеваний, которая объединяет различные источники данных, включая структуры белков и их низкомолекулярных лигандов.

Мишени оценивались по совокупности следующих ключевых критериев:

1. Насколько подтверждена роль мишени в патогенезе болезни? Были ли фундаментальные эксперименты независимо воспроизведены? Достаточно ли фундаментальных данных о мишени и связанных с ней биологических системах? Каковы вероятные нецелевые и побочные эффекты?

Мишень должна иметь подтвержденную роль в заболевании и, в идеале, её модуляция не должна иметь последствий при отсутствии патофизиологии. Источниками информации служат генетические данные исследований полногеномной ассоциации (GWAS), фенотип нокаутных или мутантных по соответствующему гену животных, экспериментально установленные функции мишени.

2. Существуют ли надежные методы и инструменты для анализа предложенной цели *in vitro* и *in vivo*? Известны ли малые молекулы, пригодные для использования в качестве соединений сравнения? Описана ли активность/экспрессия мишени в животных моделях заболевания? Существуют ли специфические биомаркеры активности мишени?

*Мишень должна быть пригодна для анализа, как в формате *in vitro*, так и *in vivo*, чтобы обеспечить оптимизацию соединений-лидеров и исследование механизма действия. Методы исследования должны позволять установить вовлеченность мишени и достижение четкого терапевтического эффекта в соответствующих условиях *in vivo*.*

3. Имеется ли структурная информация о предлагаемой мишени? Наличие надежных структурных моделей мишени и её гомологов является преимуществом.

Структурная информация (экспериментальные или гомологичные 3D модели мишени) может предоставить важную информацию о потенциальных молекулярных взаимодействиях мишень-лиганд и направить усилия по оптимизации активных соединений.

4. Каков конкурентный ландшафт мишени? Есть ли данные о научных конкурентах, патентной активности, результатах клинических испытаний?

Такая информация позволяет косвенно оценить потенциал и перспективность мишени для создания нового ЛС.

Основная часть работы посвящена четырем перспективным антидиабетическим мишеням, краткая характеристика которых в соответствии с указанными критериями дана ниже.

АМПК. АМФ-активируемая протеинкиназа (АМПК) в основном известна как высококонсервативный и повсеместно экспрессируемый сенсор энергетического статуса клетки, который очень чувствителен к изменениям уровней клеточной энергии (за счет увеличения соотношения АМФ:АТФ и АДФ:АТФ) и вносит соответствующие корректировки в баланс

потребление АТФ с его синтезом [9; 92]. В этом контексте общий эффект активации АМРК заключается в увеличении скорости катаболических (генерирующих АТФ) процессов и снижении скорости анаболических (потребляющих АТФ) процессов для восстановления гомеостаза клеточной энергии. Эффекты фармакологической активации АМРК включают увеличение усвоения глюкозы и окисления жирных кислот, подавление накопления липидов и глюконеогенеза в печени [5; 7; 11; 203], регуляцию аппетита [89], кардиопротективное [89], нефропротективное [176], нейропротективное [215] и противовоспалительное действия [10; 21; 22]. Потенциал данного фермента для нормализации метаболических нарушений при сахарном диабете 2 типа не вызывает сомнений [179]. Внедрение в клинику одного из первых активаторов АМРК, соединения А769662, оказалось невозможным из-за низкой пероральной биодоступности и токсических эффектов, не связанных с активацией АМРК [8]. Потенциальные проблемы, связанные с хронической системной активацией АМРК активатором МК-8722 (Merck), были выявлены у макак-резусов, получавших препарат в течение 8 месяцев. Наблюдалось увеличение содержания гликогена в сердце и гипертрофия миокарда, но без каких-либо изменений в электрокардиограмме и функциональных нарушений со стороны сердца [185]. Все изменения оказались обратимы после отмены препарата. Возможность разработки безопасных активаторов АМРК показана успешными клиническими испытаниями I и II фазы соединения PXL770 (Poxel SA) [159; 403; 409], испытаниями I и II фазы соединения O304 (Betagenon AB) [142; 151]. Важно отметить, что недавнее исследование II фазы с O304 на людях с диабетом 2 типа показало снижение уровня глюкозы без гипертрофии миокарда [151]. Кроме того, в сердце экспрессируется только изоформа АМРК $\alpha 2\beta 2\gamma 1$. Создание $\beta 1$ -селективных активаторов позволяет полностью избежать возможности развития гипертрофии миокарда, при этом сохраняя инсулин-сенситизирующее и нефропротективное действие [94; 175].

GSK3B. Эффекты фармакологического ингибирования GSK3B широко описаны в литературе и включают стимуляцию синтеза гликогена и утилизацию глюкозы, подавление глюконеогенеза печени, стабилизацию IRS1 и усиление чувствительности к инсулину [443], защиту β -клеток поджелудочной железы [53], предотвращение развития диабетической нефропатии [72]. Увеличение активности GSK3B, предположительно за счет цитокин-опосредованного ингибирования Akt [394], подавляет антиапоптотические белки [269] и может объяснять защитные эффекты ингибиторов GSK3B в цитокин-индуцированном апоптозе β -клеток [434]. Литература указывает, что ингибирование GSK3B *in vivo* может снизить фосфорилирование десятков белков и влиять на широкий спектр клеточных процессов, включая рост, дифференцировку, выживание и коммуникацию клеток.

Таблица 5 – Валидация АМФ-активируемой протеинкиназы как инновационной антидиабетической мишени

Критерии оценки	Оцениваемые факторы	Источники информации
Связь с заболеванием	Казуальность мишени в патогенезе	Показана в генетически модифицированных животных: активация АМПК защищает от алиментарного ожирения и инсулинорезистентности [344; 407]
	Терапевтическая ценность	Показана в генетических моделях и на животных моделях диабета с использованием низкомолекулярных активаторов, подтверждена в клинических испытаниях 2-ой фазы [403; 407]
Безопасность (возможные побочные эффекты модуляции мишени)	Тканевая экспрессия мишени	Повсеместная, набор изоформ тримера тканеспецифичен [407]
	Фенотипы нокаутных и мутантных по гену животных	Нокаут АМПК α 2 ведет к гипертрофии и левожелудочковой недостаточности [304]
	Экспериментальные и клинические данные	Гипертрофия миокарда при активации изоформы АМПК α 2 β 2 γ 1 [186], АМПК β 1-селективные активаторы безопасны в клинических испытаниях 2-ой фазы [403]
Техническая доступность (пригодность для скрининга и разработки ЛС)	Наличие трехмерной структуры мишени	Да [207; 407]
	Наличие центров связывания малых молекул	Да, аллостерический центр [407]
	Наличие известных модуляторов и соединений-сравнения	Да, экспериментальные малые молекулы, молекулы в клинических испытаниях [407]
	Наличие производительных методов оценки активности мишени <i>in vitro</i>	Да
	Наличие специфических биомаркеров <i>in vivo</i>	Да
Стратегические вопросы перспективности терапевтического подхода	Наличие неудовлетворенной медицинской потребности	Да
	Преимущества перед существующими подходами лечения	Способствует снижению массы тела, системное противовоспалительное действие [94; 145]

Таблица 6 – Валидация киназы гликогенсинтазы типа 3 β как инновационной антидиабетической мишени

Критерии оценки	Оцениваемые факторы	Источники информации
Связь с заболеванием	Казуальность мишени в патогенезе	Показана в нокаутных животных: наблюдается улучшение чувствительности к инсулину, усвоения глюкозы, синтеза гликогена [321; 344]
	Терапевтическая ценность	Показана в генетических моделях и на животных моделях диабета с использованием низкомолекулярных ингибиторов [85; 311; 321]
Безопасность (возможные побочные эффекты модуляции мишени)	Тканевая экспрессия мишени	Широкая, включая нервную ткань, клетки иммунной системы, печень, поджелудочную железу [321]
	Фенотипы нокаутных и мутантных по гену животных	Делеция GSK3 β протективна в постинфарктном ремоделировании миокарда [304]
	Экспериментальные и клинические данные	Гиперплазия желчного пузыря [191]
Техническая доступность (пригодность для скрининга и разработки ЛС)	Трехмерная структура мишени	Да [321]
	Наличие центров связывания малых молекул	Да, АТФ-связывающий центр [321]
	Наличие известных модуляторов и соединений-сравнения	Да, экспериментальные малые молекулы, молекулы в клинических испытаниях, одобренные ЛС по другим показаниям (соли лития) [321]
	Наличие производительных методов оценки активности мишени <i>in vitro</i>	Да
	Наличие специфических биомаркеров <i>in vivo</i>	Да
Стратегические вопросы перспективности терапевтического подхода	Наличие неудовлетворенной медицинской потребности	Да
	Преимущества перед существующими подходами лечения	Сохранение массы β -клеток, системное противовоспалительное действие, подавление избыточной активации тромбоцитов, кардиопротекция [110; 114; 358]

Высказывались опасения, что ингибирование GSK3 будет иметь многочисленные нежелательные побочные эффекты [443]. Тем не менее, в настоящее время отсутствуют опубликованные доказательства того, что действительно специфические ингибиторы GSK3 в концентрациях, вызывающих ингибирование GSK3, вредны для здоровых организмов, однако есть исследование, демонстрирующее эффективность в снижении уровня глюкозы на модели

СД2, при этом не сообщалось о токсических побочных эффектах [68]. Клинические испытания II фазы необратимого ингибитора GSK3B тидеглусиба в дозе до 1000 мг/день в течение 26 недель показали хорошую переносимость и достаточный уровень безопасности [6]. Хорошие предварительные результаты также показал ингибитор 9-ING-41 [220], сейчас начинаются клинические испытания II фазы [12].

РТР1В. Протеинтирозинфосфатаза 1В (РТР1В) является отрицательным регулятором сигнальных путей лептина и инсулина, дефосфорилируя их рецепторы и нижележащие компоненты каскадов. Важная роль РТР1В в патогенезе ожирения и сахарного диабета была подтверждена делецией гена РТР1В у мышей. Мыши, полностью нокаутные по гену РТР1В, защищены от развития ожирения и диабета. При этом селективная делеция гена РТР1В в мозге давала такой же эффект на вес и углеводный обмен животных. Делеция в мышцах, печени и адипоцитах не оказывает благоприятного влияния [49; 88; 137]. Хотя эти результаты указывают на важность нейрональной активности РТР1В в поддержании гомеостаза энергии, периферическая РТР1В также исследуется как потенциальный регулятор энергетического баланса. В частности, показана важная роль экспрессии печеночной РТР1В в гомеостазе глюкозы и эндоплазматическом стрессе [121; 122]. Активность РТР1В повышается при ожирении и диабете типа 2 и является основной причиной развития резистентности к инсулину. Валидация РТР1В как терапевтической мишени для ожирения и диабета дала начало разработке селективных ингибиторов РТР1В [88; 116]. Данные усилия привели к открытию нескольких классов ингибиторов, однако их терапевтический потенциал долгое время ограничивался низкой пероральной биодоступностью [190]. В настоящее время тродусквемин является наиболее изученным низкомолекулярным ингибитором РТР1В. Первоначально препарат разрабатывался первооткрывателями соединения, компанией Magainin Pharmaceuticals, позже переименованной в Genega. Он успешно прошел клинические испытания I фазы как средство для лечения сахарного диабета 2-ого типа, показав хорошую переносимость и фармакокинетический профиль у здоровых лиц (NCT00509132, 2008 г.), а также у пациентов с ожирением и диабетом 2-ого типа (NCT00606112 и NCT00806338, 2009 г.), и планировался к переходу на испытания фазы II. Реализации этих планов помешали финансовые трудности разработчика.

В настоящее время лицензионные права на тродусквемин принадлежат компании Dermumed, которая запустила клинических испытания фазы I для лечения HER-2-положительного метастатического рака молочной железы (NCT02524951, 2017 г.). Исследование было прекращено в 2018 году из-за отсутствия интереса со стороны спонсора (Northwell Health). Наконец, больница университета Angers объявила об исследовании обструктивного апноэ во сне, чтобы оценить влияние атеросклероза и воспаления, которое можно уменьшить с помощью тродусквемина (NCT04235023, 2020).

Таблица 7 – Валидация протеинтирозинфосфатазы 1В как инновационной антидиабетической мишени

Критерии оценки	Оцениваемые факторы	Источники информации
Связь с заболеванием	Казуальность мишени в патогенезе	Показана в нокаутных животных: наблюдается улучшение чувствительности к инсулину, толерантности к глюкозе, устойчивость к высокожировой диете, уменьшение массы жировой ткани [344; 408]
	Терапевтическая ценность	Покана в генетических моделях и на животных моделях диабета с использованием низкомолекулярных ингибиторов [116; 408]
Безопасность (возможные побочные эффекты модуляции мишени)	Тканевая экспрессия мишени	Широкая, включая нервную ткань, клетки иммунной системы, печень, поджелудочную железу [408]
	Фенотипы нокаутных и мутантных по гену животных	Нежелательные эффекты не описаны [408]
	Экспериментальные и клинические данные	Нежелательные эффекты не описаны [79; 408]
Техническая доступность (пригодность для скрининга и разработки ЛС)	Трехмерная структура мишени	Да [207; 408]
	Наличие центров связывания малых молекул	Да, активный и аллостерический центры [408]
	Наличие известных модуляторов и соединений-сравнения	Да, экспериментальные малые молекулы, молекулы в клинических испытаниях [408]
	Наличие производительных методов оценки активности мишени <i>in vitro</i>	Да
	Наличие специфических биомаркеров <i>in vivo</i>	Да
Стратегические вопросы перспективности терапевтического подхода	Наличие неудовлетворенной медицинской потребности	Да
	Преимущества перед существующими подходами лечения	Снижение лептинорезистентности, аппетита и массы тела, нейропротективное действие, в том числе при диабетической ретинопатии [112; 137; 388; 413]

Глюкокиназа (GCK). Большое число исследований на грызунах подтверждает критическую роль GCK в гомеостазе глюкозы. Мыши умирают в течение нескольких дней после рождения от тяжелого диабета при делеции гена GCK во всем организме или в β -клетках поджелудочной железы, тогда как гетерозиготы имеют лишь умеренную гипергликемию [283].

Гетерозиготное нарушение печеночной GCK у мышей приводит к дисрегуляции глюконеогенеза и снижению захвата глюкозы [232]. Снижение активности GCK в β -клетках подавляет секрецию инсулина, но не приводит к изменению уровней глюкозы в плазме натощак или нарушению толерантности к глюкозе [232]. Введение мутантной GCK грызунам с различными формами диабета улучшало толерантность к глюкозе и чувствительность к инсулину [149]. У мышей с диабетом, индуцированным диетой с высоким содержанием жира, аденовирусная сверхэкспрессия GCK улучшала толерантность к глюкозе и снижала уровень глюкозы в крови натощак с сопутствующим снижением секреции инсулина [156]. У людей гетерозиготные мутации с потерей функции GCK приводят к легкой и стабильной хронической гипергликемии, называемой MODY2 (диабет зрелого возраста у молодых, тип II), которая связана с нарушенной секрецией инсулина [371]. После еды содержание гликогена в печени при MODY2 ниже, чем у субъектов, не страдающих диабетом, и этот дефект связан с усиленной постпрандиальной гипергликемией и нарушением подавления глюконеогенеза в печени [333]. Редкие активирующие GCK мутации у человека вызывают гиперинсулинемию с гипогликемией [18; 28], но о влиянии этих мутаций на толерантность к глюкозе не сообщалось. Функциональные исследования *in vitro* показывают, что эти мутации увеличивают активность GCK за счет увеличения сродства к глюкозе. Определение кристаллической структуры GCK позволило выявить гидрофобный аллостерический карман, удаленный от каталитического центра на 20 Å, который связывает молекулы активаторов, когда киназа связывается с глюкозой в своем «закрытом», каталитически активном состоянии [120; 343].

Концепция активации глюкокиназы в качестве потенциального средства лечения СД2 исследовалась несколькими фармацевтическими компаниями. Показано, что низкомолекулярные активаторы GCK (GKA) эффективно увеличивают утилизацию глюкозы гепатоцитами и снижают уровень глюкозы в крови на животных моделях диабета при однократном или хроническом воздействии и при СД2 у человека [188; 318]. Однако несколько клинических испытаний GKA были прекращены из-за снижения их эффективности при хроническом введении или других проблем. В некоторых случаях снижение эффективности было связано с увеличением триглицеридов в плазме крови, повышенным образованием триглицеридов в печени и стеатозом [17; 316].

Таким образом, по результатам комплексной оценки информации из геномных, протеомных и фенотипических баз данных, литературных и клинических данных, были валидированы как инновационные антидиабетические мишени киназы AMPK, GSK, GSK3B и фосфатаза PTP1B. С высокой степенью достоверности показана их каузальная роль в патогенезе СД2, терапевтическая ценность, достаточная безопасность и техническая пригодность для разработки новых ЛС. Наличие плейотропных фармакологически ценных эффектов модуляции

этих мишеней, включая сохранение и стимулирование пролиферации клеток, коррекцию системного подострого воспаления и предотвращение отдаленных последствий и осложнений СД2 является преимуществом перед существующими терапевтическими подходами.

Таблица 8 – Валидация глюкокиназы как инновационной антидиабетической мишени

Критерии оценки	Оцениваемые факторы	Источники информации
Связь с заболеванием	Казуальность мишени в патогенезе	Подтверждена в исследованиях GWAS и генетического полиморфизма, показана в нокаутных животных: наблюдается гиперинсулинемия, нарушение чувствительности к инсулину и усвоения глюкозы, падение массы β -клеток [280; 309; 344]
	Терапевтическая ценность	Покана в генетических моделях, на животных моделях диабета с использованием низкомолекулярных активаторов, в клинических исследованиях 2-ой и 3-ей фаз [230; 309]
Безопасность (возможные побочные эффекты модуляции мишени)	Тканевая экспрессия мишени	Широкая, включая нервную и мышечную ткани, печень, поджелудочную железу [309]
	Фенотипы нокаутных и мутантных по гену животных	Нежелательные эффекты не описаны [309]
	Экспериментальные и клинические данные	В ряде исследований при применении активаторов GSK отмечен риск стеатоза печени и потери эффективности [95; 193]
Техническая доступность (пригодность для скрининга и разработки ЛС)	Трехмерная структура мишени	Да [309]
	Наличие центров связывания малых молекул	Да, аллостерический центр [309]
	Наличие известных модуляторов и соединений-сравнения	Да, экспериментальные малые молекулы, молекулы в клинических испытаниях [309]
	Наличие производительных методов оценки активности мишени <i>in vitro</i>	Да
	Наличие специфических биомаркеров <i>in vivo</i>	Да
Стратегические вопросы перспективности терапевтического подхода	Наличие неудовлетворенной медицинской потребности	Да
	Преимущества перед существующими подходами лечения	Стимулирует регенерацию β -клеток, нормализует системный гомеостаз глюкозы [69; 230]

3.2. Формирование библиотек исследуемых соединений

Объектами изучения настоящего исследования были 2309 низкомолекулярных соединений, синтезированных в ведущих академических учреждениях Российской Федерации:

1. Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза (г. Москва) под руководством к.х.н. Н.А. Лозинской¹, 42 соединения.
2. Научно-исследовательский институт физической и органической химии Южного федерального университета (г. Ростов-на-Дону), ведущим научным сотрудником, к.х.н. В.А. Анисимовой, главным научным сотрудником, д.х.н. А.С. Морковником, научным сотрудником, к.х.н. О.Н. Жуковской под руководством академика РАН В.И. Минкина², 1525 соединений.
3. Научно-образовательный центр фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета (г. Казань) под руководством д.х.н., профессора Ю.Г. Штырлина³, 54 соединения.
4. Уральский федеральный университет им. Первого президента РФ Б.Н. Ельцина (г. Екатеринбург), под руководством директора химико-технологического института УрФУ, члена-корреспондента РАН, проф., д.х.н. В.Л. Русинова⁴, 113 соединений.
5. Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского (г. Екатеринбург) на кафедре органической и биомолекулярной химии, под руководством доцента, к.х.н. Г.Л. Русинова⁵, 117 соединений.
6. Самарский государственный технический университет (г. Самара), к.х.н. М.В. Леоновой под руководством Ю.Н. Климочкина, д.х.н., профессора, заведующего кафедрой, проректора по научной работе⁶, 151 соединение.
7. Башкирский государственный медицинский университет (г. Уфа) под руководством заведующего кафедрой фармацевтической химии с курсами

¹ Выражаем глубокую признательность сотрудникам МГУ им. М.В. Ломоносова к.х.н. Н.А. Лозинской и к.х.н. Е.В. Заряновой за синтез и предоставление субстанций веществ для данной работы.

² Выражаем глубокую признательность академику РАН В.И. Минкину, ведущему научному сотруднику НИИ ФОХ ЮФУ к.х.н. В.А. Анисимовой, главному научному сотруднику, д.х.н. А.С. Морковнику и научному сотруднику, к.х.н. О.Н. Жуковской за синтез и предоставление субстанций веществ для данной работы.

³ Выражаем глубокую признательность сотрудникам Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского федерального университета – д.х.н., профессору Ю.Г. Штырлину, к.х.н. М.С. Дзюркевичу за синтез и предоставление субстанций веществ для данной работы.

⁴ Выражаем глубокую признательность сотрудникам Уральского федерального университета им. Первого президента РФ Б.Н. Ельцина проф., д.х.н. В.Л. Русинову

⁵ Выражаем глубокую признательность сотрудникам Института органического синтеза им. И.Я. Постовского доценту, к.х.н. Г.Л. Русинова

⁶ Выражаем глубокую признательность сотрудникам Самарского государственного технического университета – д.х.н., профессору Ю.Н. Климочкину, к.х.н. М.В. Леоновой за синтез и предоставление субстанций веществ для данной работы.

аналитической и токсикологической химии, д.фарм.н., профессора, Ф.А. Халиуллина,⁷ 151 соединение.

8. Волгоградский государственный технический университет, кафедра технологии органического и нефтехимического синтеза (Волгоград) к.х.н. В. С. Лобасенко и к.х.н. Т.К. Корчагиной под руководством заведующего кафедрой, д.х.н., профессора Ю.В. Попова⁸, 67 соединений.
9. Волгоградский государственный медицинский университет, кафедра фармацевтической и токсикологической химии (г. Волгоград) под руководством заведующего кафедрой д.х.н., профессора А.А. Озерова⁹, 48 соединений.

Соединения предоставлялись для проведения биологических исследований в рамках соглашения РФФ 14-25-00139 (проект «Создание системы мишень-ориентированного поиска биологически активных соединений, влияющих на патогенетически важные звенья нарушения углеводного обмена при сахарном диабете типа 2, с использованием технологий компьютерного моделирования и медицинской химии под руководством академика РАН, профессора, д.м.н. А.А. Спасова) и договоров о научном сотрудничестве между перечисленными выше научными и научно-образовательными учреждениями и ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России. С целью систематизации исследуемых соединений, учета и анализа полученных данных была создана база данных, содержащая лабораторные шифры и двумерные структуры соединений в формате, пригодном для последующей обработки методами хемоинформатики. Для создания библиотеки исследуемых соединений, расчета молекулярных дескрипторов и физико-химических свойств, анализа скаффолдов, кластеризации и обработки данных была использована платформа DataWarrior 5.5.0 (Idorsia Pharmaceuticals Ltd.), эффективность которой показана в многочисленных работах [123]. Созданная база данных содержится в Приложении 1.

3.2.1. Анализ лекарственного подобия

Исходя из необходимости исключения заведомо неперспективных соединений на раннем этапе исследования была выполнена оценка их лекарственного подобия. Для расчета

⁷ Выражаем глубокую признательность сотрудникам Башкирского государственного медицинского университета, заведующему кафедрой фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии, д.фарм.н., профессору, Ф.А. Халиуллина

⁸ Выражаем глубокую признательность сотрудникам Волгоградского государственного технического университета – заведующему кафедрой технологии органического и нефтехимического синтеза, д.х.н., профессору Ю.В. Попову, доценту кафедры технологии органического и нефтехимического синтеза, к.х.н. В.С. Лобасенко, доценту кафедры технологии органического и нефтехимического синтеза, к.х.н. Т.К. Корчагиной за синтез и предоставление субстанций веществ для данной работы.

⁹ Выражаем глубокую признательность сотрудникам Волгоградского государственного медицинского университета, кафедры фармацевтической и токсикологической химии – д.х.н., профессору А.А. Озерову., к.фарм.н. А.Н. Гейсману за синтез и предоставление субстанций веществ для данной работы.

соответствующих физико-химических характеристик использовались модули, интегрированные в DataWarrior 5.2.1 [57]. Перед расчетом дескрипторов из структур соединений были удалены солевые остатки и выполнено протонирование с учетом pH 7,4. Для определения фрагментов структуры, встречающихся в соединениях с известной токсичностью, был использован подструктурный анализ. Процесс прогнозирования основан на предварительно вычисленном наборе структурных фрагментов, которые вызывают предположение о наличии токсичности в случае их обнаружения в структуре. Списки фрагментов основаны на базе соединений различных типов токсичности данных RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances, Регистр токсических эффектов химических соединений [383]). Поиск субструктуры определил частоту встречаемости фрагмента молекулы (ядра и сконструированных фрагментов) во всех соединениях с предполагаемым типом токсичности и применяемыми ЛС, исходя из предположения, что последние в значительной степени не обладают токсическим действием. Аналогично, по частоте встречаемости фрагмента соединения в реагентах органического синтеза и применяемых ЛС, рассчитывался фрагмент-основанный показатель лекарственного подобия DataWarrior. Положительное значение этого показателя означает, что структура соединения преимущественно содержит фрагменты, которые часто присутствуют в структурах клинически одобренных ЛС.

Были рассчитаны следующие параметры и оценки:

1. Молекулярная масса, Да
2. Показатель липофильности clogP
3. Показатель растворимости clogS
4. Количество доноров водородных связей
5. Количество акцепторов водородных связей
6. Площадь полярной поверхности молекулы (PSA), Å²
7. Вероятность наличия мутагенности
8. Вероятность наличия канцерогенности
9. Вероятность наличия репродуктивной токсичности
10. Вероятность наличия раздражающего действия
11. Внутренний показатель лекарственного подобия DataWarrior

Липофильность служит одной из ключевых характеристик потенциального ЛС и объектом оптимизации в медицинской химии [255]. Метод расчета clogP, реализованный в DataWarrior, признан одним из наиболее точных в независимом исследовании [258]. Учитывая предполагаемый пероральный путь введения в качестве фильтра лекарственного подобия использовались правила GSK и Ro4.

На первом этапе были отсеяны соединения с высокой вероятностью проявления токсичности – потенциально мутагенные (171 соединение), потенциально онкогенные (160 соединений), с потенциальной репродуктивной токсичностью (103 соединения), потенциально местно-раздражающие (130 соединений). Всего, в силу наличия у ряда соединений нескольких маркеров токсичности, из 2309 соединений было отсеяно 361 соединение.

Далее был применен фильтр лекарственного подобия GSK, предложенный в работе Glisson [82]. Полностью удовлетворяли критериям GSK 1190 соединений. Учитывая, что любые правила лекарственного подобия носят рекомендательный характер, их «слепое» применение может привести к исключению из исследования биологически активных и пригодных для дальнейшей оптимизации соединений. Сами разработчики критерия GSK позиционировали их как ориентиры на этапе hit-to-lead разработки и оптимизации соединений-лидеров для определения вероятных ADMET проблем с обязательным учетом состояния ионизации молекулы [82]. Также, ряд авторов указывает на необходимость «смягчения» правил лекарственного подобия [436]. По этой причине соединения с молярной массой более 400 Да и показателем липофильности $clogP$ более 4 не были исключены из исследования, однако приоритет при отборе соединений для первичной экспериментальной оценки биологической активности отдавался соединениям, удовлетворяющим данным критериям.

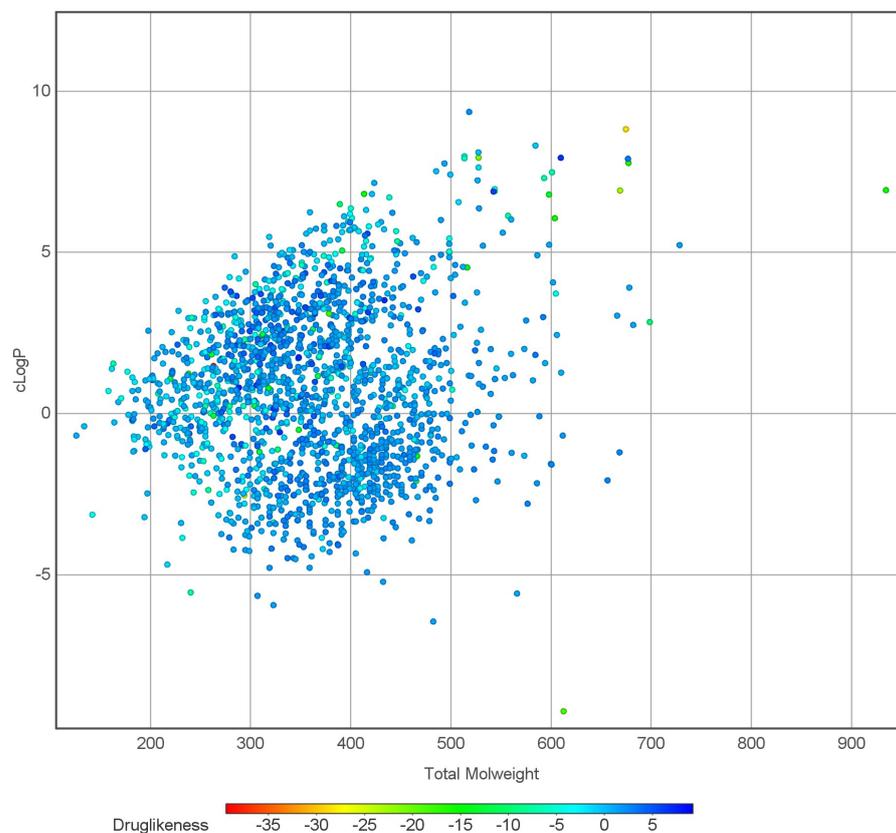


Рисунок 6 – Распределение библиотеки исследуемых соединений по параметрам молекулярный вес и $clogP$ после удаления соединений с высокой вероятностью проявления токсических свойств.

3.2.2. Анализ скаффолдов

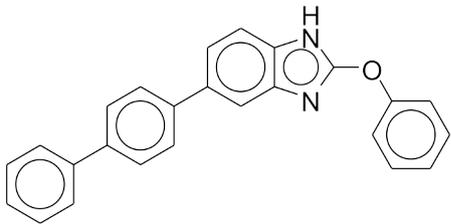
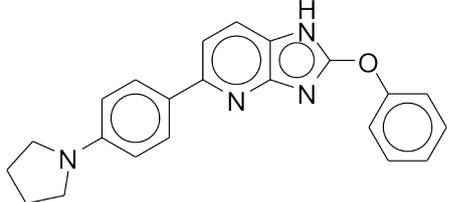
Концепция скаффолда – одна из наиболее часто используемых в поиске фармакологически активных веществ, при этом не имеющая точного общепринятого определения [256]. Термин «скаффолд» используется для описания структуры ядра молекулы, которое используется при разработке ЛС или при виртуальном скрининге, и, кроме того, как синтетический строительный блок, при этом границы между понятиями «скаффолд», «подструктура» и «фрагмент» часто размыты. Внутри ряда аналогичных соединений скаффолд может быть получен путем определения их максимальной общей субструктуры, но есть много других способов определения каркасов. С точки зрения хемоинформатики и медицинской химии скаффолд можно рассматривать как общую наименьшую подструктуру ряда соединений, как правило являющуюся их центральной циклической системой [216], или как «центральный молекулярный фрагмент, общий для всех членов заданного структурного ряда химических соединений» (определение, даваемое «Глоссарием русскоязычных терминов в медицинской химии» [223]). Группирование соединений в соответствии с их химическим сходством, кластеризация и определение скаффолда (каркаса) соединения находят широкое применение в разработке скрининговых библиотек для первичного поиска активных соединений и их последующей валидации [286].

В настоящее время разработано много систематических подходов к кластеризации соединений по общим компонентам подструктуры. Эти методы основаны на систематической идентификации циклических систем в химических структурах с помощью алгоритмов. Встроенные в DataWarrior модули позволяют проводить автоматический анализ скаффолдов в соответствии с наиболее широко распространёнными методами. В настоящей работе для анализа скаффолдов был использован метод, предложенный Bemis и Murcko [34], часто называемый как скаффолд Мурко. Он содержит все простые циклические системы данной молекулы и все прямые связи между ними. Заместители, не содержащие циклов, удаляются. Иерархический подход к определению каркаса молекулы, предложенный Bemis и Murcko, обеспечивает единообразную и общеприменимую система отсчета для определения скаффолда. Несмотря на некоторые недостатки (отдельные скаффолды Мурко могут фактически описывать очень похожие структуры, которые различаются, например, только положением одного гетероатома или кратностью связи), подход Bemis и Murcko в настоящее время, вероятно, наиболее широко применяется для характеристики молекулярных скаффолдов [329].

База данных ChEMBL [47] является крупнейшим первичным источником открытых вручную извлеченных и отобранных биологических данных о взаимосвязи структуры и активности соединений, опубликованных в ключевых изданиях в области медицинской химии и патентной литературе. Первичная данные, зафиксированные в базе данных ChEMBL, – связь между лигандом и биологической мишенью в форме показателя (отрицательного десятичного логарифма) экспериментально измеренной конечной точки активности, например, полумаксимальной ингибирующей концентрации IC_{50} . На момент написания работы в актуальной версии ChEMBL 28 содержатся данные о 14 347 мишенях, 2 086 898 соединениях и 17 276 334 измеренных активностях из 80 480 публикаций. Наличие не только web-интерфейса (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>), но и возможности прямого экспорта информации и гибкого программного доступа позволяет использовать ChEMBL для решения широкого ряда хемоинформатических задач в целях разработки ЛС [48].

Для анализа наиболее распространенных скаффолдов соединений, регулирующих активность целевых биологических мишеней, был использован сервис Bioactivity-explorer [36] – веб-приложение для интерактивной визуализации и исследования крупномасштабных данных о биологической активности соединений, хранящихся в ChEMBL, доступное на момент выполнения настоящей работы по адресу <http://cadd.pharmacy.nankai.edu.cn/b17r>. Рассматривались только активности с действительными значениями показателей IC_{50} , EC_{50} , K_i и т.д.). После получения скаффолдов Мурко было выполнено их ранжирование по агрегированным значениям активностей соединений данного скаффолда по отношению к данной биомишени. Скаффолды наиболее активных соединений, влияющих на целевые биомишени, приведены в табл. 2.

Таблица 9 – Скаффолды наиболее активных активаторов АМФ-активируемой протеинкиназы человека (АМПК) $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ (ChEMBL2111345)

Скаффолд	Активность соединений, pEC_{50}			
	Максимальная	Средняя	Медианная	Минимальная
	9	9	9	9
	9	9	9	9

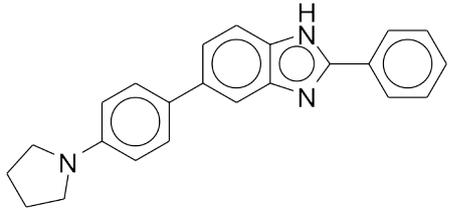
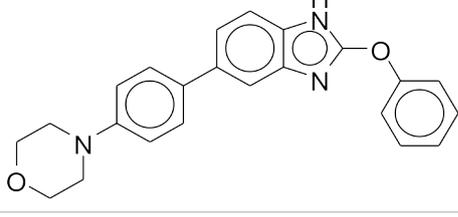
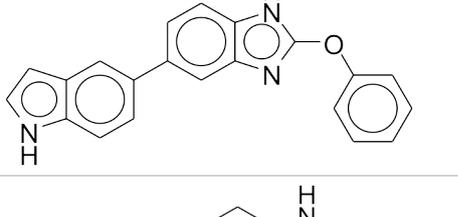
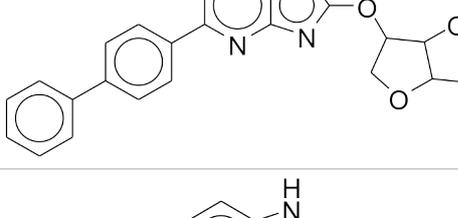
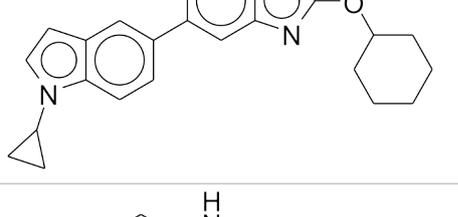
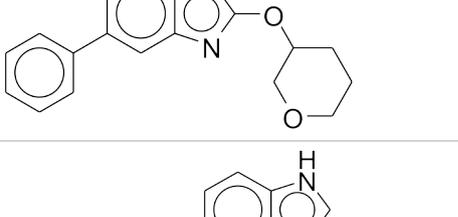
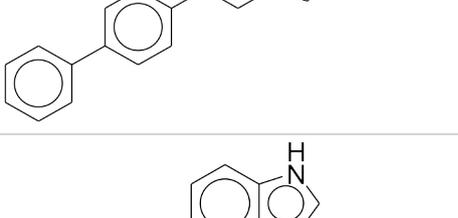
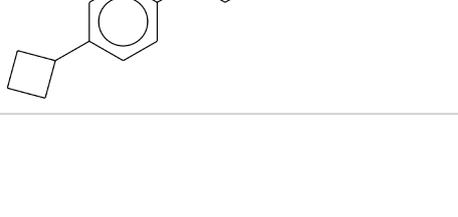
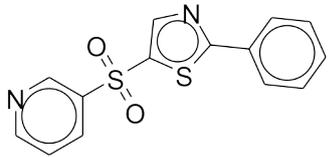
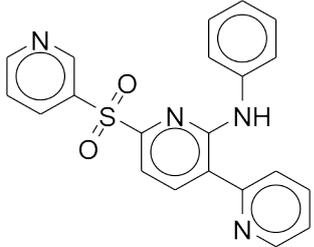
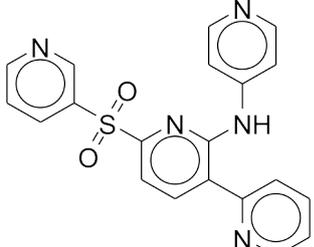
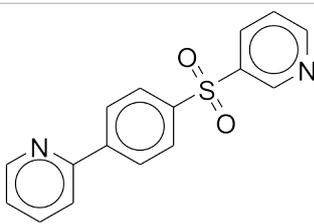
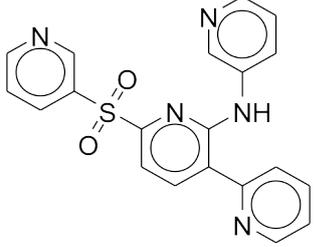
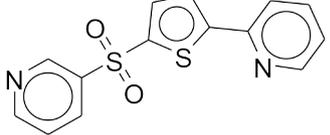
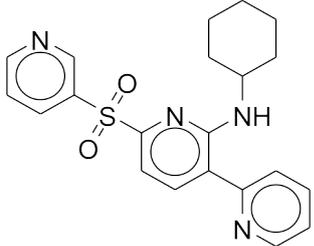
	8,96	8,96	8,96	8,96
	8,92	8,92	8,92	8,92
	9,22	8,87	8,87	8,52
	8,52	8,52	8,52	8,52
	8,4	8,4	8,4	8,4
	8,4	8,4	8,4	8,4
	8,27	8,27	8,27	8,27
	8,12	8,12	8,12	8,12

Таблица 10 – Скаффолды наиболее активных активаторов глюкокиназы человека (GSK, CHEMBL3885579)

Скаффолд	Активность соединений, рEC ₅₀			
	Максимальная	Средняя	Медианная	Минимальная
	8,22	7,44	7,64	6,27
	8,15	8,15	8,15	8,15
	7,82	7,82	7,82	7,82
	7,68	6,63	6,68	5,35
	7,42	7,42	7,42	7,42
	7,29	7,09	7,09	6,89
	7,00	7,00	7,00	7,00

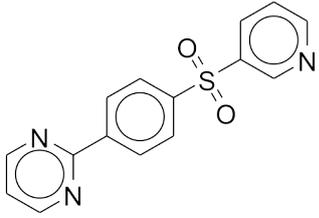
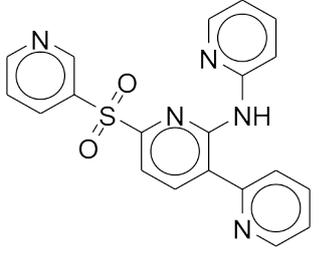
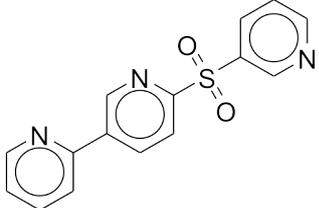
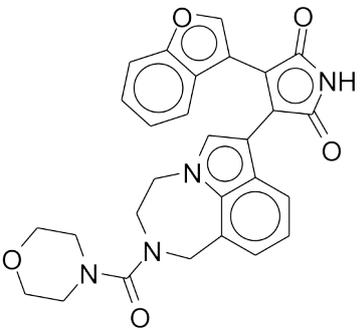
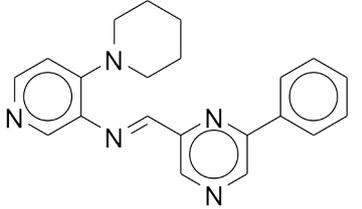
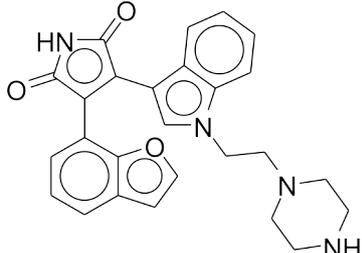
	6,98	6,98	6,98	6,98
	6,92	6,92	6,92	6,92
	6,85	6,74	6,82	6,54

Таблица 11 – Скаффолды наиболее активных ингибиторов киназы гликогенсинтазы человека типа 3В (GSK3В, ChEMBL262)

Скаффолд	Активность соединений, рEC ₅₀			
	Максимальная	Средняя	Медианная	Минимальная
	10,89	10,89	10,89	10,89
	10	9,1	9,7	7,01
	9,85	9,85	9,85	9,85

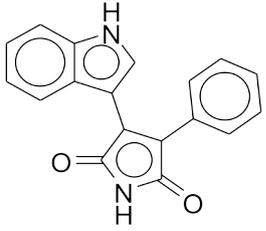
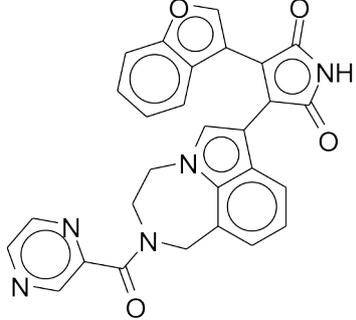
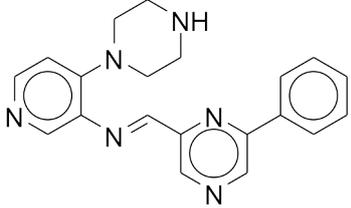
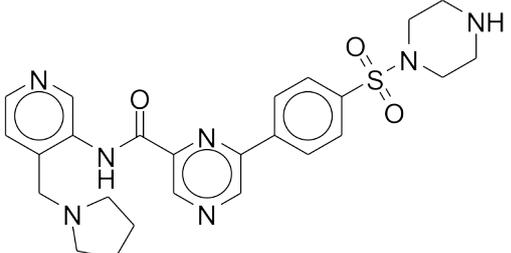
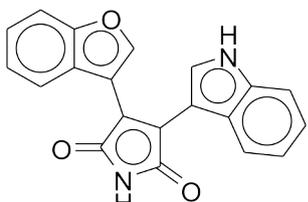
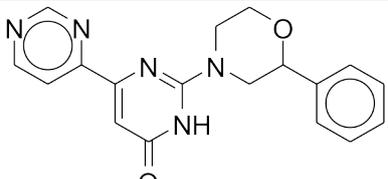
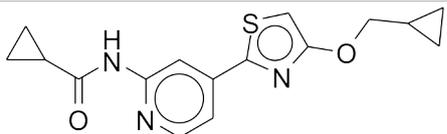
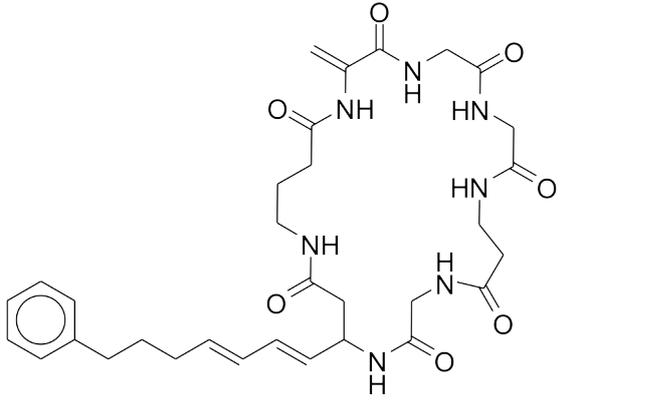
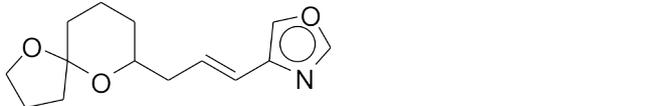
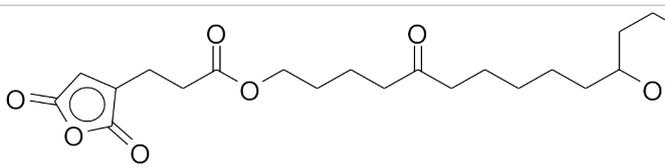
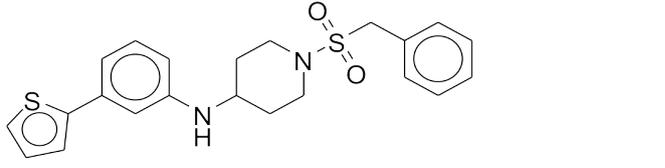
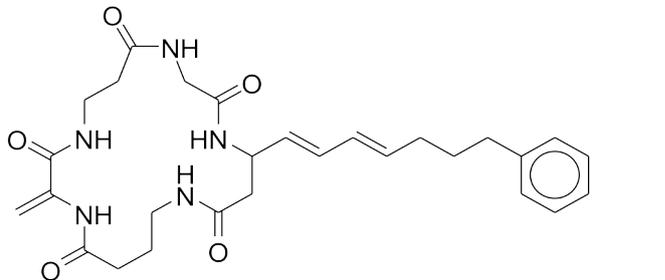
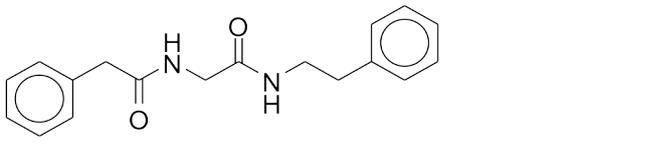
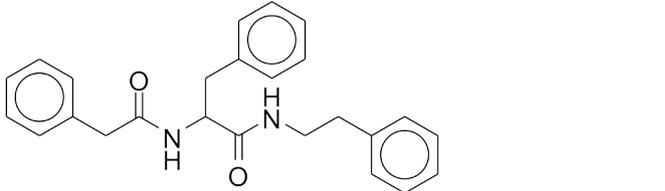
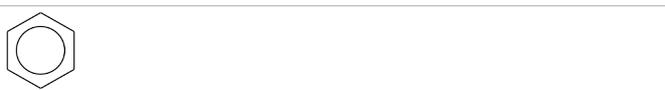
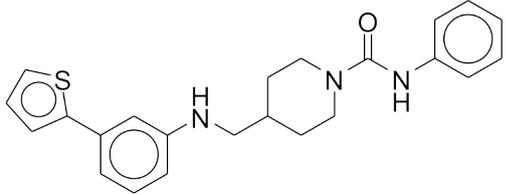
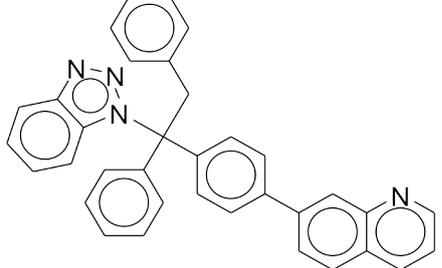
	9,75	7,79	7,92	5,89
	9,7	9,7	9,7	9,7
	9,7	9,7	9,7	9,7
	9,66	9,66	9,66	9,66
	9,64	7,59	7,46	6,06
	9,64	8,66	8,52	7,89
	9,54	9,54	9,54	9,54

Таблица 12 – Скаффолды наиболее активных ингибиторов протеин-тирозинфосфатазы типа 1 β (PTP1B, ChEMBL335)

Скаффолд	Активность соединений, pEC ₅₀
----------	--

	Максимальн ая	Средн я	Медианн ая	Минимальн ая
	9,46	9,46	9,46	9,46
	9,25	9,04	9,04	8,83
	9,17	9,17	9,17	9,17
	9,17	8,16	8,26	5,7
	8,95	8,95	8,95	8,95
	8,85	8,35	8,62	7,58
	8,77	7,37	7,27	6,17
	8,62	5,08	4,85	2,92

	8,52	8,42	8,52	8,15
	8,3	8,3	8,3	8,3

3.2.3. Анализ подобию известным антидиабетическим соединениям

Молекулярное сходство – одна из ключевых концепций в разработке ЛС, обычно используемая при поиске новых перспективных молекул. Она основана на предположении о том, что две молекулы часто имеют сходные физические и биологические свойства, если они похожи по структуре. Этот принцип подобию широко используется на ранних этапах разработки ЛС, особенно при проведении виртуального скрининга для фильтрации больших баз данных соединений. Молекулярное сходство также использовалось для оптимизации эффективности и фармакокинетических свойств соединений-лидеров на основе их взаимосвязи между структурой и активностью. Методологические достижения в оценке молекулярного сходства с указанием преимуществ, недостатков и областей применения обобщены в обзоре [118].

Принципиальные компоненты анализа молекулярного сходства – это структурное представление молекулы и количественное измерение сходства между двумя структурными представлениями. Предложено множество типов структурных представлений, которые можно разделить на 2D- и 3D-методы. Методы 2D-подобия полагаются только на 2D-структурную информацию и включают поиск субструктуры, поиск сходства отпечатков и методы на основе двухмерных дескрипторов. 3D-методы учитывают пространственную конформацию молекулы и включают моделирование фармакофора, методы на основе молекулярных полей, молекулярные графы, 3D-отпечатки и т.д. Анализ подобию на основе трехмерной формы лигандов стал предпочтительным методом благодаря большей информативности и возможности идентифицировать скаффолды, отличные от искомого. Существуют и различные методы количественной оценки сходства между двумя структурными представлениями, например, коэффициент Танимото, евклидово расстояние, индекс Дайса, индекс Тверски и др.

Лиганд-ориентированные подходы в разработке ЛС используют информацию об известных биоактивных лигандах для идентификации соединений с аналогичной биологической активностью [128]. Чтобы расширить химическое пространство при поиске активных соединений, мы предлагаем метод лиганд-ориентированного виртуального скрининга, в котором поиск сходства сосредоточен на скаффолде исходных соединений, а не на целых молекулах. В предложенном методе соединения, подобные запрашиваемому скаффолду, выявляются в большой библиотеке соединений и служат отправными точками при выборе соединений для экспериментального скрининга.

Учитывая необходимость скрининга соединений по способности связывания с белками-мишенями, для описания структур библиотеки исследуемых соединений был использован дескриптор DataWarrior Flexophore, позволяющий прогнозировать сходство 3D-фармакофоров молекул. Высокое сходство флексофоров указывает на то, что значительная часть конформеров обеих молекул схожа в отношении формы, размера, гибкости и фармакофорных точек. В отличие от обычных подходов к 3D-фармакофорам, этот дескриптор рассчитывается на основе набора конформеров молекулы, а не сравнивает отдельные конформеры, что приводит к более высокой предсказуемости и учету молекулярной гибкости [57]. Для количественной оценки сходства флексофоров был использован коэффициент Танимото [425], который является наиболее популярной и широко используемой мерой сходства, валидность и сравнительная эффективность которого для вычисления молекулярного сходства была показана ранее [32].

3.3. Лиганд-ориентированный скрининг *in silico*

Начальный отбор соединений для мишень-ориентированного экспериментального скрининга осуществлялся на основе лиганд-ориентированного подхода. Выполнялся расчет молекулярного сходства соединений из библиотеки доступных соединений к скаффолдам наиболее активных низкомолекулярных лигандов целевых биологических мишеней. Критерием сходства было выбрано значение коэффициента Танимото $\geq 0,8$. После отбора соединений по схожести к каждому из целевых скаффолдов и удаления дублирующихся соединений оставшиеся ранжировались по величине убывания молекулярного сходства. Подобные подходы хорошо зарекомендовали себя именно при формировании небольших фокусированных библиотек соединений [260].

3.4. Формирование мишень-фокусированных библиотек соединений

Последний этап хемоинформатической подготовки заключался в формировании мишень-фокусированных библиотек соединений из библиотеки всех соединений, доступных для исследования. Учитывая средний размер библиотеки (1948 соединений), был использован комбинированный подход, использующий полученные ранее расчетные значения молекулярных дескрипторов и экспертную оценку. На первом этапе соединения отбирались по консенсусу хемоинформатических оценок. После удаления соединений с высокой вероятностью проявления токсических свойств каждому оставшемуся соединению присваивался соответствующий балл при отсутствии нарушения правил лекарственного подобия и по величине фармакофорного сходства к наиболее активным известным лигандам конкретной биологической мишени, депонированным в ChEMBL. На втором этапе структуры отобранных стартовых соединений оценивались визуально. Учитывая, что исходная библиотека сформирована из соединений, синтезированных несколькими группами органических химиков, она представляет собой коллекцию серий производных, полученных общими или близкими синтетическими подходами. Основу каждой серии составляет одна или несколько родственных циклических систем, производные, составляющие серию, отличаются набором и строением заместителей и боковых цепей. Такие серии представляют собой удобные стартовые точки для начальных этапов скрининга и выявления взаимосвязей «структура-активность». Таким образом, заключительный этап формирования мишень-фокусированных библиотек заключался в экспертной оценке структур, отобранных на основании консенсуса хемоинформатических оценок, и подбору их аналогов с различными паттернами замещения на основе имеющихся литературных данных и мишень-специфических особенностей сайтов связывания.

На основании проведенного хемоинформатического анализа были выбраны соединения для экспериментального изучения. Конечным результатом стали 4 мишень-фокусированные библиотеки, содержащие соединения с благоприятными расчетными ADMET-характеристиками, высоким структурным родством к известным активным соединениям и достаточной степенью структурного разнообразия (см. Приложения 2–5). Последнее необходимо на первых раундах скрининга для увеличения вероятности обнаружения активных соединений с неописанными ранее скаффолдами не только для повышения научной новизны полученных результатов, но и для обеспечения их патентной чистоты [124; 370].

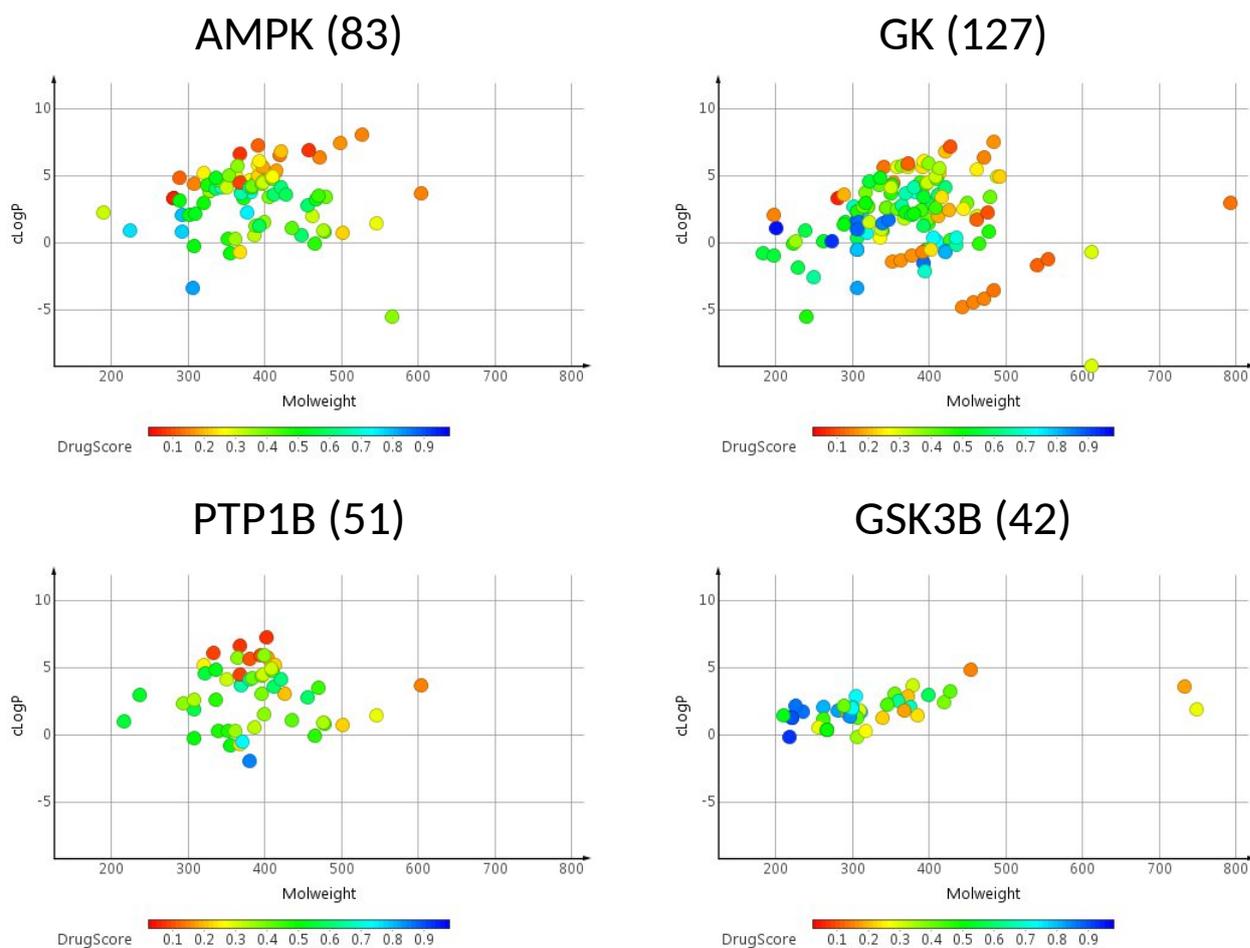


Рисунок 7 – Мишень-фокусированные библиотеки соединений.

3.5. Анализ и отсев ложноположительных соединений (PAINS-анализ)

Категория проблемных PAINS-соединений (акроним от англ. «pan assay interference compounds») была предложена Jonathan V. Baell в 2009 году [31], при этом сама проблема ложноактивных соединений привлекала внимание исследователей с момента широкого внедрения методов высокопроизводительного скрининга. В целом, PAINS-соединениями называют соединения, дающие ложноположительные результаты в разнообразных скрининговых методиках в силу своих физико-химических свойств. Наиболее частыми причинами являются способность образовывать агрегаты [229], неспецифическая реакционная способность (ковалентная модификация белка) [150], или прямое влияние на используемый аналитический метод, плохая растворимость или нестабильность в водном ДМСО [275]. Типичными примерами PAINS-соединений являются роданины, фенольные основания Манниха, гидроксифенилгидразоны, алкилиденбарбитураты, алкилиденгетероциклы, 1,2,3-аралкилпирролы, активированные бензофуразаны, 2-амино-3-карбонилтиофены, катехолы и хиноны [30].

В настоящее время удаление PAINS-соединений является одним из первых шагов при формировании библиотеки соединений для скрининга во многих фармацевтических компаниях. Для этого разработаны ряд подструктурных фильтров [30; 40; 242]. Предварительная фильтрация проблемных соединений, которые, вероятно, будут отброшены позже, является мерой экономии времени и средств при проведении скрининга и оптимизации активных соединений.

При этом нельзя категорически исключить, что соединения с субструктурами, которые классифицируются как PAINS, теоретически могут быть жизнеспособными начальными точками для разработки ЛС. Например, некоторые роданиноподобные соединения разрабатывались в качестве селективных ингибиторов PI3K γ [78]. Некоторые клинически одобренные ЛС также содержат подструктуры PAINS [30]. Однако, как правило, фрагменты, которые распознаются такими фильтрами, также часто связаны токсичностью, реакционной способностью или метаболической нестойкостью. Таким образом, применение подструктурных фильтров может удалить некоторые потенциально перспективные соединения. Как указывают Pearce et al. [242], эти фильтры лучше использовать на стадии обработки результатов скрининга на более позднем этапе, чем для строгого отсеивания соединений.

По этой причине мы применяли PAINS-фильтры на стадии валидации экспериментально показанной активности соединений. Для оценки вероятности принадлежности соединения к PAINS был использован сервис Aggregator Advisor (<http://advisor.bkslab.org/search/>) [23] и Hit Dexter 2.0 (<https://nerdd.univie.ac.at/hitdexter/>) [98], использующие вместо простых подструктурных фильтров методы оценки молекулярного сходства и машинного обучения. Экспериментальные методы валидации включали проведение скрининга в присутствии детергента (0,01% Тритона X-100), определение коэффициента Хилла и визуальную оценку формы кривой IC₅₀, определение IC₅₀ в присутствии и отсутствии детергента, спектрофотометрическое определение способности связывать тиольную группу дитиотреитола.

3.6. Заключение

Предложенная система мишень-ориентированного поиска использует открытые программные инструменты и базы данных, технически проста, отличается легкостью освоения, гибкостью и масштабируемостью, а значит может быть использована для поддержки принятия решений в других проектах доклинической разработки потенциальных лекарственных средств. Ее использование позволяет сконцентрировать усилия на валидированных мишенях, перспективных для разработки ЛС. Этот этап целеполагания является краеугольным и критически важным для любого проекта разработки ЛС, претендующего на практическую значимость.

Комбинированное использование вычислительных средств и экспертной оценки позволяет одновременно обрабатывать большие исходные массивы данных о структуре и активности соединений и исключить использование технически сложного и дорогостоящего высокопроизводительного скрининга, сфокусировав ресурсы на наиболее перспективных молекулах, на ранних этапах отсеив соединения, которые с высокой степенью вероятности не станут успешными клиническими кандидатами.

По сравнению с классическим подходом высокопроизводительного скрининга предложенный в работе подход рационального формирования библиотек соединений, отличающихся высоким лекарственным подобием, структурным разнообразием и схожестью с известными активными соединениями, является время- и ресурсоэффективным.

Важной частью системы является отсев ложноактивных соединений. Несмотря на то, что категория PAINS-соединений и методические подходы их обнаружения были предложены J. Baell еще в 2009 году [31], данной проблеме в академической науке уделяется преступно мало внимания, учитывая какими временными, финансовыми и репутационными потерями грозит продвижение таких соединений на более поздние стадии исследования.

Ограничением использованного подхода со стороны хемоинформатики следует признать опору на уже исследованные и описанные в научных источниках биологически активные соединения. С одной стороны, это ведет к преимущественному отбору для экспериментального исследования соединений, принадлежащих к той же области химического пространства и снижению вероятности обнаружения малых молекул, принадлежащих к принципиально новым скаффолдам и хемотипам. С другой стороны, альтернативные мишень-основанные подходы компьютерно-ориентированной разработки ЛС также имеют существенные недостатки. Доступные и вычислительно малозатратные методы, такие как простой молекулярный докинг, до сих пор нельзя считать удовлетворительными и надежными по точности и предсказательной силе [267; 312], несмотря на их очевидную важность. Кроме того, затруднено их применения для мембранных и конформационно лабильных белков [324], ковалентных ингибиторов [174], а полученные результаты в силу несовершенства оценивающих функций требуют визуальной инспекции и достаточно высокой компетентности [58]. Применение же более адекватно и полно описывающих взаимодействие лиганд-белок методов (динамический и ансамблевый докинг, молекулярная динамика, машинное обучение) требует значительных вычислительных ресурсов и разработки более совершенных и доступных методов симуляции [284]. Лиганд-ориентированный подход, использованный в работе, более консервативен, но повышает вероятность успеха. Действительно, как показывает систематический обзор Ripphausen и соавт. [422], большинство методологически обоснованных лиганд-ориентированных исследований действительно идентифицировали новые активные соединения, скаффолды которых не

присутствовали в основных хранилищах биоактивных молекул до момента их публикации. Кроме того, около 30% найденных соединений обладали активностью в субмикромольном диапазоне. Обзор проспективных виртуальных скрининговых исследований показывает, что, хотя большинство публикаций использует методы, основанные на знании структуры мишени, лиганд-ориентированные подходы позволяют идентифицировать соединения, которые в среднем являются более активными [410].

Глава 4. Поиск ингибиторов GSK3B. Фармакологические свойства ингибитора GSK3B K-167

4.1. Экспериментальный скрининг. Взаимосвязи «структура-активность»

Для соединений из GSK3B-фокусированной библиотеки, сформированной как описано выше, было определено влияние на активность человеческой рекомбинантной киназы GSK3B в микропланшетном формате. Опосредованное GSK3B фосфорилирование фрагмента мышечной гликогенсинтазы человека типа 1 оценивали в присутствии 25 мкМ АТФ с использованием люминесцентного анализа методом ADP-Glo™ (Promega, США). АТФ-конкурентный ингибитор 3-(2,4-дихлорфенил)-4-(1-метил-1*H*-индол-3-ил)-1*H*-пиррол-2,5-дион (SB-216763) [337] использовали в качестве положительного контрольного соединения.

На начальном этапе 42 соединения исследовались в концентрации 10 мкМ в двух сериях (см. Приложение 2). Было показано, что ядро 3-арилидена-2-оксиндола явно более предпочтительно для проявления активности (18 активных соединений). Среди других серий производных было выявлено только два активных соединения – K-215 и K-237. Последующие эксперименты с активными соединениями проводили в диапазоне концентраций ингибиторов от 0,1 нМ до 100 мкМ для определения величин IC₅₀. Данные по наиболее активным соединениям обобщены в таблице 3. Всего выявлено 16 ингибиторов, из них 4 – с субмикромольной активностью.

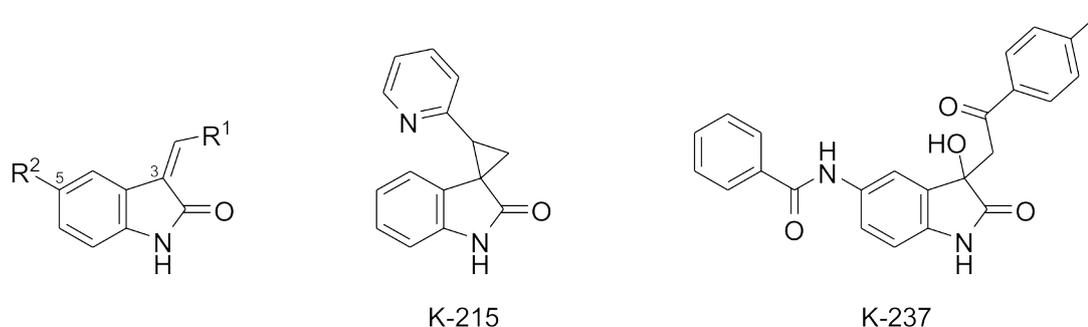
В результате было выявлено соединение-лидер 3-(2-пиридинилметил)-2-оксиндол (K-167), наномольный ингибитор GSK3B. Структурно близкие производные 3-фенилиден-2-оксиндола K-110, K-165 и K-170(1) являются субмикромольными ингибиторами GSK3B, что указывает на важность электронодонорного заместителя в 3-арилиденовом фрагменте для проявления ингибирующей активности. Боковые цепи ацетамидного и карбаматного типа в положении 5 2-оксиндола хорошо переносятся, в то время как громоздкий бензамид делает соединение K-248 значительно менее активным. Однако, карбаматная группа склонна к гидролизу и может быть метаболически нестабильна. Таким образом, можно заключить, что ацетамидный фрагмент в положении 5 является более привлекательным для дальнейших усилий по оптимизации и улучшения селективности ингибиторов данного класса, что подтверждается ранее опубликованными работами [153; 181].

Важность двойной углерод-углеродной связи в положении 3 2-оксиндольного ядра подтверждена при исследовании ряда соединений, содержащих sp³-гибридизированный атом C³. Установлено, что 3-гидрокси-3-алкилильные аналоги практически неактивны (полные данные опубликованы в [184]), за исключением соединения K-237, которое сохраняет микромольную

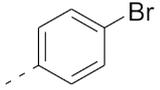
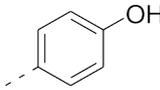
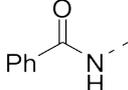
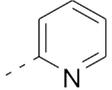
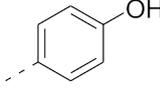
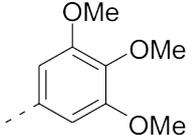
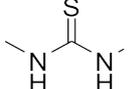
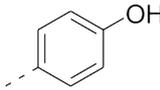
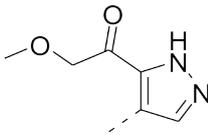
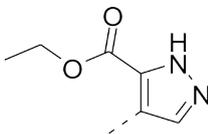
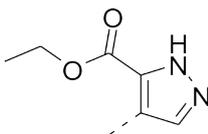
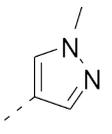
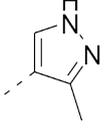
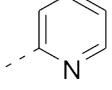
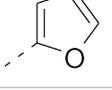
величину IC_{50} . В совокупности, эти данные подчеркивают необходимость 3-арилденевого фрагмента для ингибирования GSK3B 2-оксиндолами.

Вариабельность гетероциклического фрагмента в положении 3 изучалась на примере производных пиридина, пиразола и тиофена. Все они показали активность в микромолярном диапазоне, уступающую соединению-лидеру K-167. Наибольшую активность продемонстрировал 3-(5-этоксикарбонилпиразол-4-илиден)-5-нитро-2-оксиндол KL-4. Интересно отметить, что, вопреки ожиданиям, введение 5-нитро заместителя в структуру K-167 вело к падению активности. Это указывает на неаддитивные взаимодействия между R^1 и R^2 , что осложняет будущую работу по оптимизации данных соединений для повышения GSK3B-ингибирующих свойств.

Таблица 13 – Химическая структура и ингибирование GSK3B наиболее активными соединениями



№	Шифр соединения	R^1	R^2	Ингибирование GSK3B в 10 мкМ ($m \pm SD$), %	GSK3B IC_{50} ($\pm SE$), мкМ
1.	DM-9			55,77 \pm 7,87*	>>50
2.	K-110			84,16 \pm 12,92*	0,233 \pm 0,041
3.	K-165			91,82 \pm 2,95*	0,155 \pm 0,018
4.	K-167		H	95,7 \pm 4,45*	0,0042 \pm 0,0007
5.	K-170(1)			69,29 \pm 11,46*	0,348 \pm 0,012
6.	K-215	—	—	71,29 \pm 4,75*	1,231 \pm 0,344

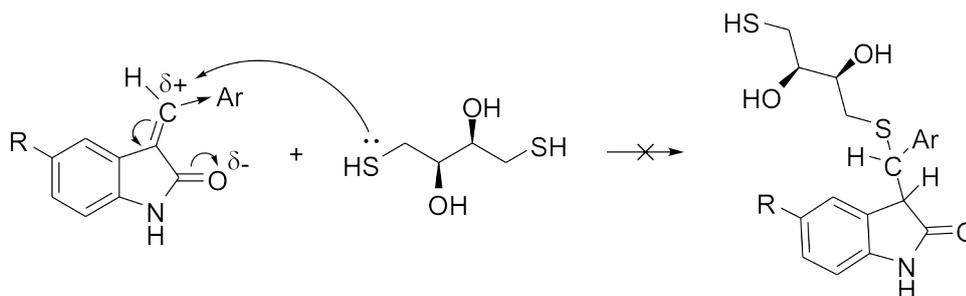
7.	K-235		Br	43,83±8,41*	>>50
8.	K-237	—	—	64,25±5,68*	1,717±0,411
9.	K-248			58,94±7,97*	4,343±0,217
10.	KL-15			35,15±12,45	>>50
11.	KL-16			44,91±7,84*	34,44±17,66
12.	K-168(2)			58,52±7,53*	>>50
13.	KL-23		H	39,29±1,14*	3,15±1,60
14.	KL-3		H	37,85±4,32*	6,72±0,13
15.	KL-4		NO ₂	85,9±4,67*	1,77±0,08
16.	KL-6		H	64,5±8,69*	10,03±3,51
17.	KL-7		H	32,76±4,77*	13,49±3,16
18.	KL-9		H	49,2±8,63*	5,68±1,6
19.	OIP-NO2-2		NO ₂	87,6±1,87*	20,01±3,68
20.	OIP-NO2-O		NO ₂	80,13±0,13*	12,75±3,54
21.	Вещество сравнения	—	—	93,23±14,50*	0,0084±0,002

SB-216763				
-----------	--	--	--	--

Примечание: * $p < 0,05$ к отрицательному контролю (тест Манна-Уитни).

Учитывая, что большинство выявленных ингибиторов GSK3B содержит выраженный электрофильный центр, обусловленный отрицательным мезомерным эффектом карбонильной группы, сопряженной с двойной углерод-углеродной связью и ароматическим циклом в положении 3, существует риск ковалентной модификации нуклеофильных аминокислот белка, таких как серин. В условиях микропланшетного скрининга это может вести к неспецифической инактивации фермента и, следовательно, ложноположительным результатам. Для проверки этой возможности наиболее активные соединения были исследованы на связывание нуклеофильного дитиотреитола (ДТТ). Даже в концентрации 20 мкМ убывь ДТТ после инкубации с веществами была пренебрежимо малой (Табл. 8), что позволяет валидировать данные соединения как истинные ингибиторы киназы GSK3B.

Таблица 14 – Валидация наиболее активных соединений в концентрации 20 мкМ по связыванию ДТТ



№	Шифр соединения	Связывание ДТТ ($m \pm SD$), %
1.	K-110	2,34 \pm 2,86
2.	K-127	2,62 \pm 3,51
3.	K-165	1,12 \pm 2,09
4.	K-166	-1,59 \pm 1,16
5.	K-167	1,91 \pm 1,68
6.	K-237	-11,83 \pm 9,69
7.	K-246	3,36 \pm 4,03

4.2. Оценка активности и цитотоксичности выявленных ингибиторов GSK3B на клеточных моделях

Активный центр GSK3B имеет высокий уровень гомологии с центрами семейства циклин-зависимых киназ (CDK) [4; 204], что может привести к токсическим эффектам неселективных ингибиторов. В частности, ингибирование CDK связано с токсичностью в отношении

моноклеарных клеток периферической крови [155]. Для оценки цитотоксичности наиболее активных соединений, идентифицированных как ингибиторы GSK3B со значениями IC_{50} ниже 10 мкМ, оценивалось их влияние на жизнеспособность моноцитов периферической крови человека после 24 часов инкубации с помощью МТТ-теста. Как показано на рисунке 6, только соединение К-248 проявляло значимую цитотоксичность в концентрации 10 мкМ. Другие соединения, включая соединение-лидер К-167, нетоксичны для моноцитов даже в концентрациях, которые намного выше соответствующих значений IC_{50} , полученных при функциональном анализе GSK3B.

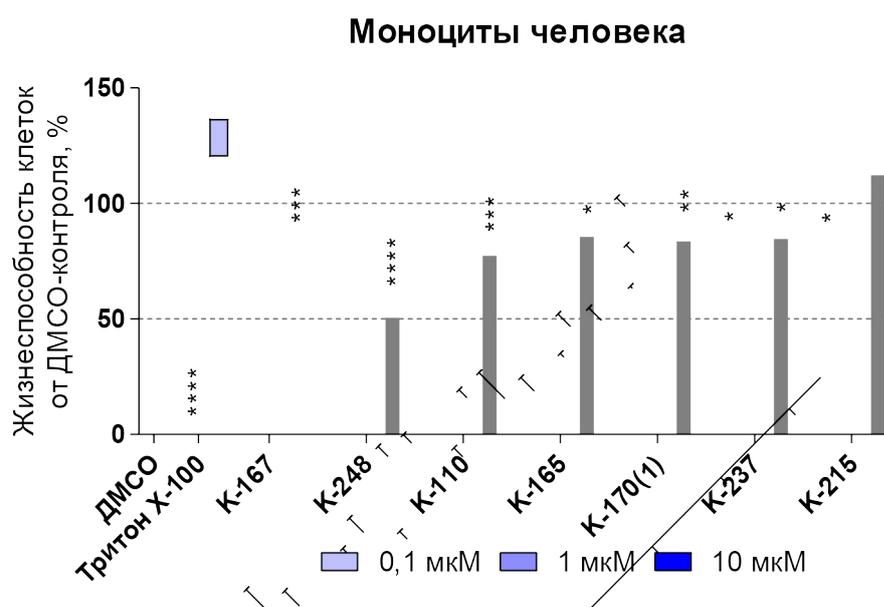


Рисунок 8 – Жизнеспособность человеческих моноцитов в присутствии выявленных ингибиторов GSK3B по данным МТТ-теста. Данные представлены как среднее±SD, n = 4. Статистическая значимость к ДМСО-контролю (1-сторонний ANOVA с пост-тестом Даннетта): * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$; **** $p < 0.0001$.

Также была определена цитотоксичность наиболее активных соединений на нормальных эмбриональных клетках почек человека HEK293 после 72 часов инкубации¹⁰. Цитотоксичность большинства соединений существенно уступает препаратам сравнения. Соединение-лидер К-167 является цитотоксическим в концентрациях в 1000 раз выше необходимых для ингибирования GSK3B и, следовательно, обеспечивает достаточную терапевтическую широту для проявления антидиабетического эффекта.

Таблица 15 – Цитотоксичность выявленных ингибиторов GSK3B на клетках HEK293 согласно МТТ-тесту

Соединение	HEK293 CC_{50} (±SE), мкМ
------------	-----------------------------

¹⁰ Выражаем благодарность за проведенные исследования Л.В. Аникиной и М.В. Проскуриной (Институт физиологически активных веществ РАН, г. Черноголовка).

К-110	46,74±2,37
К-165	29,86±1,11
К-167	41,95±0,15
К-170(1)	81,08±3,57
К-215	>>100
К-235	17,55±0,13
К-237	>>100
К-248	77,73±1,05
Доксорубицин	11,46±1,52

Известно, что активная GSK3 β стимулирует экспрессию провоспалительных генов, являясь участниками сигнальных каскадов рецепторов TLR и TNFR1, в то время как ингибирование GSK3 ограничивает воспалительные процессы на животных моделях [86; 114]. GSK3 β рассматривается как важный регулятор воспаления, вызванного ожирением, что особенно ценно для терапии СД2 и метаболического синдрома, связанных с вызванной ожирением M1-поляризацией макрофагов жировой и мышечной ткани [109].

В этой связи на следующем этапе оценивалось влияние наиболее активных ингибиторов GSK3 β на ЛПС-индуцированную провоспалительную активацию макрофагов мышей C57bl/6j. Маркерами M1-поляризации служили накопление в супернатанте клеток нитрит-аниона, стабильного продукта распада оксида азота NO, и провоспалительного интерлейкина 6 (ИЛ-6), известного медиатора метавоспаления при СД2 [237]. Параллельно оценивалась цитотоксичность соединений при 24-часовой инкубации.

Стимуляция перитонеальных макрофагов мышей C57bl/6j ЛПС *E. coli* O26:B6 в течение 24 часов вела к их активации и накоплению в культуральной среде оксида азота NO. Было показано, что выявленные ингибиторы GSK3 β подавляют индуцированную ЛПС продукцию NO в микромолярных концентрациях, уступая препарату сравнения дексаметазону. Наибольшую активность показали производные К-167 и К-248 (IC₅₀ 13,9 и 8,8 мкМ, соответственно). При этом все изученные соединения показали крайне низкую цитотоксичность по отношению к макрофагам. Подавление жизнеспособности клеток не наблюдалось вплоть до концентрации 20 мкМ.

Рисунок 9 – Влияние выявленных ингибиторов GSK3В на синтез оксида азота и жизнеспособность ЛПС-стимулированных макрофагов мышей C57bl/6j. Данные представлены как среднее \pm SD, n = 3.

Рисунок 10 – Влияние соединений-лидеров на секрецию интерлейкина 6 ЛПС-стимулированными макрофагами мышей C57bl/6j. Данные представлены как среднее±SD, n = 3.

Выявленные соединения-лидеры по противовоспалительной активности К-167 и К-248 также показали способность подавлять индуцированную ЛПС секрецию ИЛ-6. По данному показателю их активность была сопоставимой (IC_{50} 22,4 и 21,5 мкМ, соответственно). При этом, согласно альтернативному МТТ-тесту методу оценки цитотоксичности по активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в супернатанте клеток показано, что соединения не подавляют жизнеспособность макрофагов.

Для предварительной оценки антидиабетического потенциала выполнено исследование влияния соединений-лидеров на утилизацию глюкозы неонатальными фибробластами сердца крыс SD. Оба соединения, К-167 и К-248, существенно и статистически значимо стимулировали захват глюкозы при культивировании фибробластов в присутствии 25 мМ глюкозы в течение 24 часов. При этом в исследованной концентрации (20 мкМ) они не оказывали значимого влияния на жизнеспособность клеток.

Рисунок 11 – Влияние соединений-лидеров на утилизацию глюкозы и жизнеспособность неонатальных фибробластов сердца крыс. Данные представлены как среднее \pm SD, n = 5-6. Статистическая значимость к ДМСО-контролю (1-сторонний ANOVA с пост-тестом Даннетта).

Таким образом, по результатам исследований на клеточных моделях была показана низкая цитотоксичность выявленных ингибиторов GSK3B в отношении нормальных клеток человека (моноцитов и линии HEK293), макрофагов мышей и фибробластов крыс. Наибольшую противовоспалительную активность на ЛПС-стимулированных макрофагах мышей показали соединения K-167 и K-248. Так, в концентрации 20 мкМ они снижали секрецию ИЛ-6 и полностью подавляли продукцию NO, не оказывая статистически значимого негативного влияния на жизнеспособность клеток. В той же концентрации соединения-лидеры

стимулировали утилизацию глюкозы фибробластами в условиях, имитирующих гипергликемию. Таким образом, соединения К-167 и К-248 способны проникать через клеточные мембраны, подавляя GSK3B-опосредованные провоспалительные сигнальные пути и стимулируя усвоение глюкозы без цитотоксического действия в эффективных концентрациях. Это позволяет сделать вывод об отсутствии у них прямого иммунотоксического и цитотоксического действия и перспективности для дальнейшего изучения на целых животных как соединений с потенциальным комбинированным антидиабетическим и противовоспалительным действием.

4.3. Расчетные фармакокинетические и токсикологические характеристики выявленных ингибиторов GSK3B

Для уточнения перспективности дальнейшего фармакологического изучения соединений-лидеров К-167 и К-248 на целых животных был выполнен прогноз фармакокинетических и токсикологических свойств *in silico*, используя 5 наиболее распространенных интернет-сервисов ADMET. В связи с отсутствием используемых в клинической практике лекарственных препаратов с подобным механизмом действия, препарат сравнения отсутствует. Полученные результаты представлены в таблице 3.8.

Положительное значение коэффициента лекарственного подобия говорит о высокой перспективности дальнейшего исследования молекулы. Высокая адсорбция из ЖКТ, а также способность проникать через клеточные мембраны создает предпосылки для дальнейшего исследования вещества в виде пероральных лекарственных форм. Принадлежность к 4-му классу острой токсичности (малотоксичные вещества) говорит о возможном наличии широкого терапевтического интервала применения вещества и его низкой токсичности. Опасения вызывает возможное наличие мутагенности в тесте Эймса, гепато- и иммунотоксичности, оценка которых требует проведения дополнительных фармакологических исследований. В свою очередь, отсутствие канцерогенности, мутагенности и цитотоксичности является положительным моментом для дальнейшего углубленного изучения вещества. При планировании дальнейшего исследования необходимо проведение титрования дозы введения и определение порога, при котором могут быть выражены побочные эффекты.

Таблица 16 – Консенсусные прогнозные ADMET характеристики соединений К-167 и К-248

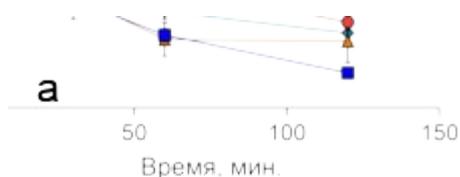
Показатель	К-167	К-248
Лекарственное подобие		
Коэффициент лекарственного подобия	2,702	-1,420
Фармакокинетические показатели		
Проницаемость в линии клеток Сасо-2	Проницаем	Проницаем
Локализация в клетке	Митохондрии	Митохондрии
Абсорбция в ЖКТ, %	93,42	91,43
Проницаемость ГЭБ	Да	Да
Объем распределения, л/кг	1,39	0,32
Токсикологические показатели		
Класс острой токсичности	4	4
Острая токсичность для крыс (LD ₅₀), мг/кг	796,81	1000,00
Хроническая токсичность для крыс, мг/кг/день	93,54	300,60
Максимальная переносимая доза для человека, мг/кг/день	0,416	0,877
Мутагенность (тест Эймса)	Возможна	Возможна
Канцерогенность	Нет	Нет
Гепатотоксичность	Возможна	Возможна
Иммунотоксичность	Возможна	Нет
Мутагенность	Нет	Возможна
Цитотоксичность	Нет	Нет
Сенсибилизация кожи	Нет	Нет

4.4. Антигипергликемическая активность на животных при однократном введении

Известно, что ингибиторы GSK3B стимулируют утилизацию глюкозы и чувствительность к инсулину у грызунов с экспериментальным диабетом посредством нескольких механизмов, включая облегчение инсулинозависимого захвата глюкозы, снижение фосфорилирования IRS-1,

восстановление активности гликогенсинтазы и снижение экспрессии глюконеогенных ферментов фосфоенолпируваткарбонакиназы и глюкозо-6-фосфатазы [68; 111; 177].

Для подтверждения оценки ингибирования GSK3B соединениями-лидерами К-167 и К-248 *in vivo* они были исследованы в пероральном тесте толерантности к глюкозе на мышах с экспериментальным СД2. СД2 моделировался у самцов мышей C57BL/6J путем 5-месячного содержания на сбалансированной высокожировой диете (мыши DIO-C57BL/6J) [33]. Развитие резистентности к инсулину и нарушения толерантности к глюкозе у диабетических животных было подтверждено в предварительных экспериментах. Доза соединений была определена исходя из исследования [177] ингибитора GSK3B CHIR-99021 (GSK3B IC₅₀ 6,7 нМ). Для обеспечения максимальной биодоступности и исключения эффекта первого прохождения через печень соединения вводились внутривенно.



б

Рисунок 12 – Влияние соединений К-167, К-248 и метформина на гликемию при пероральном тесте толерантности к глюкозе у мышей с СД2 (DIO-C57BL/6J). Данные представлены как среднее±SD (n = 6). Статистическая значимость к контрольной группе (2-сторонний ANOVA с пост-тестом Туки): **p* <0,05, ***p* <0,01 (а) или непарный t-тест (б).

Введение соединения К-167 в дозе 30 мг/кг внутривнутрибрюшинно предотвращало развитие выраженного гипергликемического ответа после нагрузки глюкозой, эффективность была сравнима с действием 150 мг/кг метформина. Однако соединение К-248 не показало статистически значимого антигипергликемического эффекта ни по концентрации глюкозы в крови, ни по показателю площади под кривой глюкоза-время. Отсутствие антидиабетической активности при однократном введении, характерной для ингибиторов GSK3B, говорит о том, что соединение К-248 в исследованной дозе, по всей видимости, не способно ингибировать GSK3B. По этой причине оно было исключено из дальнейших исследований.

Соединение К-167 дополнительно исследовали на модели СД2 у крыс для уточнения эффективной дозы. СД2 моделировался у самцов крыс Wistar путем 2-недельного содержания на сбалансированной высокожировой диете и введения 35 мг/кг стрептозотоцина в.б. (крысы HFD+STZ) [52]. Ингибиторы дипептидилпептидазы типа 4 (DPP-4) действуют как инкретиномиметики и потенцируют секрецию и действие инсулина при сахарном диабете 2 типа [169]. Поэтому ингибитор DPP-4 вилдаглиптин использовался в качестве препарата сравнения в высокоэффективной дозе 10 мг/кг [42] в качестве положительного контроля. Соединения вводили внутривнутрибрюшинно для исключения возможного влияния пероральной биодоступности на эффективность.

Как показано на рисунке 3, у крыс с диабетом, получавших растворитель, развился стойкий гипергликемический ответ. Введение К-167 за 30 мин. до глюкозной нагрузки эффективно предотвращало повышение уровня глюкозы в крови на протяжении всего эксперимента без статистически значимого отличия от вилдаглиптина. Таким образом, было установлено, что однократное введение соединения К-167 значительно улучшает толерантность к глюкозе у крыс с диабетом 2 типа и алиментарным ожирением.

У группы контроля глюкоза при пероральном введении вызвала стойкую гипергликемию на протяжении всего эксперимента (120 минут), уровень глюкозы плазмы крови в пике составил $31,57 \pm 2,85$ мМ/л. Вилдаглиптин привел к снижению максимального пика гипергликемии до $21,90 \pm 1,32$ мМ/л. Исследуемое соединение К-167 в дозе 10 мг/кг привело к понижению максимума гипергликемии до $28,00 \pm 5,60$ мМ/л, а в дозе 30 мг/кг – до $18,50 \pm 1,85$ мМ/л.

Антигипергликемический эффект вилдаглиптина в дозе 10 мг/кг составил $26,60 \pm 3,20\%$ (% снижения площади под кривой глюкоза-время). Эффект соединения К-167 в дозе 10 мг/кг составил $13,6 \pm 0,84\%$; в дозе 20 мг/кг – $19,40 \pm 5,65\%$; а в дозе 30 мг/кг – на $29,30 \pm 3,88\%$. Таким образом, показана антидиабетическая активность К-167 при однократном введении в дозах 20 мг/кг и 30 мг/кг, не значимо отличная от активности вилдаглиптина в дозе 10 мг/кг. Выявлена прямая зависимость антигипергликемической активности соединения от дозы. Учитывая, что в

дозе 30 мг/кг активность К-167 наиболее близка к активности препарата сравнения, она была выбрана для дальнейшего изучения при длительном терапевтическом введении модельным животным.

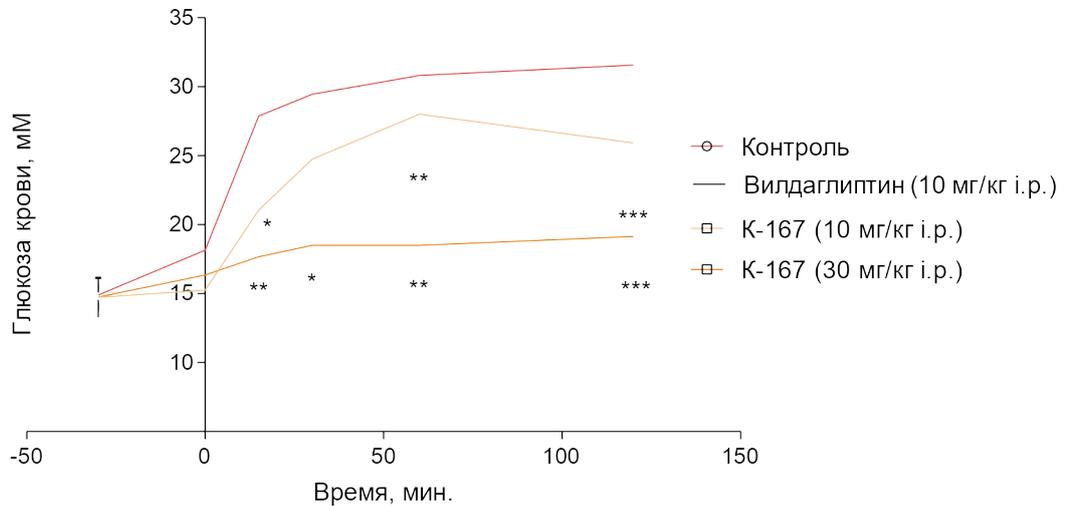


Рисунок 13 – Влияние соединения К-167 и ингибитора DPP-4 вилдаглиптина на гликемию при пероральном тесте толерантности к глюкозе у крыс с СД2 (HFD+STZ). Данные представлены как среднее±SD (n = 6). Статистическая значимость к контрольной группе (2-сторонний ANOVA с пост-специальным тестом Туки): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

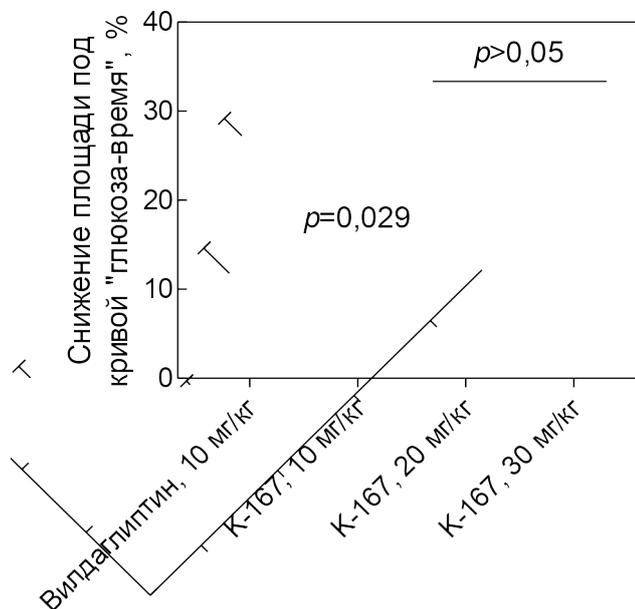


Рисунок 14 – Антигипергликемический эффект соединения К-167 (10, 20 и 30 мг/кг) и вилдаглиптина (10 мг/кг) при пероральной нагрузке 2 г/кг глюкозы у мышей DIO-C57bl/6j. Данные представлены как среднее±SD, n = 3. Статистическая значимость к группе вилдаглиптина (1-сторонний ANOVA с пост-тестом Даннетта).

4.5. Антидиабетическая активность при длительном введении

Приведенные выше результаты исследований показали перспективность изучения антидиабетической активности соединения-лидера К-167 в дозе 30 мг/кг при длительном введении (Рисунок 15). Мыши DIO-C57BL/6J были рандомизированы на группы: ВЖД (высокожировая диета, контрольная группа), ВЖД и введение препарата сравнения метформина в дозе 100 мг/кг (ВЖД + метформин), ВЖД и введение соединения К-167 в дозе 30 мг/кг (ВЖД + К-167). В интактной группе мыши C57BL/6J содержались на нормальной диете. Курсовое введение соединений проводилось ежедневно в течение 3 месяцев в утренние часы. Эффект соединений на маркеры СД2 оценивался по следующим показателям: глюкоза крови натощак, толерантность к глюкозе, инсулин плазмы крови и показатель инсулинорезистентности (влияние на углеводный обмен); масса тела и висцеральных жировых отложений, триглицеридов печени (влияние на жировой обмен); лейкоцитарная формула, фактора некроза опухолей α (ФНО- α) плазмы крови, оксид азота, продукты перекисного окисления и восстановленный глутатион в ткани печени (влияние на системное воспаление и оксидативный стресс).

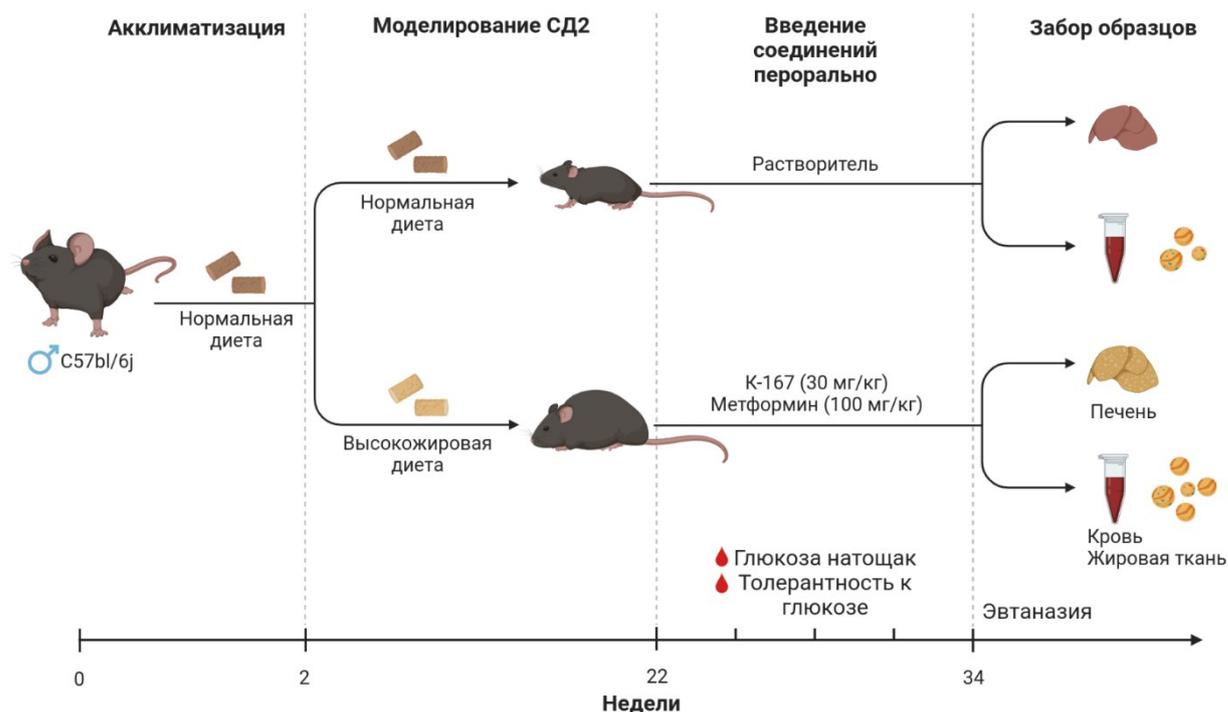


Рисунок 15 – Дизайн эксперимента по изучению антидиабетической активности К-167 при длительном введении.

4.5.1. Антигипергликемическая активность

Гликемический контроль является одним из важнейших компонентов эффективности антидиабетических средств. В группе ВЖД гипергликемия натощак сохранялась на протяжении

всего эксперимента. У животных, получавших метформин или К-167, отмечена нормализация гликемии натощак в 30-ый, 60-ый и 90-ый дни введения. Эффект был статистически значимым к группе ВЖД в каждом случае. В первый день введения исследуемых соединений средний уровень глюкозы крови интактных животных составил $5,40 \pm 0,23$ мМ, в группе ВЖД – $6,00 \pm 0,08$ мМ. На 90-й день введения веществ интактные животные сохраняли нормальное значение гликемии ($5,80 \pm 0,10$ мМ), в группе ВЖД показан прирост на 12% к 1-ому дню. Метформин нормализовал глюкозу крови натощак ($5,40 \pm 0,27$ мМ), так же, как и соединение К-167 ($5,20 \pm 0,16$ мМ).

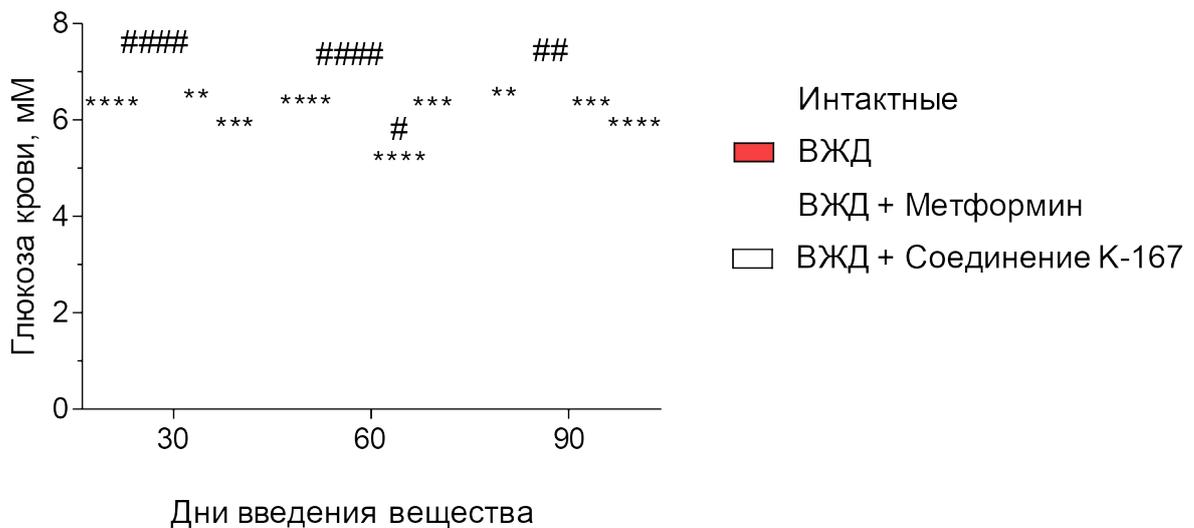


Рисунок 16 – Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на концентрацию глюкозы крови у животных с СД2 во время курсового введения. Данные представлены как среднее \pm SD ($n = 6$). Статистическая значимость (2-сторонний ANOVA с пост-тестом Туки): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ к группе ВЖД и # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ к интактной группе.

Нормализацию углеводного обмена оценивали также с помощью интраперитонеального теста толерантности к глюкозе, который проводили в 1-ый, 45-ый и 90-ый дни введения соединений. Во всех трех экспериментах получены схожие результаты. У группы ВЖД нагрузка глюкозой вызывала гипергликемический ответ с пиком через 15 минут. В 1-ый день введения соединений максимальная концентрация глюкозы крови для группы ВЖД составила $11,20 \pm 0,52$ мМ. Метформин снижал пик гипергликемии до $8,40 \pm 0,51$ мМ, при этом площадь под кривой глюкоза-время снижалась на 21,8% относительно контрольной группы. Эффект соединения К-167 был сравним с эффектом метформина (максимальная концентрация составила $8,60 \pm 0,54$ мМ, снижение площади под кривой глюкоза-время 19,0%).

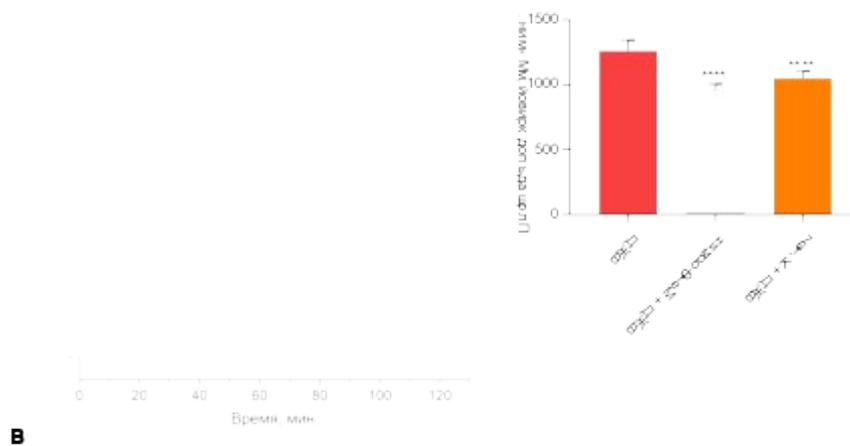
На 45-ый день, в середине курсового введения, для группы ВЖД пиковая гипергликемия составила $12,60 \pm 0,53$ мМ. Метформин уменьшил максимальный гипергликемический ответ до $8,90 \pm 0,22$ мМ, площадь под кривой глюкоза-время снижалась на 23,9% относительно

контрольной группы. Соединение К-167 также статистически значимо снижало глюкозу крови до $10,00 \pm 0,85$ мМ, а площадь под кривой глюкоза-время на 16,8%.

В последний, 90-ый день введения, пик гипергликемии у группы ВЖД составил $10,60 \pm 0,37$ мМ. В группе, получавшей метформин, максимальное значение глюкозы крови составило $9,60 \pm 0,08$ мМ, площадь под кривой глюкоза-время снижалась на 12,9%. Антигипергликемический эффект соединения К-167 составил 15,0%, максимальное значение глюкозы крови $9,40 \pm 0,17$ мМ.

а

б



в

Рисунок 17 – Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на толерантность к глюкозе (2 г/кг) в 1-ый (а), 45-ый (б) и 90-ый (в) дни введения соединений. Данные представлены как среднее \pm SD (n = 6). Статистическая значимость к группе ВЖД (2-сторонний ANOVA с пост-специальным тестом Туки для графиков глюкоза-время, непарный t-тест для площадей под кривыми): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Другим важным аспектом оценки антидиабетической активности служила концентрация инсулина и индекс инсулинорезистентности НОМА-IR. Мыши DIO-C57BL/6J по сравнению с интактными C57BL/6J, получавшими стандартную диету, развили гипергликемию и выраженную гиперинсулинемию, что соответствует литературным данным [417]. Рост глюкозы крови составил 31,3%, инсулина в 2,6 раза, а индекса инсулинорезистентности НОМА-IR на 84%. У мышей, получавших лечение метформином, наблюдалось снижение данных показателей до уровня, соответствующего интактным животным. Соединение К-167 также достоверно нормализовало глюкозу, инсулин крови и НОМА-IR до значений интактной группы на 29,1%, 78,3% и 71,2%, соответственно.

а

б

в

Рисунок 18 – Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на концентрацию глюкозы (а) и инсулина (б) плазмы крови, индекс НОМА-IR (в). Данные представлены как среднее±SD (n = 6). Статистическая значимость (непарный t-тест): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ к группе ВЖД; # $p < 0,05$, ### $p < 0,01$ к интактной группе.

4.5.2. Влияние на жировой обмен

Влияние на жировой обмен оценивалось по совокупности морфометрических и биохимических показателей. Изменение массы тела животных в течение эксперимента было статистически незначимым во всех группах. Однако, в группах, получавших ВЖД и ВЖД+К-167 наблюдалась тенденция к увеличению веса, а в группе ВЖД+метформин – к его снижению. До начала диеты средняя масса мышей C57BL/6J равнялась 24,00±0,40 г. В 1-ый день введения исследуемых соединений средняя масса интактных животных составила 31,0±0,59 г, а животных, получавших высокожировую диету, 33,80±0,75 гр. В конце курсового введения веществ средний вес животных по группам составил: интактные животные 31,00±1,32 г; ВЖД – 35,10±2,13 г; ВЖД+метформин – 28,40±3,72 г; ВЖД+К-167 – 35,10±1,01 г.

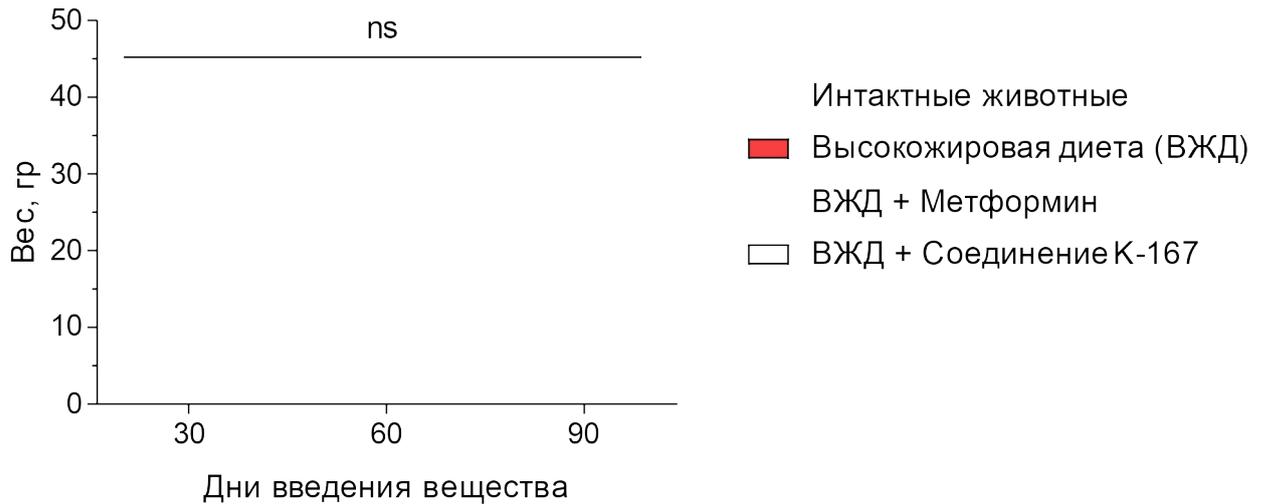


Рисунок 19 – Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на массу тела животных с СД2 во время курсового введения. Данные представлены как среднее \pm SD (n = 6). Статистическая значимость (2-сторонний ANOVA с пост-тестом Туки) к группе ВЖД.

Увеличение массы висцеральных отложений белой жировой ткани является характерным признаком ожирения, метаболического синдрома и СД2 [261; 446], связанного также с повышенным сердечно-сосудистым риском [456]. В группе ВЖД выявлено их значительное увеличение относительно интактных животных: мезентериальных на 84,2%, эпидидимальных на 70,9% и ретроперитонеальных на 72,2% в пересчете на массу тела животных. Препарат сравнения метформин снижал удельную массу мезентериальных и эпидидимальных жировых отложений относительно группы ВЖД на 43,5% и 38,7%, соответственно, при этом значимого влияния на ретроперитонеальные (снижение на 11,5%) выявлено не было. Соединение-лидер К-167 значимо снижало всех виды абдоминальных жировых отложений до уровня, характерного для интактных животных (снижение на 33,54%, 34,9% и 36,9% от группы ВЖД, соответственно).

а

б

в

Рисунок 20 – Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на массу мезентериальных (а), эпидидимальных (б) и ретроперитонеальных (в) жировых отложений у животных с СД2 после курсового введения. Данные представлены как среднее±SD (n = 6). Статистическая значимость (непарный t-тест): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ к группе ВЖД; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ к интактной группе.

Высокожировая диета вела к накоплению триглицеридов в ткани печени (рост на 23 % по сравнению с животными на нормальной диете). Эффект метформина был статистически не значим, снижение относительно группы ВЖД составило 17,3%. Соединение К-167 статистически значимо снижало нормализовало триглицериды печени, снижая этот показатель на 24,1% относительно группы ВЖД.

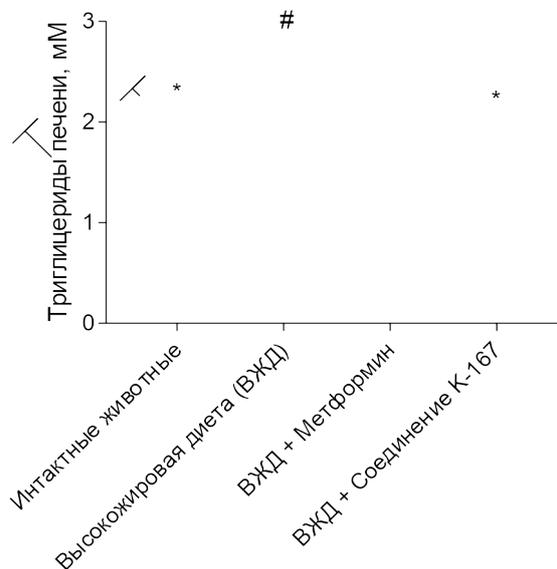


Рисунок 21 – Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на триглицериды печени у животных с СД2 после курсового введения. Данные представлены как среднее±SD (n = 6). Статистическая значимость (непарный t-тест): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ к группе ВЖД; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ к интактной группе.

4.5.3. Иммуотропная активность

Для оценки влияния К-167 на иммунометаболические нарушения оценивались параметры, отражающие системное воспаление – лейкоцитарная формула крови, ранние медиаторы воспаления (оксида азота в ткани печени, фактора некроза опухолей α (ФНО- α) плазмы крови.

Высокожировая диета вызывала значимые сдвиги в лейкоцитарной формуле крови, увеличивая содержание сегментоядерных нейтрофилов на 44,2% и снижая содержание лимфоцитов на 14,7% относительно группы интактных животных. Введение метформина оказывало нормализующее влияние, снижение относительно группы ВЖД составило 31,6% для нейтрофилов и 21,5% для лимфоцитов, соответственно. Соединение К-167 достоверно корректировало влияние ВЖД на лейкоцитарную формулу, изменяя данные показатели на 38,0% и 21,5% относительно группы ВЖД.

а**б****в**

Рисунок 22 – Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на общее количество лейкоцитов (а), уровень сегментоядерных нейтрофилов (б) и лимфоцитов (в) у животных с СД2. Данные представлены как среднее \pm SD (n = 6). Статистическая значимость (непарный t-тест): * p < 0,05, ** p < 0,01 к группе ВЖД; # p < 0,05, ## p < 0,01 к интактной группе.

а

б

Рисунок 23 – Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень ФНО-альфа плазмы крови (а) и оксида азота печени (б) у животных с СД2. Данные представлены как среднее±SD (n = 6). Статистическая значимость (непарный t-тест): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ к группе ВЖД; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ к интактной группе.

Соединение К-167 также корректировало характерные для СД2 маркеры дислипидемии, воспаления и оксидативного стресса в печени [418]. Так, в группе ВЖД отмечено достоверное увеличение уровня ФНО- α на 49,7% и оксида азота печени в 3 раза относительно интактных животных. Метформин достоверного не снижал концентрацию ФНО- α , однако снизил оксид азота в ткани печени на 46,9%. Соединение К-167 достоверное нормализовало оба параметра, возвращая их к значениям интактных животных (снижение на 39,4% и 59,3%, соответственно).

Согласно литературным данным, состояние антиоксидантной и антирадикальной систем организма оказывает большое влияние на развитие инсулинорезистентности и прогрессирование осложнений сахарного диабета [87; 140]. Определение концентраций ТБК-активных продуктов и восстановленного глутатиона печени показало, что метформин снижал количество ТБК-активных продуктов на 77,5% от группы ВЖД, но не восстанавливал пул глутатиона, который оставался значимо меньшим по сравнению с интактными животными. Соединение К-167 обращало развитие оксидативного стресса, снижая уровень ТБК-активных продуктов на 71% от группы ВЖД и повышая уровень восстановленного глутатиона на 97% относительно интактных животных.

а

б

Рисунок 24 – Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень ТБК-активных продуктов (а) и восстановленного глутатиона (б) печени у животных с СД2. Данные представлены как среднее±SD (n = 6). Статистическая значимость (непарный t-тест): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ к группе ВЖД; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ к интактной группе.

4.5.4. Влияние на поведенческую активность

Известно, что ВЖД вызывает когнитивные нарушения у животных, снижая поисковую активность и вызывая стрессовое состояние [56; 65]. В тоже время, повышенная активность GSK3B играет одну из ключевых ролей в развитии когнитивных нарушений при СД2 и нейродегенеративных заболеваниях [369]. Для оценки влияния К-167 на поведенческую активность были выполнены тесты «Открытое поле» и «Распознавание нового объекта».

Поисковая активность в группе ВЖД была достоверно ниже интактных животных на 35,7%. Метформин и соединение К-167 восстанавливали интерес к изучению нового объекта до уровня интактных животных в равной степени.

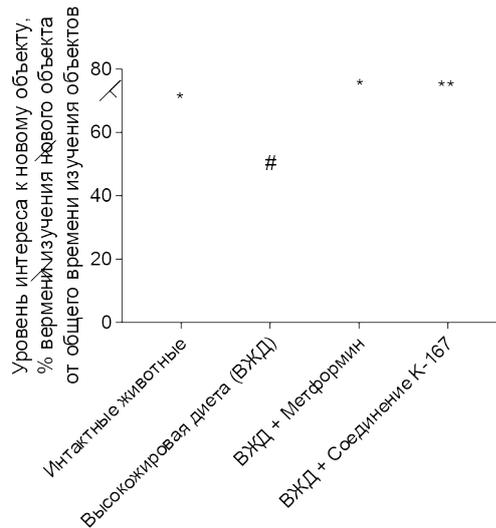


Рисунок 25 – Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень интереса к новому объекту в тесте «Распознавание нового объекта» у животных с СД2. Данные представлены как среднее±SD (n = 6). Статистическая значимость (непарный t-тест): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ к группе ВЖД; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ к интактной группе.

Наблюдавшееся повышение вертикальной и горизонтальной двигательных активностей в группе ВЖД на 53% и 244,8%, соответственно, согласуется с данными других авторов и отражает стрессовое состояние животных [165]. Метформин снижал горизонтальную двигательную активность на 31,7% (статистически незначимо), но в тоже время увеличивал вертикальную двигательную активность на 351,4% от интактной группы. Соединение К-167 возвращало оба данных показателя к значениям интактной группы, снижая их на 50,4% и 61,5%, соответственно.

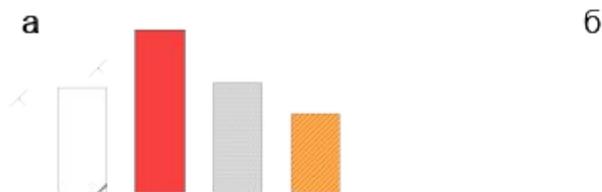


Рисунок 26 – Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на показатели горизонтальной (а) и вертикальной (б) двигательной активности в тесте «Открытое поле» у животных с СД2. Данные представлены как среднее±SD (n = 6). Статистическая значимость (непарный t-тест): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ к группе ВЖД; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ к интактной группе.

4.6. Антитромботическая и антиагрегантная активность

Прогрессирование СД2 приводит к развитию отдаленных микро- и макрососудистых осложнений и повышенному сердечно-сосудистому риску [43; 173]. Механизмы диабетических тромботических осложнений включают эндотелиальную дисфункцию, активацию коагуляции и гиперреактивность тромбоцитов [276]. В частности, тромбоциты при СД2 характеризуются дисрегуляцией нескольких сигнальных путей, приводящих к усилению адгезии, активации и агрегации. Эти изменения являются результатом гипергликемии, резистентности к инсулину, воспаления и оксидативного стресса [20; 60]. В связи с этим целесообразной является оценка антиагрегантных и антитромботических свойств перспективных антидиабетических соединений.

4.6.1. Антиагрегантная активность *in vitro*

Активация тромбоцитов может быть индуцирована различными факторами. В ряде работ показано, что активация тромбоцитов коллагеном через GPIV и GPIb-IX-V опосредована каскадом PI3K/AKT/GSK3B [73]. Поэтому влияние К-167 на агрегацию тромбоцитов было исследовано при индукции АДФ для оценки неспецифической антиагрегантной активности и при индукции коллагеном для оценки GSK3B-зависимого пути.

Соединение К-167 обладает выраженной антиагрегантной активностью, превосходящей кислоту ацетилсалициловую в 5 раз при индукции 5 мкМ АДФ. При индукции агрегации 15 мкг/мл коллагена активность К-167 превышает кислоту ацетилсалициловую уже в 16 раз, что косвенно свидетельствует о специфическом влиянии соединения на сигнальный каскад PI3K/AKT/GSK3B. Таким образом, антиагрегантная активность К-167 может рассматриваться как дополнительный аспект антидиабетической активности для коррекции повышенной агрегации тромбоцитов, характерной для СД2.

Таблица 17 – Влияние ацетилсалициловой кислоты и соединения К-167 на агрегацию тромбоцитов

Соединение	IC ₅₀ , мкМ	
	АДФ, 5 мкМ	Коллаген, 15 мкг/мл
Ацетилсалициловая кислота	104,0	49,3
Соединение К-167	21,0	3,02

4.6.2. Антитромботическая активность *in vivo*

Для оценки антитромботической активности была использована модель окклюзии сонной артерии крыс, индуцированной аппликацией 50%-ого раствора хлорида железа (III). В этом случае запуск коагуляции обусловлен образованием свободных радикалов и прогрессирующей артериальной дисфункции, что во многом схоже с патологическим процессом, наблюдаемым при СД2 [276]. Согласно литературным данным, ингибирование GSK3B оказывает протективное действие на эндотелий сосудов, а также активирует антирадикальную и антиоксидантную системы организма [339; 358].

Было показано, что соединение К-167 обладает антитромботической активностью на данной модели тромбоза. В дозе 30 мг/кг величина эффекта К-167 (продолгование времени окклюзии сонной артерии $+78,51 \pm 19,48\%$) соответствовала эффекту ацетилсалициловой кислоты в дозе 150 мг/кг (продолгования времени окклюзии сонной артерии $+68,4 \pm 16,4\%$). Следовательно, одним из компонентов действия К-167 может считаться профилактика тромботических осложнений СД2.

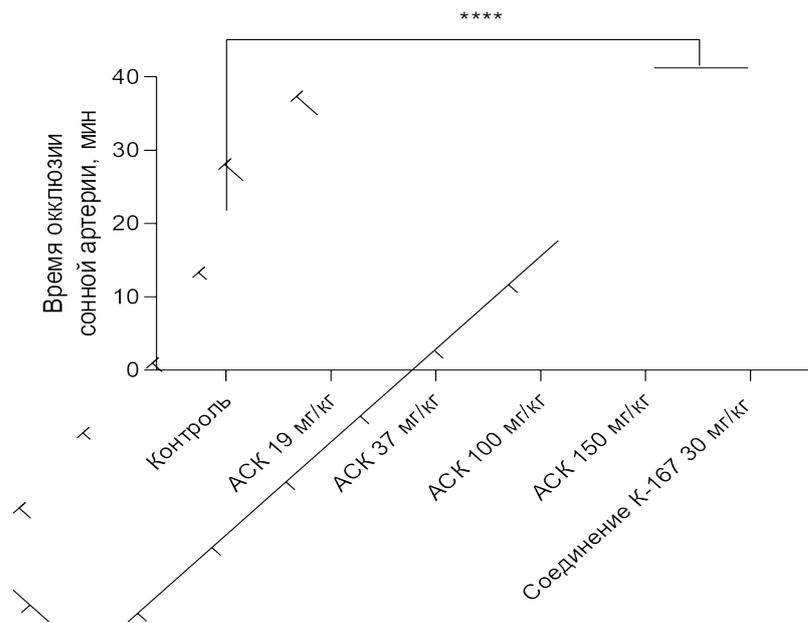


Рисунок 27 – Влияние соединения К-167 и ацетилсалициловой кислоты (АСК) на время окклюзии сонной артерии, индуцированной аппликацией 50%-м раствором хлорида железа (III) интактным крысам. Данные представлены как среднее \pm SD ($n = 6$). Статистическая значимость (непарный t-тест): **** $p < 0,0001$ к контрольной группе.

4.7. Острая токсичность при пероральном введении

Экспериментальная оценка острой токсичности соединения К-167 выполнена при пероральном введении белым мышам. Согласно полученным данным, соединение К-167 не

проявило признаков острой токсичности в дозе 2 г/кг, выживаемость животных через 2 недели составила 100%, также не наблюдалось значимых изменений в весе животных. Согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств под ред. Миронова А.Н. [226], а также Руководству международной организации по содружеству и развитию (OECD Guideline [143]) при исследовании острой токсично малорастворимых веществ, максимальная исследуемая доза составляет 2 г/кг. При отсутствии токсических эффектов в данном случае малорастворимое соединение относят к классу нетоксичных веществ, принимая величину $LD_{50} > 5$ г/кг.

Таблица 18 – Влияние соединения К-167 (2 г/кг, перорально) на выживаемость интактных мышей

Группа	№ животного	Выживаемость в первые 24 ч.	Выживаемость через 2 нед.	Вес животного			Токсичность
				День введения	1 нед. после введения	2 нед. после введения	
Контрольная группа	1	+	+	25,9	25,8	25,8	–
	2	+	+	26,7	26,5	26,7	–
	3	+	+	27,5	27,4	27,8	–
	4	+	+	20,5	21,2	21,5	–
	5	+	+	24,7	24,8	25,0	–
Соединение К-167	1	+	+	23,7	23,9	23,9	–
	2	+	+	23,3	23,5	23,6	–
	3	+	+	25,6	25,4	25,6	–
	4	+	+	25	24,8	25,2	–
	5	+	+	22,7	23,0	23,2	–

4.8. Заключение

В результате исследования фокусированной библиотеки соединений был выявлен перспективный скаффолд ингибиторов GSK3B – 3-арилиден-2-оксиндолы. Среди 42 испытанных соединений выявлено 16 ингибиторов GSK3B, из них 4 – с субмикромольной активностью. Наиболее активное соединение 3-(2-пиридинилметил)-2-оксиндол (K-167) показало IC_{50} 4,19 нМ. Все изученные ингибиторы GSK3B показали низкую цитотоксичность по отношению к моноцитам периферической крови человека и нормальным клеткам почек линии HEK293. Дальнейший отбор соединений проводился на клеточной модели ЛПС-индуцированного воспалительного ответа макрофагов, имитирующей активацию тканевых макрофагов при развитии алиментарного ожирения и инсулинорезистентности. Для пяти соединений показана способность подавлять продукцию оксида азота макрофагами, наибольшую активность показали соединения K-167 и K-248 (IC_{50} 13,9 и 8,8 мкМ, соответственно), также они ингибировали секрецию провоспалительного ИЛ-6 с IC_{50} 22,4 и 21,5 мкМ. Их фармакологический потенциал подтвержден способностью стимулировать захват глюкозы фибробластами крыс, культивируемыми в среде с концентрацией глюкозы 25 мМ.

При однократном введении мышам с экспериментальным СД2 DIO-C57BL/6J в дозе 30 мг/кг внутрибрюшинно соединение K-248 не показало значимого эффекта в тесте толерантности к глюкозе и было исключено из дальнейшего исследования. Соединение K-167 в той же дозе у пути введения проявило существенную антигипергликемическую активность как у диабетических мышей с алиментарным ожирением DIO-C57BL/6J, так и у диабетических инсулинорезистентных крыс HFD+STZ, эффект был сопоставим с вилдаглиптином в дозе 10 мг/кг. Таким образом, K-167 было выбрано как соединение-лидер для дальнейшего изучения при длительном введении мышам с СД2.

При 3-месячном пероральном введении в дозе 30 мг/кг K-167 показало выраженную плейотропную антидиабетическую активность, сопоставимую или превосходящую эффект метформина в дозе 150 мг/кг. Показано значительное снижение уровня инсулина плазмы крови ($770,6 \pm 106$ пкг/мл против $3553 \pm 324,1$ пкг/мл в группе контроля), а также снижение инсулинорезистентности по показателю HOMA-IR ($5,29 \pm 0,67$ усл. ед против $7,47 \pm 0,41$ усл. ед в группе контроля). K-167 выраженно улучшало толерантность к глюкозе, сопоставимой с таковой у препарата сравнения метформина в дозе 150 мг/кг перорально (площадь под кривой глюкоза время -15,0% против -12,9%) на 3-ий месяц введения. Показано снижение массы висцеральных жировых отложений: ретроперитонеальных на 34,9%, мезентериальных на 33,5% и эпидидимальных на 36,9% по сравнению с группой СД2. Выявлено значимое снижение содержания триглицеридов печени на 24,3%. Отмечалось снижение признаков системного

воспалительного процесса. Было показано достоверное восстановление количества сегментоядерных нейтрофилов ($18,6 \pm 3\%$ против $30,0 \pm 1,6\%$) и лимфоцитов ($76,6 \pm 3,1\%$ против $63,0 \pm 2,0\%$) по отношению к группе контроля. Соединение К-167 привело к достоверному снижению уровня ФНО- α ($39,4\%$) и оксида азота ($59,3\%$). На интактных крысах К-167 в дозе 30 мг/кг оказало более выраженное антитромботическое действие, чем препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в дозе 150 мг/кг (продолгование времени окклюзии сонной артерии, индуцированной аппликацией 50% раствора FeCl_3 $78,51 \pm 19,48\%$ и $68,4 \pm 16,4\%$, соответственно). Изучение острой 2-недельной токсичности показало, что К-167 относится к 5 классу токсичности (нетоксичные соединения), $\text{LD}_{50} > 5000$ мг/кг при пероральном введении белым беспородным мышам.

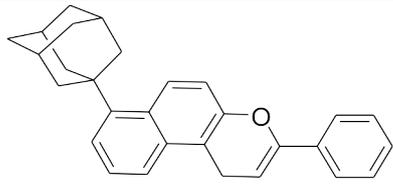
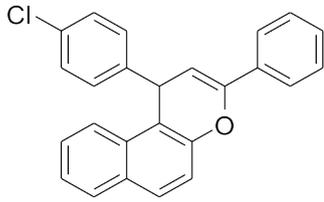
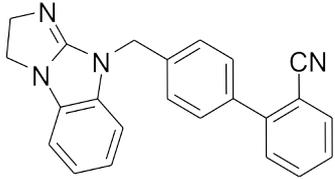
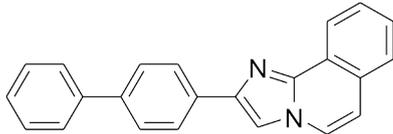
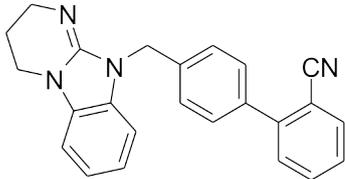
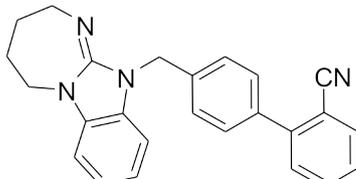
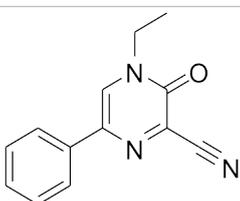
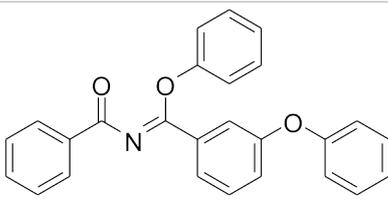
Глава 5. Поиск активаторов АМПК. Фармакологические свойства активаторов АМПК

5.1. Экспериментальный скрининг. Взаимосвязи «структура-активность»

Для соединений из АМПК-фокусированной библиотеки, сформированной как описано выше, было определено влияние на активность человеческой рекомбинантной киназы АМПК в микропланшетном формате. Опосредованное изоформой АМПК $\alpha_1\beta_1\gamma_1$ фосфорилирование фрагмента мышинной ацетил-коэнзим А карбоксилазы- α (аминокислоты 73-85) оценивали с использованием люминесцентного анализа методом ADP-Glo™ (Promega, США). Реакцию проводили в присутствии 150 мкМ АТФ, которая вызывала максимальную активацию фермента в предварительных экспериментах. В качестве положительного контроля использовали аллостерический активатор АМПК 2-{{2-(2-бром-4-метилфенокси)этил}тио}-пиримидин (ZLN024) [390].

На начальном этапе 83 соединения фокусированной библиотеки исследовались в концентрации 100 мкМ в двух повторах (см. Приложение 3). Два соединения показали ингибирующую активность, 45 соединений не оказывали значимого влияния на активность АМПК. Оставшиеся 36 соединений активировали АМПК на 50% и более. Последующие эксперименты с активными соединениями проводили в диапазоне концентраций ингибиторов от 10 нМ до 100 мкМ для определения величин EC_{50} . Данные по наиболее активным соединениям обобщены в таблице 15. Всего валидировано 8 активаторов, из них два с микромолярной, и два – с субмикромолярной активностью. При исследовании их аналогов в синтетических рядах показано, что они обладают меньшей активностью [202].

Установлено, что соединения, содержащие бифенил-2'-карбонитрильный заместитель ($R=2-NC-C_6H_4$), обладают выраженной АМПК-активирующей активностью, которая коррелирует с увеличением внешнего гидрогенизированного цикла в серии соединений AZH-143 < BIF-68 < BIF-69. Ранее сообщалось об активаторах АМПК, содержащих аналогичные 2'-гидроксифениловые части [164] или конденсированные гетероциклические системы [186]. В то же время производные 2'-карбонитрилбифенила еще не были описаны в литературе как активаторы АМПК. Эффективность идентифицированных производных превышает вещество сравнения ZLN024 в концентрации 100 мкМ. Соединение AZH-143 уступает по значению EC_{50} , в то время как BIF-68 и BIF-69 демонстрируют сродство к молекуле фермента, которое аналогично ZLN024.

№	Шифр соединения	Структурная формула	Активирование AMPK в 100 мкМ (m±SD), %	AMPK EC ₅₀ (±SE), мкМ
1.	14081		126,88±4,26*	4,35±0,44
2.	14136		199,48±26,64*	55,6±9,87
3.	AZH-143		162,70±49,59*	109,2±9,1
4.	BIF-6		127,64±9,58*	47,42±0,47
5.	BIF-68		197,3±31,8*	0,34±0,09
6.	BIF-69		293,3±21,4*	0,44±0,12
7.	HC-254		86,48±7,36*	6,76±3,45
8.	TONS-462		142,79±14,29*	34,77±1,32
9.	ZLN024		156,8±4,6*	0,55±0,06

Примечание: * $p < 0,05$ к отрицательному контролю (тест Манна-Уитни).

5.2. Оценка активности и цитотоксичности выявленных активаторов AMPK на клеточных моделях

TLR4-индуцированная M1-поляризация макрофагов способствует развитию инсулинорезистентности печени, жировой и мышечной ткани при СД2 [200]. AMPK играет одну из ключевых ролей в провоспалительном программировании фенотипа макрофагов [94]. Поэтому для оценки фармакологического потенциала, цитотоксичности и клеточной проницаемости было исследовано влияние выявленных активаторов AMPK на ЛПС-активированные перитонеальные макрофаги мышей.

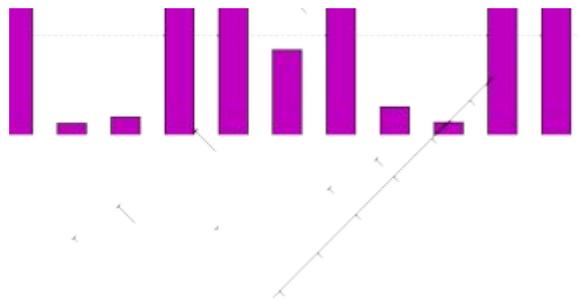


Рисунок 28 – Влияние выявленных активаторов AMPK на синтез оксида азота и жизнеспособность ЛПС-стимулированных макрофагов мышей C57bl/6j в концентрации 10 мкМ. Данные представлены как среднее \pm SD, n = 3. Статистическая значимость к ЛПС-контролю (1-сторонний ANOVA с пост-тестом Даннетта): * p < 0.05; ** p < 0.005; *** p < 0.0005.

Было выявлено, что статистически значимое подавление синтеза оксида азота вызывают соединения AZH-143, VIF-68 и VIF-69. При этом AZH-143 не цитотоксично, VIF-68 подавляет жизнеспособность макрофагов на 27,55% (p < 0,05), эффект VIF-69 статистически незначим.

Проявившие наибольшую противовоспалительную активность соединения ВIF-68 и ВIF-69 были дополнительно изучены в широком диапазоне концентраций. Показано, что оба соединения являются микромолярными ингибиторами синтеза NO в активированных макрофагах, при этом не отмечено влияния на жизнеспособность клеток вплоть до концентрации 50 мкМ по данным МТТ-теста. Таким образом, соединения ВIF-68 и ВIF-69 являются клеточно-проницаемыми, не цитотоксичными и предотвращают провоспалительную активацию макрофагов.

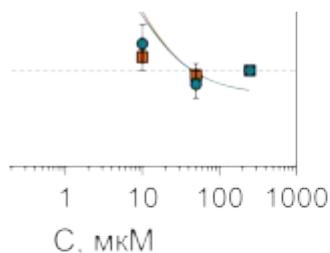


Рисунок 29 – Влияние выявленных активаторов АМРК на синтез оксида азота и жизнеспособность ЛПС-стимулированных макрофагов мышей C57bl/6j. Данные представлены как среднее \pm SD, n = 3.

5.3. Расчетные фармакокинетические и токсикологические характеристики выявленных активаторов АМРК

Для предварительной оценки фармакокинетических и токсикологических свойств соединения-лидера ВIF-69 был выполнен прогноз основных ADMET-характеристик *in silico* на

основе консенсуса оценок 3 общедоступных сервисов – ADMETlab [235], admetSAR [15], SwissADME [183]. Полученные результаты представлены в таблице 16.

Таблица 20 – Консенсусные прогнозные ADMET характеристики соединения BIF-69

Показатель	BIF-69
<i>Лекарственное подобие</i>	
Липофильность, logP	4,87
Растворимость в воде, мкг/мл	7,2
<i>Фармакокинетические показатели</i>	
Проницаемость в линии клеток Caco-2	Нет консенсуса
Субстрат Р-гликопротеина	Нет
Ингибитор Р-гликопротеина	Да
Локализация в клетке	Митохондрии
Абсорбция в ЖКТ, %	30
Проницаемость ГЭБ	Да
Объем распределения, л/кг	1,094
Связывание с белками плазмы, %	87,2
Период полувыведения, ч.	2,16
Клиренс, мл/мин./кг	1,72
<i>Токсикологические показатели</i>	
Класс острой токсичности	4
Острая токсичность для крыс (LD ₅₀), мг/кг	1131,84
Мутагенность (тест Эймса)	Нет
Канцерогенность	Нет
Гепатотоксичность	Возможна
Иммунотоксичность	Нет
Цитотоксичность	Нет
Сенсибилизация кожи	Нет

Согласно консенсусу оценок, вещество обладает приемлемой для лекарственного средства липофильностью, однако недостаточно высокой растворимостью, что может ограничить разовую дозу при введении животным. Ожидается абсорбция из ЖКТ более 30%, т.е. соединение перорально биодоступно. Способность проникать через клеточные мембраны неоднозначно оценивается разными сервисами. Действительно, наличие положительно

заряженных при физиологическом рН атомов азота может препятствовать пассивной диффузии через липофильные клеточные мембраны [253]. Прочие оценки параметров фармакокинетики имеют благоприятные значения. Также, предполагается низкая острая токсичность ($LD_{50} > 1000$ мг/кг). Опасения вызывает возможное наличие гепатотоксичности, оценка которой требует проведения дополнительных фармакологических исследований. В свою очередь, отсутствие канцерогенности, мутагенности и цитотоксичности является положительным моментом для дальнейшего изучения вещества.

5.4. Гипогликемическая активность на целых животных при однократном введении

Показано, что активация АМРК в скелетных мышцах аналогично инсулину вызывает транслокацию GLUT4 на поверхностную мембрану, увеличивая захват глюкозы из крови [219]. Также, активация АМРК печени подавляет глюконеогенез [241] – основной источник глюкозы в период голодания. Поэтому для оценки антидиабетической активности выявленных соединений-лидеров была исследована их гипогликемическая активности при введении крысам натошак. Препаратом сравнения служил метформин, известный как непрямой активатор АМРК [379].

Для исключения влияния пероральной биодоступности на эффективность соединения был использован внутрибрюшинный путь введения. Препарат сравнения метформин вызвал снижение концентрации глюкозы крови, значимое начиная с 30-ой минуты эксперимента. Снижение площади под кривой «глюкоза-время» составило 29,6% и также было статистически значимым ($p < 0,001$). В свою очередь, гипогликемический эффект соединения VIF-69 был незначительным, снижение площади под кривой составило 5,3% и является статистически незначимым.

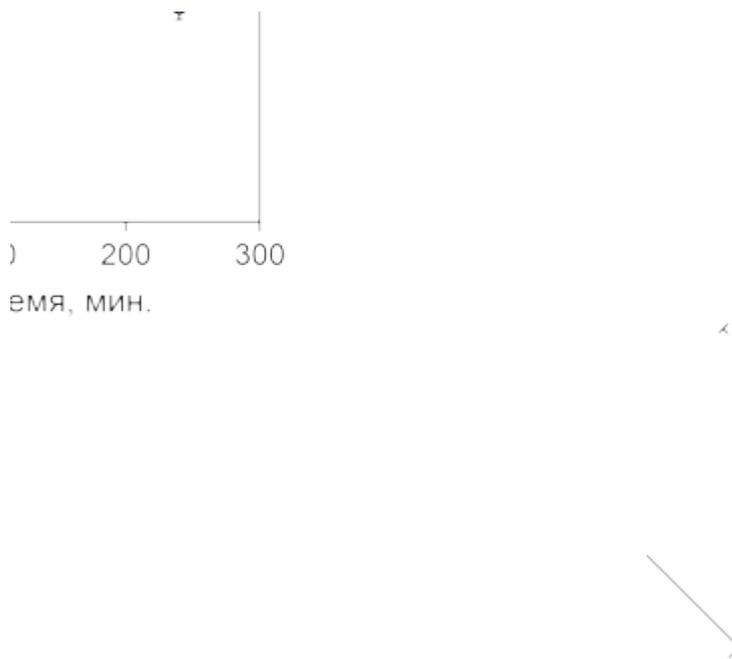


Рисунок 30 – Влияние соединения BIF-69 и метформина на гликемию у интактных крыс. Данные представлены как среднее±SD (n = 5). Статистическая значимость к контрольной группе (2-сторонний ANOVA с пост-тестом Туки): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (а) или непарный t-тест (б).

Недостаточная растворимость, в том числе, в 10% водном ДМСО и в присутствии 1% натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы или Твина 80 в качестве солюбилизаторов, не позволили исследовать гипогликемическую активность BIF-69 в более высоких дозах. Исследование соединения BIF-68 было признано нецелесообразным из-за крайне схожих с BIF-69 фармакологических и физико-химических свойств. Аналогичные эксперименты были выполнены для других выявленных активаторов АМПК с меньшей, чем у BIF-69 активностью *in vitro*. Соединения 14081 и 14136 оказались недостаточно растворимы. В максимально достижимых дозах испытаны BIF-6 (300 мг/кг), HC-254 (100 мг/кг), TONS-462 (100 мг/кг) при внутрибрюшинном пути введения. Они также не показали значимой гипогликемической активности, в силу чего дальнейшие исследования были прекращены.

5.5. Заключение

При экспериментальном изучении 83 соединений фокусированной библиотеки 36 соединений в концентрации 10 мкМ активировали рекомбинантную АМПК человека на 50% и более. Величины EC_{50} определены для 8 наиболее активных соединений. Наибольшая активность и явная взаимосвязь структура-активность наблюдалась для 2'-карбонитрил-дифенил-замещенных конденсированных производных бензимидазола. Увеличение размеров внешнего

цикла гетероциклического ядра от 5-членного до 7-членного положительно коррелировала с активацией AMPK. Последующая оценка влияния соединений-лидеров на воспалительную активацию перитонеальных макрофагов мышей C57bl/6j подтвердила, что наибольшей активностью обладают бифенильные производные бензимидазола AZH-143, VIF-68, VIF-69. Наиболее активные соединения VIF-68 и VIF-69 равноэффективно ингибировали синтез оксида азота макрофагами с IC_{50} около 5 мкМ, проявляя низкую цитотоксичность ($CC_{50} > 100$ мкМ согласно МТТ-тесту). К сожалению, ни VIF-69, ни другие выявленные AMPK-активаторы не проявили гипогликемической активности в экспериментах на животных, возможно из-за недостаточной клеточной проницаемости. Тем не менее, учитывая высокую активность *in vitro*, синтетическую доступность и благоприятные характеристики лекарственного подобия, выявленные 2'-циано-бифенильные производные бензимидазолов можно рассматривать как ценную отправную точку для последующей оптимизации и разработки новых активаторов AMPK с плеiotропной антидиабетической активностью.

Глава 6. Поиск ингибиторов РТР1В.

Фармакологические свойства ингибитора РТР1В/активатора АМПК AZH-141a

6.1. Экспериментальный скрининг. Взаимосвязи «структура-активность»

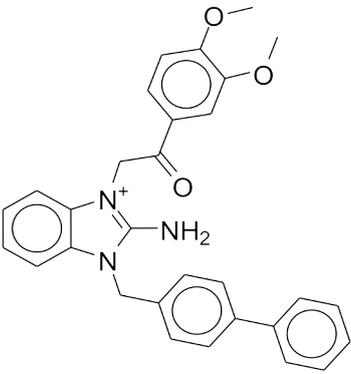
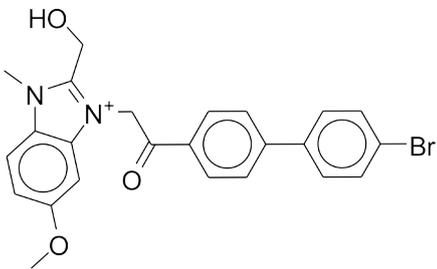
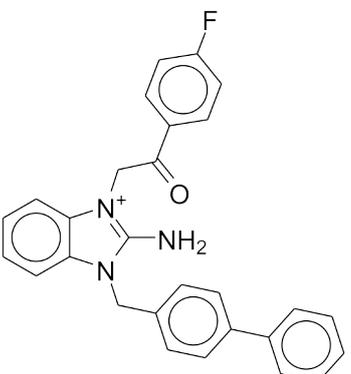
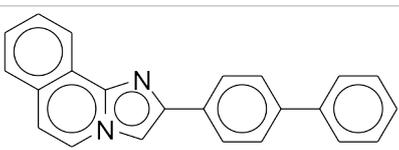
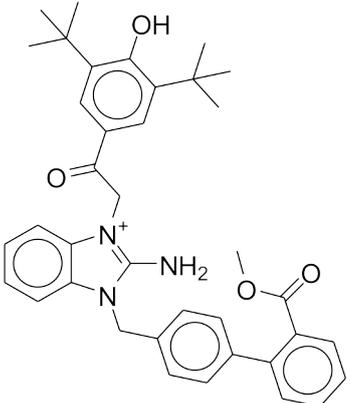
Для соединений из РТР1В-фокусированной библиотеки, сформированной как описано выше, было определено влияние на активность человеческой рекомбинантной РТР1В в микропланшетном формате. Опосредованное РТР1В дефосфорилирование хромогенного субстрата 4-нитрофенилфосфата оценивали спектрофотометрически в соответствии с методикой [107]. Экспериментальный ингибитор РТР1В NSC-87877 [141] использовали в качестве положительного контроля.

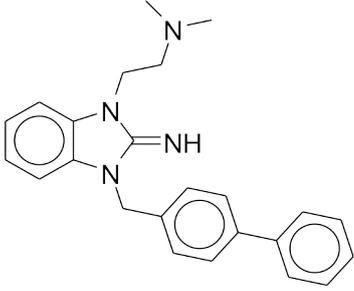
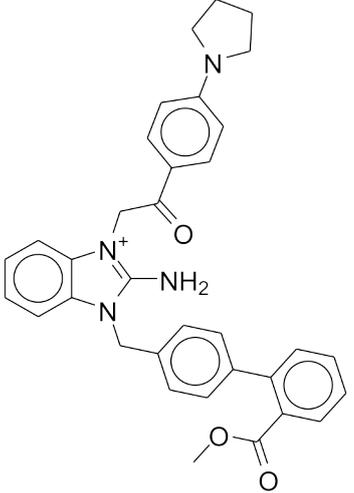
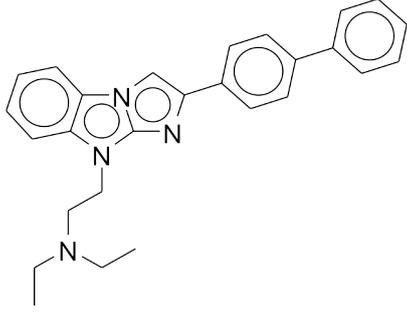
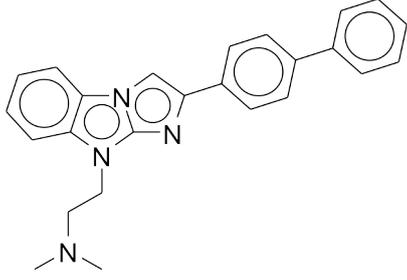
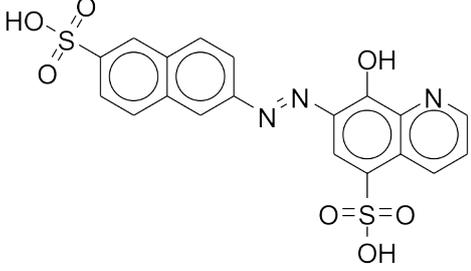
На начальном этапе 51 соединение фокусированной библиотеки исследовались в концентрации 100 мкМ в двух сериях (см. Приложение 4). Было выявлено 12 активных соединений, подавлявших специфическую активность РТР1В на 50% и более. Последующие эксперименты с активными соединениями проводили в диапазоне концентраций ингибиторов от 0,1 нМ до 100 мкМ для определения величин IC_{50} . Данные по наиболее активным соединениям обобщены в таблице 17. Всего валидировано 9 ингибиторов, обладающих активностью в микромолярном диапазоне.

При анализе структур найденных ингибиторов выявлены общие структурные мотивы. Восемь из девяти соединений содержат бензимидазольное ядро, семь из них являются производными 2-аминобензимидазола или 2-иминобензимидазола. Все соединения имеют бифенильный заместитель. В целом, такие структурные особенности соответствуют аллостерическим ингибиторам РТР1В, описанным в литературе, таким как липофильный стероид тродусквемин, содержащий боковую цепь с положительно заряженными атомами азота [112], и полиароматическим ингибиторам бензофуранового типа [19] и бифенильным производным пирроло[2,3-с]азепина [163].

Интересно отметить, что одно из соединений-лидеров по ингибированию РТР1В AZH-141a также оказалось прямым активатором АМПК, причем величины полумаксимального эффекта для обоих ферментов сопоставимы и находятся в верхнем микромолярном диапазоне. Таким образом, AZH-141a являет собой соединение с двойной активностью, что представляет особый интерес как возможность влияния на несколько молекулярных механизмов, опосредующих патологические изменения при СД2.

Таблица 21 – Химическая структура и ингибирование РТР1В наиболее активными соединениями

№	Шифр соединения	Структурная формула	Ингибирование РТР1В в 100 мкМ (m±SD), %	РТР1В IC ₅₀ (±SE), мкМ
	BIF-0010		102,50±2,01	21,9±2,51
	AZH-0137		100,93±0,20	49,33±6,45
	BIF-0020		97,38±5,67	42,04±6,77
	BIF-0006		65,75±5,54	39,14±8,64
	BIF-0017		106,96±2,45	60,16±5,31

AZH-0141		92,11±14,16	30,47±10,70
BIF-0024		67,38±2,11	99,23±11,55
DF-0007		85,36±2,99	100,12±12,33
DF-0006		75,60±10,12	100,46±15,33
Соединение сравнения NSC-87877		98,90±7,32	14,83±4,14

Примечание: * $p < 0,05$ к отрицательному контролю (тест Манна-Уитни).

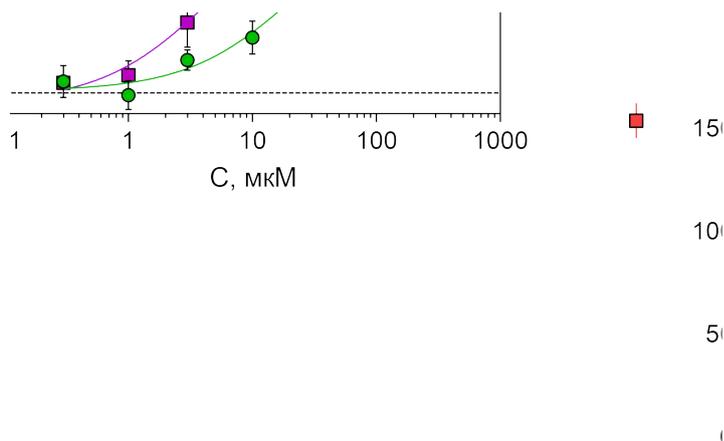


Рисунок 31 – Кривые титрования для соединения AZH-141a по влиянию на активность рекомбинантной человеческой AMPK $\alpha_1\beta_1\gamma_1$ и рекомбинантной человеческой RTP1B в сравнении с соединениями сравнения. Данные представлены как среднее \pm SD, n = 3.

6.2. Расчетные фармакокинетические и токсикологические характеристики выявленных ингибиторов RTP1B

Для предварительной оценки фармакокинетических и токсикологических свойств соединений-лидеров AZH-141a и BIF-10 был выполнен прогноз основных ADMET-характеристик *in silico* на основе консенсуса оценок 4 общедоступных сервисов – ADMETlab [235], admetSAR [15], SwissADME [183] и ProTox-II [161]. Полученные результаты представлены в таблице 18.

Согласно консенсусу оценок, вещество AZH-141a обладает приемлемой для лекарственного средства липофильностью и умеренной растворимостью в воде, достаточную для введения животным в виде раствора. Ожидается абсорбция из ЖКТ более 30%, т.е. соединение перорально биодоступно, и способность проникать через клеточные мембраны. Прочие оценки параметров фармакокинетики имеют благоприятные значения. Также, предполагается средняя острая токсичность (LD_{50} около 640 мг/кг). Опасения вызывает возможное наличие гепатотоксичности, оценка которой требует проведения дополнительных фармакологических исследований. В свою очередь, отсутствие канцерогенности и мутагенности является положительным прогнозным фактором для дальнейшего изучения фармакологической активности вещества.

Консенсус оценок для вещества BIF-10 также показал приемлемую для лекарственного средства липофильность и достаточно высокую растворимость в воде, вероятно связанную с

наличием полярной аминогруппы и положительно заряженного гетероциклического атома азота. Ожидается высокая абсорбция из ЖКТ, но способность проникать через клеточные мембраны неоднозначно оценивается разными сервисами. Кроме того, соединение, возможно, является субстратом Р-гликопротеина, что может дополнительно снижать накопление внутри клеток-мишеней. Предсказан очень низкий объем распределения и короткий период полувыведения. Предполагается низкая острая токсичность (LD_{50} около >2500 мг/кг), однако опасения вызывает возможное наличие мутагенности и канцерогенности. В целом, согласно прогнозным характеристикам, соединение BIF-10 выглядит менее перспективным, чем AZH-141a, как по фармакокинетическим особенностям, так и по показателям специфической активности.

Таблица 22 – Консенсусные прогнозные ADMET характеристики соединений AZH-141a и BIF-10

Показатель	AZH-141a	BIF-10
<i>Лекарственное подобие</i>		
Липофильность, logP	4,14	4,806
Растворимость в воде, мкг/мл	14,9	95,7
<i>Фармакокинетические показатели</i>		
Проницаемость в линии клеток Caco-2	Да	Нет консенсуса
Субстрат Р-гликопротеина	Нет	Да
Ингибитор Р-гликопротеина	Да	Да
Локализация в клетке	Митохондрии	Митохондрии
Абсорбция в ЖКТ, %	>30	>30
Проницаемость ГЭБ	Да	Нет консенсуса
Объем распределения, л/кг	0,997	0,555
Связывание с белками плазмы, %	96,2	95,1
Период полувыведения, ч.	2,18	0,51
Клиренс, мл/мин./кг	1,80	7,71
<i>Токсикологические показатели</i>		
Класс острой токсичности	3	5
Острая токсичность для крыс (LD_{50}), мг/кг	639,96	2517,50
Мутагенность (тест Эймса)	Нет	Да
Канцерогенность	Нет	Да
Гепатотоксичность	Возможна	Нет
Сенсибилизация кожи	Нет	Нет

6.3. Гипогликемическая активность на целых животных при однократном введении

Для оценки *in vivo* гипогликемической активности выявленного соединения-лидера AZH-141a был проведен исследование при однократном введении большой дозы. Соединение AZH-141a вводили интактным самцам крыс-альбиносов внутрижелудочно однократно в дозе 300 мг/кг ($n = 5$). Установлено, что введение AZH-141a достоверно снижает уровень глюкозы в крови по сравнению с контрольной группой, получавшей 1% водный раствор карбоксиметилцеллюлозы в качестве растворителя ($p < 0,05$), что сопоставимо с активностью метформина, который использовался в качестве препарата сравнения. Показано, что соединение AZH-141a снижает уровень глюкозы на 12,5% от исходного уровня через 2 ч после приема и на 18,5% через 6 ч после приема без развития гипогликемии (рис. 3).

Соединение BIF-10 вводилось в той же дозе и тем же путем. Выявлено, что во всех временных точках концентрация глюкозы в крови животных опытной группы статистически не отличалась от значений контрольной группы. В силу отсутствия гипогликемической активности при однократном введении соединение BIF-10 было исключено из дальнейшего исследования.

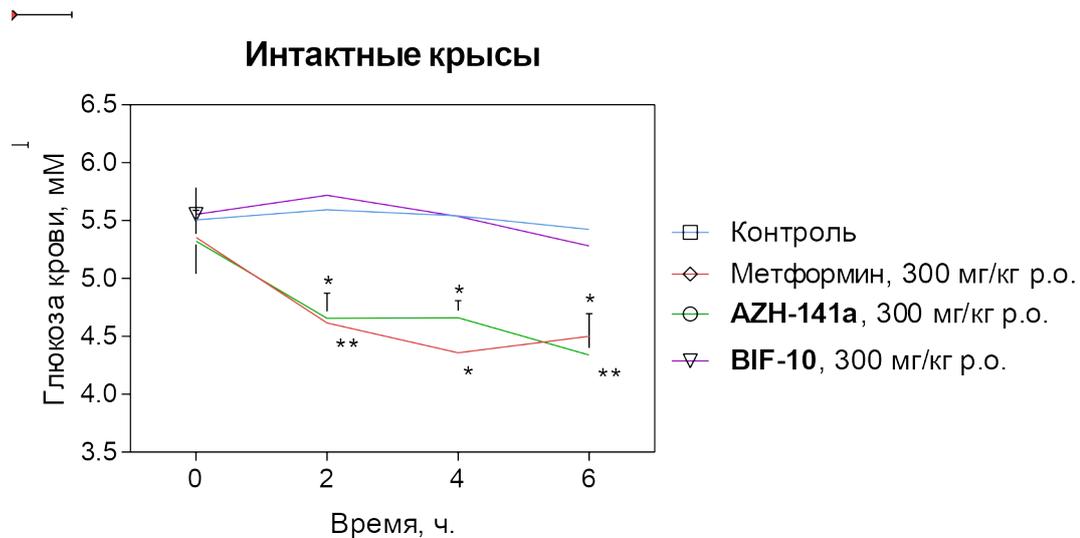


Рисунок 32 – Разовая доза AZH-141a оказывает гипогликемическое действие на интактных самцах крыс-альбиносов, соединение BIF-10 не проявило активности. Данные представлены в виде среднего \pm SD ($n = 5$). Значения p определялись с помощью двустороннего ANOVA с поправкой Гринхауса-Гейссера и множественным сравнением тестом Даннетта, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой в тот же момент времени.

6.4. Антидиабетическая активность при длительном введении

Позитивные результаты исследований AZH-141a *in vitro* показали ингибирующую активность в отношении РТР1В и способность активировать АМРК. В совокупности со значимой гипогликемической активностью при однократном введении животным это стало обоснованием оценки антидиабетических свойств AZH-141a при длительном введении. Соединение вводили в

течение 21 дня самцам крыс-альбиносов с алиментарным ожирением, получавшим диету с высоким содержанием жиров (58% потребляемых калорий из жиров) с STZ-индуцированным диабетом (35 мг/кг внутривнутрибрюшинно). Данная экспериментальная модель СД2 характеризуется повышенной массой тела животных, увеличением площади адипоцитов, постепенным развитием гипергликемии и инсулинорезистентности через рецептор-опосредованный механизм [52], что делает ее подходящей для изучения ингибиторов PTP1B, восстанавливающих активность сигнального пути инсулина.

Согласно литературным данным, касающимся исследований *in vivo* прямых активаторов АМРК в моделях сахарного диабета и/или метаболического синдрома, для AZH-141a была выбрана доза 30 мг/кг один раз в день [102] (Рисунок 33). Метформин применяли в качестве препарата сравнения в дозе 300 мг/кг, поскольку известно, что он обладает аналогичным механизмом действия [170]. Непрямая активация АМРК метформином нормализует гипергликемию путем подавления глюконеогенеза в печени и улучшения периферической резистентности к инсулину.

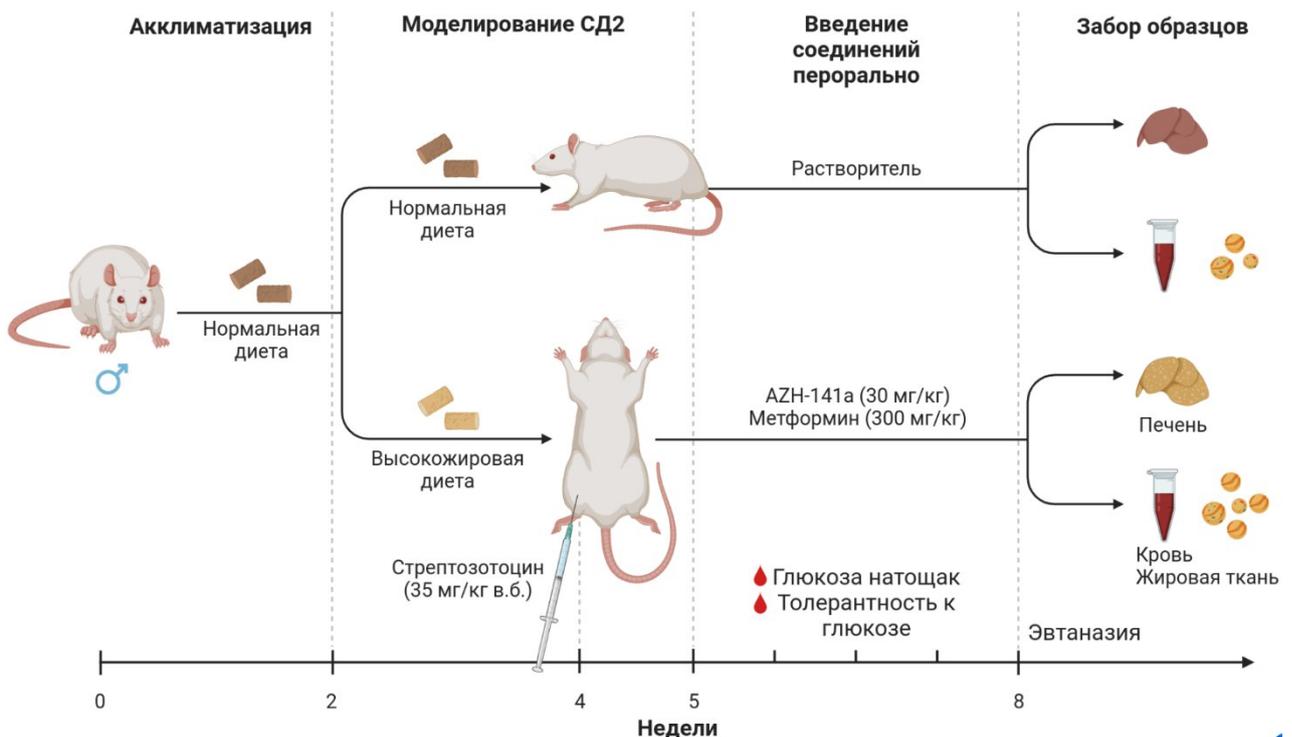


Рисунок 33 – Дизайн эксперимента по изучению антидиабетической активности AZH-141a при длительном введении.

6.4.1. Антигипергликемическая активность

Все крысы, поступившие в исследование, дожили до конца исследования. Индукция диабета у подопытных крыс была подтверждена высокой концентрацией глюкозы в крови натощак. Влияние AZH-141a на уровень глюкозы в крови натощак у диабетических животных

представлено на рис. 31. При 3-недельном терапевтическом введении AZH-141a уровень глюкозы в плазме значительно снижалась по сравнению с исходными значениями ($13,6 \pm 0,7$ мМ против $21,9 \pm 0,9$ мМ, $p < 0,05$) и с контрольной группой ($13,6 \pm 0,7$ мМ против $21,4 \pm 1,8$ мМ, $p < 0,05$). Животные, получавшие метформин, показали большее снижение уровня глюкозы в плазме во всех дневных точках 3-недельного экспериментального периода.

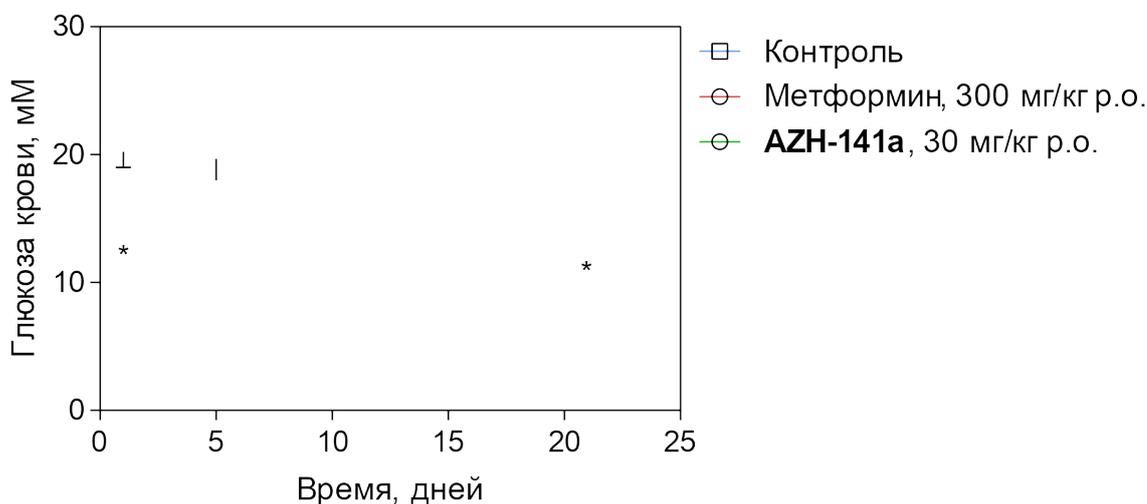


Рисунок 34 – Влияние на концентрацию глюкозы крови натошак. Данные представлены в виде среднего \pm SD ($n = 6$). Значения p определялись с помощью двустороннего ANOVA с поправкой Гринхауса-Гейссера и множественным сравнением тестом Даннетта, * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой в тот же момент времени.

Стандартный пероральный тест толерантности к глюкозе был выполнен на следующий день после последнего введения веществ для оценки гликемического контроля. Обе экспериментальные группы показали значительное улучшение толерантности к глюкозе (рис. 32), однако было обнаружено, что метформин превосходит AZH-141a по снижению площади под кривой «глюкоза-время» ($p = 0,0015$).



Рисунок 35 – Влияние на толерантность к глюкозе (2 г/кг) в после 21 дня введения соединений. Данные представлены как среднее±SD (n = 6). Статистическая значимость к группе ВЖД (2-сторонний ANOVA с пост-специальным тестом Туки для графиков глюкоза-время, непарный *t*-тест для площадей под кривыми): **p* <0,05; ***p* <0,01; ****p* <0,001; *****p* <0,0001.

6.4.2. Влияние на массу тела и жировой обмен

Масса тела в группах AZH-141a и метформина была аналогична таковой в контрольной группе в течение 3 недель лечения. Соединение AZH-141a и метформин имеют тенденцию только снижать массу тела диабетических животных в конце исследования. Для крыс, получавших AZH-141a, и крыс, получавших метформин, не было выявлено существенных различий в массе тела по сравнению с контрольными крысами, получавшими отрицательное воздействие на транспортное средство, после 3-недельного экспериментального периода (рис. 4a).

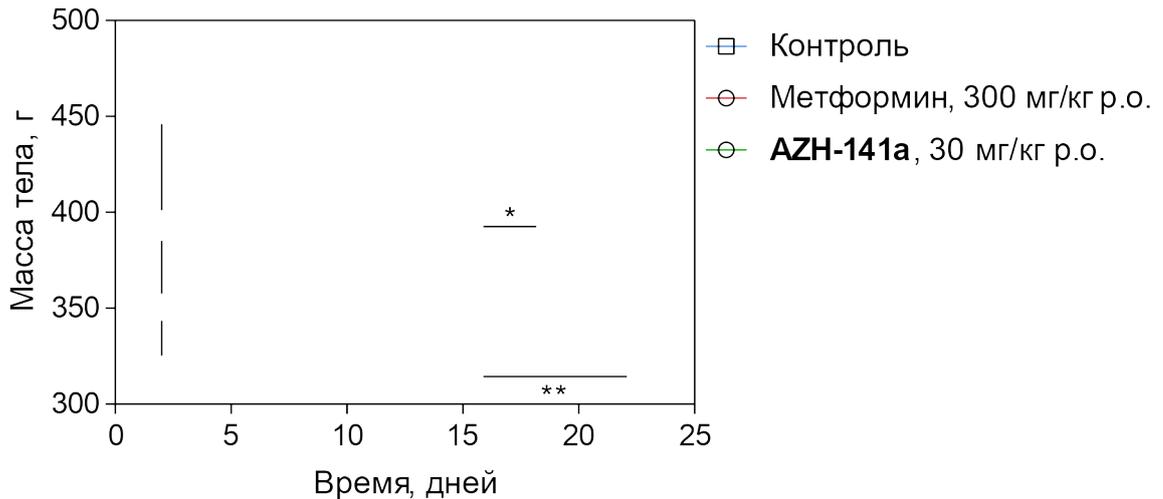


Рисунок 36 – Влияние соединения AZH-141a (30 мг/кг) и метформина (300 мг/кг) на массу тела животных с СД2 во время курсового введения. Данные представлены как среднее \pm SD (n = 6). Статистическая значимость (2-сторонний ANOVA с пост-тестом Туки) к группе контроля: * $p < 0,05$.

Общая масса висцеральной жировой ткани (сумма висцеральных, забрюшинных и придаточных жировых подушечек, собранных в конце эксперимента) была достоверно снижена после 3-недельного экспериментального периода только в группе, получавшей метформин (по сравнению с контрольными крысами) ($p < 0,05$). Не было статистической значимости в общей жировой массе, оцененной у животных, получавших AZH-141a. Как эпидидимальный, так и забрюшинный жировой вес были одинаково снижены в группе метформина с контрольной группой ($p < 0,05$). Морфометрическое исследование показало, что уменьшение массы жировой ткани на фоне введения AZH-141a было обусловлено главным образом уменьшением забрюшинной и эпидидимальных отложений ($p = 0,0265$ и $p = 0,0071$ по сравнению с контрольной группой, соответственно).

а**б**

Рисунок 37 – Влияние 21-дневного введения метформина и AZH-141a на липидный обмен крыс HFD+STZ (n = 6). а, Общая масса висцерального жира. б, Вес основных висцеральных жировых депо. Данные представлены как среднее \pm SD, n = 6. Статистическая значимость к группе контроля (1-сторонний ANOVA с пост-тестом Данна): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Антидиабетическая активность AZH-141a подтверждена биохимическим определением липидов в периферической крови подопытных животных (рис. 35). Хотя достоверного снижения триглицеридов не наблюдалось ($p = 0,4587$), AZH-141a привело к заметному снижению общего холестерина ($p = 0,0116$) и проатерогенных липопротеидов низкой плотности ($p = 0,0037$) с сопутствующим накоплением липопротеидов высокой плотности ($p = 0,0473$). Эти результаты показывают, что AZH-141a улучшает липидный обмен у крыс с диабетом с ожирением.

а**б**

Рисунок 38 – Влияние 21-дневного введения метформина и AZH-141a на липидный обмен крыс HFD+STZ (n = 6). а, Триглицериды периферической крови. б, Общий холестерин периферической крови. Данные представлены как среднее \pm SD, n = 6. Статистическая значимость к группе контроля (1-сторонний ANOVA с пост-тестом Данна): * $p < 0,05$.

а**б**

Рисунок 39 – Влияние 21-дневного введения метформина и AZH-141a на липидный обмен крыс HFD+STZ (n = 6). а, Липопротеины низкой плотности периферической крови. б, Липопротеины высокой плотности периферической крови. Данные представлены как среднее \pm SD, n = 6. Статистическая значимость к группе контроля (1-сторонний ANOVA с пост-тестом Данна): *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001.

а**б**

Рисунок 40 – Влияние 21-дневного введения метформина и AZH-141a на липидный обмен крыс HFD+STZ (n = 6). а, Индекс массы тела. б, Индекс Ли. Данные представлены как медиана и 5-95 перцентили. Статистическая значимость к группе контроля (1-сторонний ANOVA с пост-тестом Данна): *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001.

6.4.3. Острая токсичность при пероральном введении

При изучении острой токсичности соединения AZH-141a при однократном пероральном введении белым мышам обоих полов установлено значение LD₅₀ 163,8 \pm 24,5 мг/кг, что позволяет отнести его к 3 классу умеренно токсичных соединений согласно ГОСТ 12.1.007-76 2007 г.

6.5. Заключение

В результате скрининга фокусированной библиотеки из 51 соединения выявлено 12 активных, подавлявших специфическую активность РТР1В на 50% и более. Из числа последних валидировано 9 ингибиторов, обладающих активностью в микромолярном диапазоне. Наиболее активные соединения являются бифенильными производными 2-иминобензимидазола. Одно из наиболее активных соединений AZH-141a является не только ингибитором РТР1В, но и микромолярным активатором АМРК.

Для двух соединений-лидеров AZH-141a и BIF-10 выполнен прогноз и показаны благоприятные расчетные характеристики лекарственного подобия, при этом для AZH-141a консенсус оценок фармакокинетических свойств и специфической токсичности более благоприятен. При исследовании антидиабетической активности на животных выявлено, что AZH-141a, но не BIF-10, обладает гипогликемическим эффектом при однократном введении интактным крысам в дозе 300 мг/кг перорально.

При 21-дневном введении крысам с ожирением и экспериментальным СД2 AZH-141a в дозе 30 мг/кг также обладает антигипергликемической активностью и улучшает толерантность к глюкозе. Соединение предотвращало увеличение массы тела животных и оказывало нормализующее влияние на массу висцеральных жировых отложений, хотя и менее выраженное, чем у метформина в дозе 300 мг/кг. При этом положительное влияние на липидный профиль периферической крови (снижение концентраций общего холестерина и липопротеинов низкой плотности при повышении концентрации липопротеинов высокой плотности) было более существенным для AZH-141a. В целом, эти результаты можно рассматривать как доказательство концепции того, что соединение, модулирующее активность двух мишеней терапии СД2 (в данном случае, АМРК и РТР1В) может обладать значимым и устойчивым антидиабетическим эффектом, несмотря на относительно невысокую аффинность к этим ферментам в условиях *in vitro*.

Глава 7. Поиск активаторов глюкокиназы (GCK). Фармакологические свойства активатора GCK NP-0006

7.1. Экспериментальный скрининг. Взаимосвязь «структура-активность»

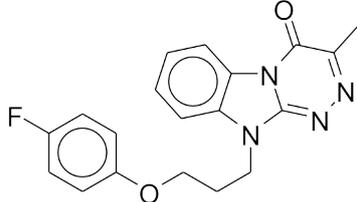
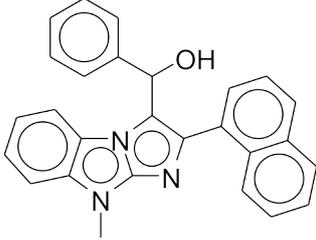
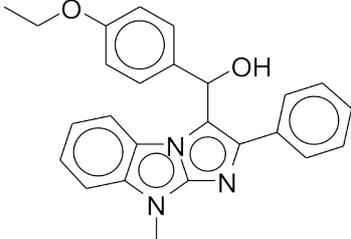
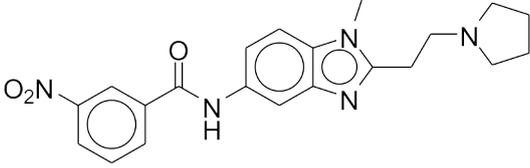
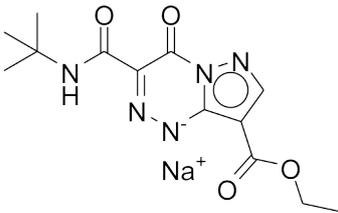
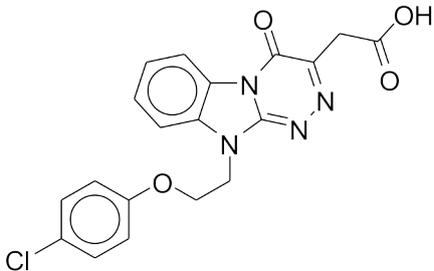
Для соединений из GCK-фокусированной библиотеки, сформированной как описано выше, было определено влияние на активность человеческой рекомбинантной глюкокиназы в микропланшетном формате. Активность фермента оценивалась по реакции восстановления НАД⁺, сопряженной с фосфорилированием глюкозы, с использованием спектрофлуориметрического анализа. В качестве положительного контроля использовали аллостерический активатор GCK *N,N*-диметил-5-((2-метил-6-((5-метилпиразин-2-ил)карбамоил)бензофуран-4-ил)окси)пиримидин-2-карбоксамид (PF-04937319) [205].

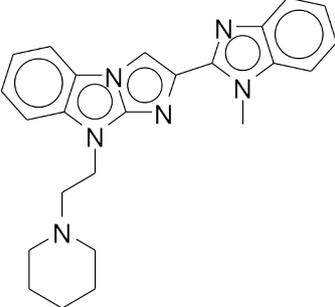
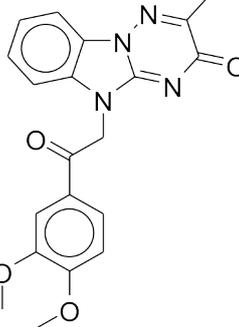
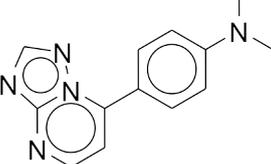
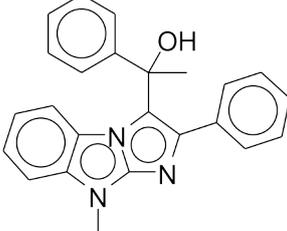
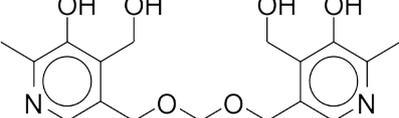
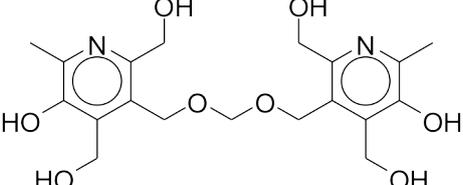
На начальном этапе 127 соединений фокусированной библиотеки исследовались в концентрации 100 мкМ в двух повторах (см. Приложение 5). Два соединения, относящиеся к производным пиридина, показали статистически значимую ингибирующую активность, 93 соединения не оказывали значимого влияния на активность GCK. Оставшиеся 32 соединения активировали GCK на 50% и более. Последующие эксперименты с активными соединениями проводили в диапазоне концентраций ингибиторов от 10 нМ до 100 мкМ для определения величин EC₅₀. Данные по наиболее активным соединениям обобщены в Таблице 16. Всего валидировано 27 активаторов GCK, большинство из них показали величины полумаксимального активирования в верхнем микромолярном диапазоне, только у 9 соединений показана EC₅₀ менее 100 мкМ. При исследовании их аналогов в синтетических рядах выявлено, что они обладают меньшей активностью.

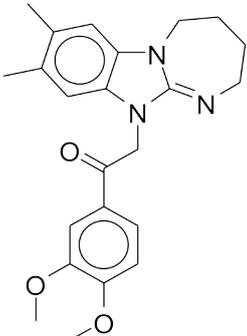
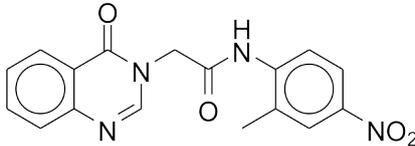
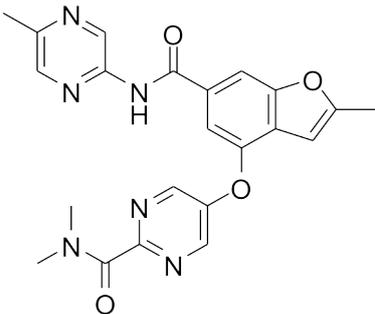
Установлено, что максимальной GCK-активирующей активностью обладают соединения, содержащие два остатка пиридоксина, соединенных линкерным серусодержащим алифатическим фрагментом, например, NP-0001, NP-0006, NP-0061, NP-0063. При этом их аналоги, имеющие кислородсодержащий (Rom-1, Rom-2) или азотсодержащий (R-0136) линкерный фрагмент, проявляют в 2-5 раз меньшую активность. Наиболее активные соединения NP-0001 и NP-0006 уступает соединению сравнения PF-04937319 по значению EC₅₀, которая характеризует аффинность к молекуле фермента, однако сопоставимы с ним по величине максимального эффекта, т.е. эффективности. Известны активаторы GCK, содержащие пиридин или аналогичные конденсированные гетероциклические системы [66; 192; 230]. При этом производные пиридоксина, как и соединения, содержащие два пиридиновых остатка, аналогичные NP-0001 и NP-0006, ранее не были описаны в литературе как активаторы GCK.

№	Шифр соединения	Структурная формула	Активирование GCK в 100 мкМ ($m \pm SD$), %	GCK EC ₅₀ , мкМ
1.	NP-0006		150,55±1,77*	18,56
2.	NP-0001		130,45±0,99*	33,40
3.	HC-0281		199,11±3,15*	35,49
4.	NP-0061		84,54±1,31*	43,77
5.	MBX-2982		83,51±4,46*	45,11
6.	NP-0063		90,66±1,16*	47,71
7.	KD-0069		119,03±6,37*	143,2

№	Шифр соединения	Структурная формула	Активирование GCK в 100 мкМ ($m \pm SD$), %	GCK EC ₅₀ , мкМ
8.	R-0136		177,36±0,41*	144,7
9.	LOSUK-0019		66,96±5,14*	147,2
10.	RU-0057		68,97±1,25*	165,8
11.	14102		154,47±2,71*	173,4
12.	TONS-0506		164,52±7,34*	186,1
13.	KD-0006		85,85±5,73*	188,5

№	Шифр соединения	Структурная формула	Активирование GCK в 100 мкМ ($m \pm SD$), %	GCK EC ₅₀ , мкМ
14.	KD-0068		176,11±1,92*	279,5
15.	RU-0052		254,54±5,99*	517,6
16.	RU-0053		167,85±4,97*	563,5
17.	RYUVK-0042		41,49±1,00*	693,5
18.	IS-0255		107,69±5,67*	744,9
19.	KD-0054		206,01±5,23*	1522

№	Шифр соединения	Структурная формула	Активирование GCK в 100 мкМ ($m \pm SD$), %	GCK EC ₅₀ , мкМ
20.	RU-0688		125,36±7,95*	2416
21.	RUS-0189		103,22±3,82*	3411
22.	HC-0438		97,45±14,5*	7600
23.	RU-0055		214,08±3,46*	82050
24.	Rom-1		49,79±18,78*	139,9
25.	Rom-2		89,83±13,83*	97,33

№	Шифр соединения	Структурная формула	Активирование GCK в 100 мкМ ($m \pm SD$), %	GCK EC ₅₀ , мкМ
26.	DAB-0031		55,34±4,10*	66,51
27.	SHQU-0006		95,73±7,74*	68,92
28.	Соединение сравнения PF-04937319		154,36±5,32*	6,80

* Данные статистически значимы по отношению к отрицательному контролю (тест Манна-Уитни, $p < 0,05$).

7.2. Расчетные фармакокинетические и токсикологические характеристики выявленных активаторов GCK

Для предварительной оценки фармакокинетических и токсикологических свойств наиболее активных соединений NP-0001 и NP-0006 был выполнен прогноз основных ADMET-характеристик *in silico* на основе консенсуса оценок 4 общедоступных сервисов – ADMETlab [235], admetSAR [15], SwissADME [183] и ProTox-II [161]. Полученные результаты представлены в таблице 20.

Согласно консенсусу оценок, оба соединения обладают схожими характеристиками, что, очевидно, обусловлено близостью их структур. NP-0001 и NP-0006 обладают приемлемой для лекарственного средства липофильностью и достаточно высокой растворимостью в воде, достаточную для введения животным в виде раствора. При этом ожидается низкая

способность проникать через клеточные мембраны и всасываемость через тонкий кишечник, вероятно пероральная биодоступность менее 20%. Прочие оценки параметров фармакокинетики имеют более благоприятные значения. Так, предполагается средняя способность связываться с белками плазмы крови, меньшая для NP-0006, и соответственно, несколько больший объем распределения.

Таблица 24 – Консенсусные прогнозные ADMET характеристики соединений NP-0001 и NP-0006

Показатель	NP-0001	NP-0006
<i>Лекарственное подобие</i>		
Липофильность, logP	1,31	1,01
Растворимость в воде, мкг/мл	229,3	447,1
<i>Фармакокинетические показатели</i>		
Проницаемость в линии клеток Caco-2	Низкая	Низкая
Субстрат Р-гликопротеина	Нет консенсуса	Нет консенсуса
Ингибитор Р-гликопротеина	Нет	Нет
Всасывание в кишечнике	Низкое	Низкое
Абсорбция в ЖКТ, %	<20	<20
Проницаемость ГЭБ	Нет консенсуса	Нет консенсуса
Объем распределения, л/кг	9,75	8,73
Связывание с белками плазмы, %	75,1	67,4
Период полувыведения, ч.	1,48	1,35
Клиренс, мл/мин./кг	0,99	1,31
<i>Токсикологические показатели</i>		
Класс острой токсичности	5	5
Острая токсичность для крыс (LD ₅₀), мг/кг	2537,0	2250,0
Мутагенность (тест Эймса)	Нет	Нет
Канцерогенность	Нет	Нет
Гепатотоксичность	Нет	Нет
Сенсибилизация кожи	Нет	Нет

Оба соединения, согласно прогнозу, относятся к 5-ому классу токсичности. Средняя острая токсичность LD₅₀ ожидается в диапазоне 2250-2500 мг/кг. Также, соединения не относятся к кластерам кардиотоксичности, канцерогенности, мутагенности и гепатотоксичности.

В целом, компьютерный прогноз ADMET показал, что соединения NP-0001 и NP-0006 обладают высокой степенью лекарственного подобия, включая растворимость в воде. Потенциальные проблемы связаны с консенсусом по низкой пероральной биодоступности и клеточной проницаемости, что может существенно ограничить фармакологический и терапевтический потенциал соединений. Положительным прогнозным фактором для дальнейшего изучения активности соединений является их безопасность согласно оценкам острой и специфической токсичности.

7.3. Цитотоксичность выявленных активаторов GSK

Для оценки цитотоксичности наиболее активных соединений, идентифицированных как активаторы GSK, оценивалось их влияние на жизнеспособность перитонеальных макрофагов мышей C57bl/6j после 24 часов инкубации с помощью МТТ-теста. Как показано на рисунке 38, соединения NP-0001 и NP-0006 не проявляют цитотоксичности вплоть до концентрации 250 мкМ, которая примерно в 10 раз превышает значения EC_{50} , полученные при функциональном анализе влияния соединений на GSK *in vitro*. Для активаторов GSK не описаны противовоспалительные свойства, поэтому в данном случае определение влияния на ЛПС-стимулированные макрофаги не проводилось.

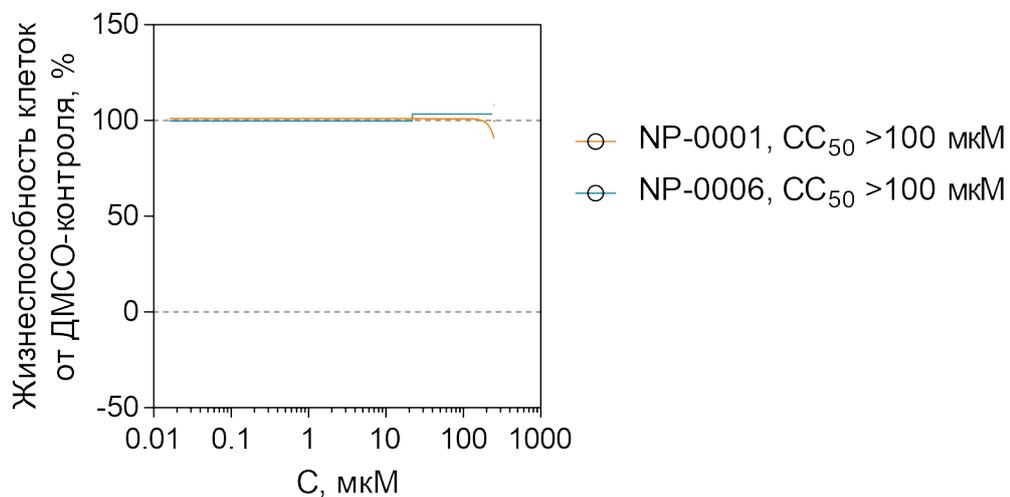


Рисунок 41 – Жизнеспособность перитонеальных макрофагов мышей C57bl/6j выявленных активаторов GSK по данным МТТ-теста. Данные представлены как среднее±SD, n = 4. Статистическая значимость к ДМСО-контролю (1-сторонний ANOVA с пост-тестом Даннетта): * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$; **** $p < 0.0001$.

Также, была определена цитотоксичность наиболее активных соединений на неонатальных фибробластах сердца крыс SD после 24 часов инкубации. Соединения-лидеры NP-

0001 и NP-0006 не подавляют жизнеспособность клеток в концентрации 20 мкМ, что соответствует концентрации, необходимой для активирования GSK. Таким образом, оба соединения-лидера обладают низкой цитотоксичностью в отношении нормальных клеток, что позволяет надеяться на достаточную терапевтическую широту для проявления антидиабетического эффекта.

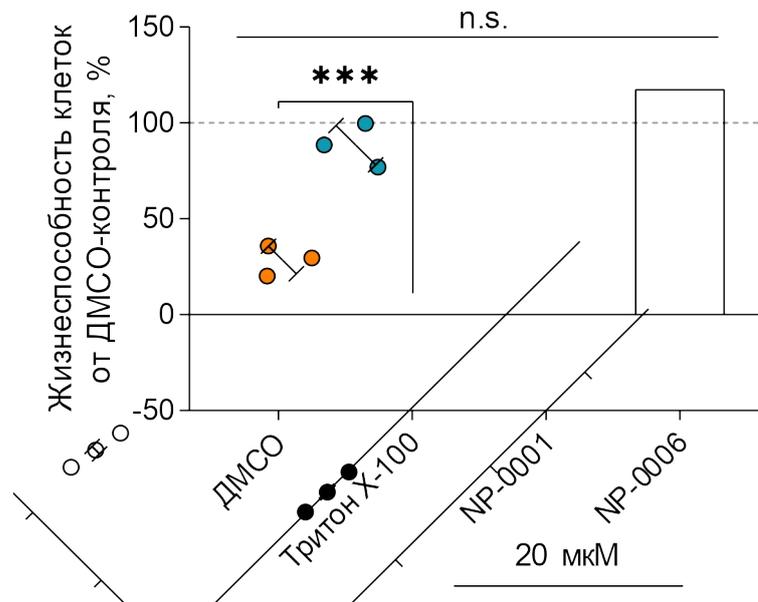


Рисунок 42 – Влияние выявленных активаторов GSK на жизнеспособность неонатальных фибробластах сердца крыс по данным МТТ-теста. Данные представлены как среднее±SD, n = 3. Данные представлены как среднее ± SD, n = 3. Статистическая значимость к группе ДМСО (1-сторонний ANOVA с пост-тестом Даннетта): *** $p < 0.0005$.

7.4. Антигипергликемическая активность на животных при однократном введении

Известно, что влияние активаторов GSK на концентрацию глюкозы в крови опосредовано влиянием как на GSK β -клеток поджелудочной железы, так и гепатоцитов. GSK является ключевым ферментом, участвующим в гомеостазе глюкозы, действуя как датчик глюкозы в β -клетках поджелудочной железы. В частности, активация GSK ведет к открытию потенциал-зависимых кальциевых L-каналов, стимулируя экзоцитоз гранул инсулина, нормализуя постпрандиальную гипергликемию [440].

Для первоначальной оценки способности наиболее активных выявленных соединений NP-0001 и NP-006 влиять на гомеостаз глюкозы *in vivo* они были исследованы в пероральном тесте толерантности к глюкозе на интактных нелинейных крысах-самцах. Способность активаторов GSK улучшать толерантность к глюкозе у интактных крыс известна из литературы [192]. В качестве препарата сравнения был выбран вилдаглиптин, т.к. потенцированное им увеличение концентрации GLP-1 также стимулирует глюкозо-стимулированную секрецию

инсулина [64]. Для обеспечения максимальной биодоступности и исключения эффекта первого прохождения через печень соединения вводились внутривнутрибрюшинно.

Учитывая невысокую активностью соединений *in vitro* (GCK IC₅₀ от 19 до 33 мкМ), исследуемые субстанции вводились животным в диапазоне доз от 30 до 500 мг/кг. Было показано, что статистически значимой антигипергликемической активностью обладает только соединение NP-0006 при введении в дозах 300 мг/кг и 500 мг/кг внутривнутрибрюшинно. Соединение NP-0001 в дозах 30 мг/кг и 500 мг/кг внутривнутрибрюшинно не оказывало статистически значимого влияния на площадь под кривой глюкоза-время при глюкозной нагрузке, а в дозе 300 мг/кг даже увеличивало выраженность гипергликемии ($p < 0,0001$).

На следующем этапе исследовали влияние данных соединений на толерантность к глюкозе при пероральном введении с помощью желудочного зонда. В этом случае ни NP-0001, ни NP-0006 в эффективной при внутривнутрибрюшинном введении дозе 300 мг/кг не показали активности, статистически незначимо увеличивая площадь под кривой глюкоза-время. Препарат сравнения вилдаглиптин во всех экспериментальных сериях и при обоих способах введения обладал устойчивым и значимым антигипергликемическим эффектом. Сводные данные по активности соединений в пероральном тесте толерантности к глюкозе приведены на Рис. 38. Дополнительно в пероральном тесте толерантности к глюкозе исследованы, но не показали активности соединения 14102, HC-0281, KD-0069 и LOSUK-0019, проявившие меньшую активность в отношении GCK *in vitro*.

Таким образом, из двух исследованных при однократном введении животным соединений только NP-0006 подтвердило способность улучшать толерантность к глюкозе. В силу неэффективности соединения при пероральном введении, в дальнейших исследованиях использовался внутривнутрибрюшинный путь введения.

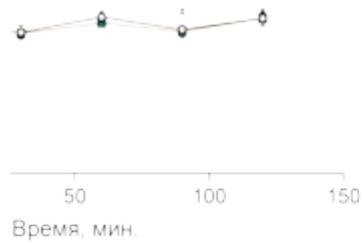


Рисунок 43 – Влияние соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения вилдаглиптина (10 мг/кг в/б) на глюкозотолерантность в пероральном тесте толерантности к глюкозе (2 г/кг) на интактных животных (А). Площадь под кривой глюкоза-время (Б). Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к интактному контролю, критерий 2-way ANOVA с пост-тестом Даннета (** $p < 0,0003$).

Время, мин.

Рисунок 44 – Влияние соединения NP-006 (500 мг/кг, в/б) и препарата сравнения вилдаглиптина (10 мг/кг в/б) на глюкозотолерантность в пероральном тесте толерантности к глюкозе (2 г/кг) на интактных животных (А). Площадь под кривой глюкоза-время (Б). Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к интактному контролю, критерий 2-way ANOVA с пост-тестом Даннета (* $p < 0,0304$; *** $p < 0,0009$; **** $p < 0,0001$).



Рисунок 45 – Антигипергликемический эффект вилдаглиптина, соединения NP-0001 и соединения NP-0006 при пероральной нагрузке 2 г/кг глюкозы у интактных крыс. А). Внутривенное введение соединений (в.в.). Б). Пероральное введение соединений (п.о.). Данные представлены как среднее \pm SD, n = 3. Статистическая значимость к группе вилдаглиптина (1-сторонний ANOVA с пост-тестом Даннетта).

7.5. Антидиабетическая активность при длительном введении

Для расширенного изучения антидиабетической активности соединения-лидера NP-0006 была выбрана модель СД2, вызванного 10-недельным содержанием мышей C57bl/6j на высокожировой диете (DIO-C57bl/6j). Подтверждением развития патологии служили статистически значимые повышение массы тела, гипергликемия натощак, нарушение толерантности к глюкозе и гиперинсулинемия, как это описано выше в Главе 5. Как показано выше, дозы 300 мг/кг и 500 мг/кг NP-0006 внутрибрюшинно обладают сравнимой эффективностью на интактных животных, однако введение в дозе 500 мг/кг осложнено недостаточной растворимостью субстанции (при введении в объеме 10 мл/кг образуется суспензия), что создает технологические трудности, особенно при многократном введении.

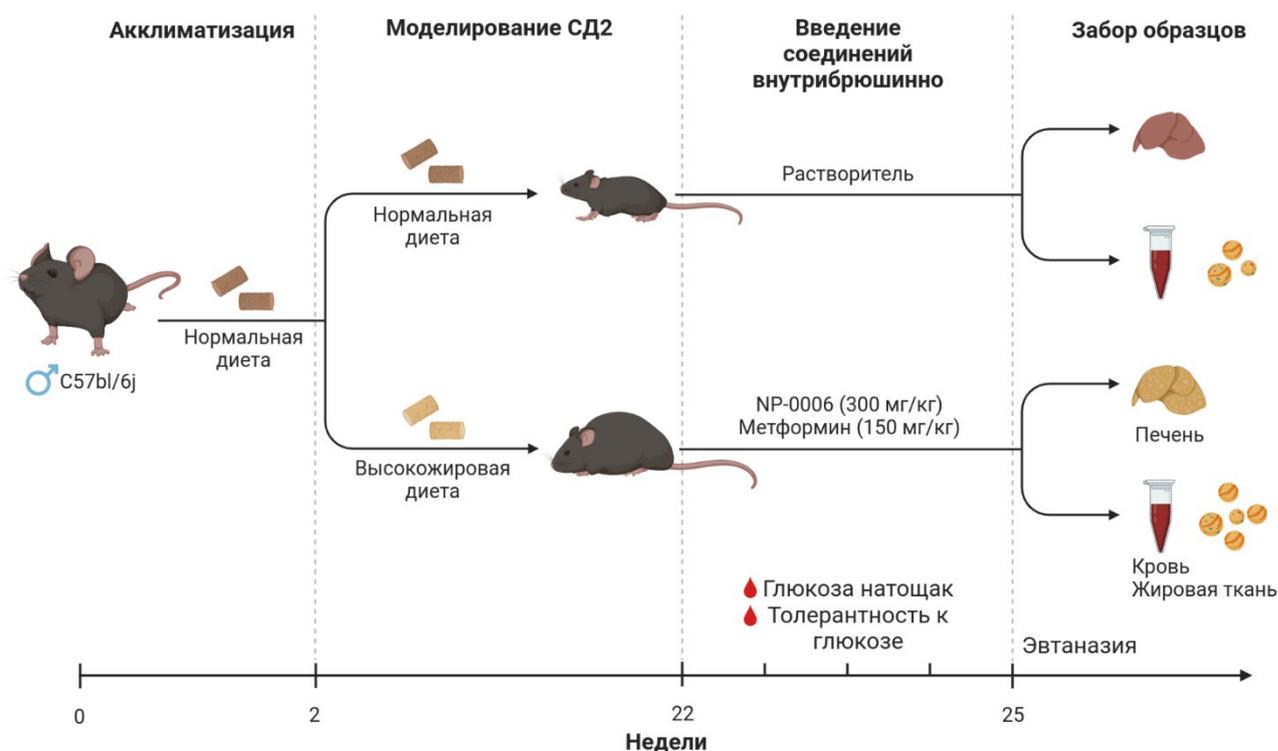


Рисунок 46 – Дизайн эксперимента по изучению антидиабетической активности NP-0006 при длительном введении.

Поэтому для изучения антидиабетической активности NP-0006 при курсовом введении была выбрана доза 300 мг/кг внутрибрюшинно (Рисунок 46). В качестве препарата сравнения был выбран метформин в дозе 150 мг/кг внутрибрюшинно, что основано на литературных данных о сравнительном изучении активности активаторов GSK и метформина [335]. Курсовое введение соединений проводилось ежедневно в течение 21 дня в утренние часы. В интактной группе мыши C57BL/6J содержались на нормальной диете, все экспериментальные группы получали высокожировую диету на протяжении всего исследования.

Эффект соединений на различные маркеры СД2 оценивался по следующим показателям: глюкоза крови натощак, толерантность к глюкозе, инсулин плазмы крови и показатель инсулинорезистентности (влияние на углеводный обмен); масса тела и висцеральных жировых отложений, триглицеридов печени (влияние на жировой обмен); лейкоцитарная формула, циркулирующие иммунные комплексы крови (влияние на системное воспаление).

7.5.1. Антигипергликемическая активность

Гликемический контроль является одним из важнейших компонентов эффективности антидиабетических средств. В группе ВЖД гипергликемия натощак стала статистически значимой к 21-дню эксперимента. У животных, получавших как метформин, так и NP-0006, отмечена нормализация гликемии натощак на 21-ый день введения. Эффект был статистически значимым к группе ВЖД для группы, получавшей NP-0006. В первый день введения исследуемых соединений средний уровень глюкозы крови интактных животных составил $6,13 \pm 0,23$ мМ, в группе ВЖД – $6,50 \pm 0,08$ мМ. На 90-й день введения веществ интактные животные сохраняли нормальное значение гликемии ($6,09 \pm 0,10$ мМ), в группе ВЖД показан прирост на 16% к 1-ому дню. Метформин нормализовал глюкозу крови натощак ($6,05 \pm 0,27$ мМ), эффект соединения NP-0006 был наиболее выраженным ($5,49 \pm 0,16$ мМ).

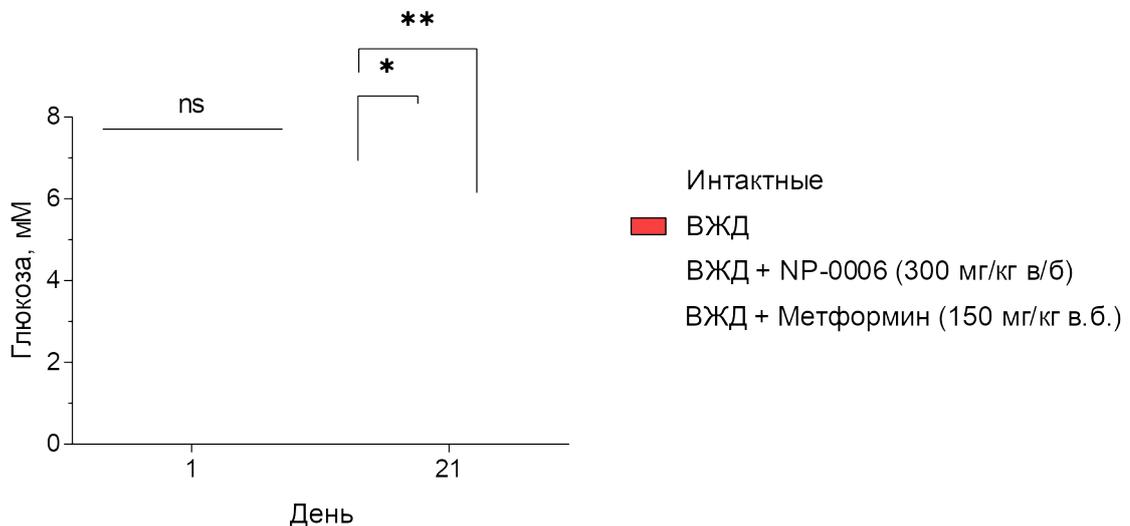


Рисунок 47 – Влияние соединения NP-0006 (300 мг/кг) и метформина (150 мг/кг) на концентрацию глюкозы крови у мышей DIO-C57bl/6J во время курсового введения. Данные представлены как среднее \pm SD (n = 6). Статистическая значимость (2-сторонний ANOVA с пост-тестом Туки): *p < 0,05, **p < 0,01 к интактной группе.

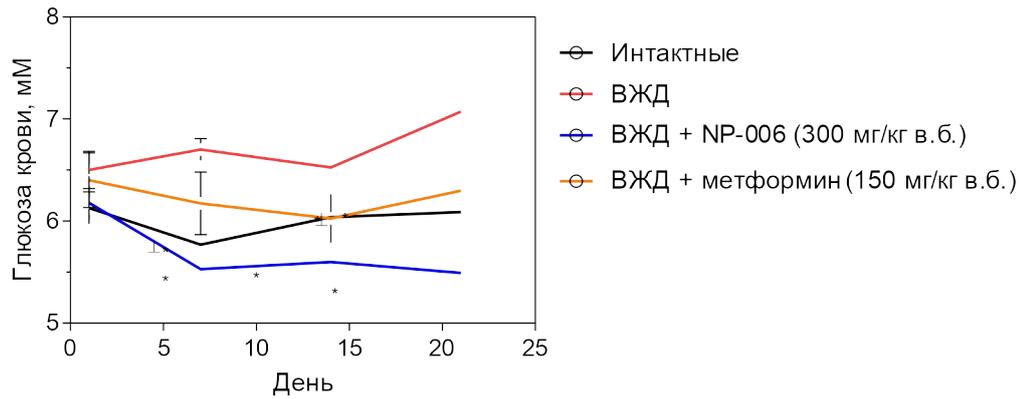


Рисунок 48 – Динамика глюкозы крови мышей DIO-C57bl/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, под влиянием соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) в течение хронического введения. Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к группе СД, критерий 2-way ANOVA с пост-тестом Даннета (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$); группа интактного контроля по отношению к группе СД, критерий 2-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($^{\dagger}p < 0,05$).

Нормализацию углеводного обмена оценивали также с помощью интраперитонеального теста толерантности к глюкозе, который проводили в последний день введения соединений. У группы ВЖД нагрузка глюкозой вызывала гипергликемический ответ с пиком через 30 минут. Максимальная концентрация глюкозы крови для группы ВЖД составила $11,65 \pm 0,52$ мМ. Метформин снижал пик гипергликемии до $7,83 \pm 0,51$ мМ, при этом площадь под кривой глюкоза-время снижалась на 31,3% относительно контрольной группы. Эффект соединения NP-0006 был сравним с эффектом метформина (максимальная концентрация составила $8,70 \pm 0,54$ мМ, снижение площади под кривой глюкоза-время 27,9%).

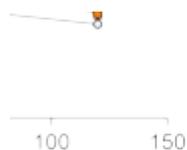


Рисунок 49 – Влияние NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на глюкозотолерантность мышей DIO-C57bl/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, в интраперитонеальном тесте толерантности к глюкозе (1 г/кг) при длительном введении (А). Площадь под кривой глюкоза-время (Б). Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к группе СД, критерий 2-way ANOVA с пост-тестом Даннета (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

В гомогенате ткани печени животных, получавших NP-0006, было показано выраженное увеличение активности глюкокиназы. Соответственно, отмечена нормализация содержания в печени гликогена (рост на 21,7% к группе ВЖД, $p > 0,05$). Таким образом, соединение NP-0006 активировало глюкокиназу печени и стимулировало нарушенный ВЖД захват и хранение глюкозы в виде гликогена. Это важное подтверждение молекулярного механизма действия соединения в условиях целого организма.



Рисунок 50 – Влияние NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на активность глюкокиназы и содержание гликогена печени мышей DIO-C57bl/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой при длительном введении. Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к группе СД, критерий 2-way ANOVA с пост-тестом Даннета (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Другим важным аспектом оценки антидиабетической активности служила концентрация инсулина и индекс инсулинорезистентности НОМА-IR. Мыши DIO-C57BL/6J по сравнению с интактными C57BL/6J, получавшими стандартную диету, развили не только гипергликемию, но и выраженную гиперинсулинемию, что соответствует литературным данным [302]. Рост концентрации инсулина в плазме крови составил 2,23 раза, а индекса инсулинорезистентности НОМА-IR на 2,02 раза. У мышей, получавших метформин, наблюдалось снижение данных показателей до уровня, статистически не отличающегося от уровня интактных животных. Соединение NP-0006 также достоверно нормализовало инсулин крови и НОМА-IR до значений интактной группы, снижение составило 65,8% и 73,4%, соответственно.



Рисунок 51 – Влияние соединения NP-0006 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на концентрацию глюкозы (а) и инсулина (б) плазмы крови, индекс НОМА-IR (в). Данные представлены как среднее \pm SD (n = 6). Статистическая значимость (непарный t-тест): *p < 0,05, **p < 0,01 к группе ВЖД; #p < 0,05, ##p < 0,01 к интактной группе.

7.5.2. Влияние на жировой обмен

Влияние на жировой обмен оценивалось по совокупности морфометрических и биохимических показателей. До начала введения соединений средняя масса тела животных всех экспериментальных групп статистически превышала среднюю массу интактных животных. После 21 дня введения соединений в группе, получавшей метформин наблюдалась незначимая тенденция к снижению веса, а в группе ВЖД + NP-0006 – статистически значимое снижение на 14,2%. В 1-ый день введения исследуемых соединений средняя масса интактных животных составила $25,68 \pm 2,45$ г, а животных, получавших ВЖД – $31,15 \pm 4,90$ г. В конце курсового введения веществ средний вес животных по группам составил: интактные животные $29,83 \pm 1,37$ г; ВЖД – $33,75 \pm 3,97$ г; ВЖД+метформин – $32,43 \pm 3,21$ г; а ВЖД+NP-0006 – $28,96 \pm 1,91$ г.

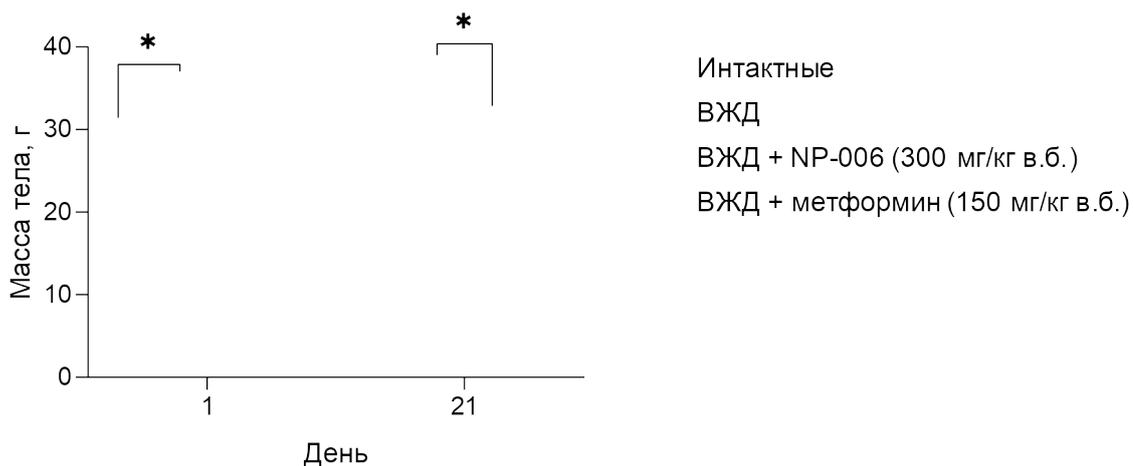


Рисунок 52 – Влияние соединения NP-0006 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на массу тела животных с СД2 во время курсового введения. Данные представлены как среднее \pm SD (n = 6). Статистическая значимость (2-сторонний ANOVA с пост-тестом Туки) к группе ВЖД.

Увеличение массы висцеральных отложений белой жировой ткани является характерным признаком ожирения, метаболического синдрома и СД2 [181; 326], связанного также с повышенным сердечно-сосудистым риском [333]. В группе ВЖД выявлено их значительное увеличение относительно интактных животных: мезентериальных в 2,7 раза, эпидидимальных на 35,4% и ретроперитонеальных в 2,2 раза в пересчете на массу тела животных. Препарат сравнения метформин не оказал влияния на удельную массу мезентериальных, эпидидимальных и ретроперитонеальных жировых. Соединение-лидер NP-0006 значимо снизило мезентериальные и ретроперитонеальные жировые отложения на 34,8% и 36,4% от группы ВЖД, соответственно.



Б

В

Г

Рисунок 53 – Влияние соединения NP-0006 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на массу мезентериальных (а), эпидидимальных (б) и ретроперитонеальных (в) жировых отложений у животных с СД2 после курсового введения. Данные представлены как среднее±SD (n = 6). Статистическая значимость (непарный t-тест): *p < 0,05, **p < 0,01 к группе ВЖД; #p < 0,05, ##p < 0,01 к интактной группе.

Высокожировая диета вела к закономерному нарушению липидного профиля периферической крови животных: повышению уровня триглицеридов на 46,4%, общего холестерина на 42,0% и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) на 37,6% по сравнению с

животными на нормальной диете. Эффект метформина и NP-0006 заключался в статистически не значимом снижении триглицеридов и холестерина крови, при этом тенденцию к снижению ЛПНП показало только NP-0006. Необходимо отметить, что соединение NP-0006 статистически незначимо повышало триглицериды печени на 63,7%, в то время как метформин способствовал их снижению.

А**Б****В****Г**

Рисунок 54 – Влияние соединения NP-0006 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на триглицериды печени у животных с СД2 после курсового введения. Данные представлены как среднее \pm SD (n = 6). Статистическая значимость (непарный t-тест): *p <0,05, **p <0,01 к группе ВЖД; #p <0,05, ##p <0,01 к интактной группе.

7.5.3. Иммуотропная активность

Для оценки влияния NP-0006 на иммунометаболические нарушения оценивались параметры, отражающие системное асептическое воспаление – субпопуляции лейкоцитов крови и циркулирующие иммунные комплексы.

Показано, что общее содержание лейкоцитов в крови было сопоставимым во всех экспериментальных группах с незначимой тенденцией к увеличению для животных, получавших исследуемые соединения. При этом наблюдались выраженные сдвиги в субпопуляциях лейкоцитов. Высокожировая диета вызывала значимое увеличение доли сегментоядерных нейтрофилов на 52,7% и снижение содержания лимфоцитов на 33,1% относительно группы интактных животных. Введение метформина оказывало нормализующее влияние, для нейтрофилов отмечено снижение доли на 49,1%, для лимфоцитов рост на 76% относительно группы ВЖД, соответственно. Соединение NP-0006 также достоверно корректировало влияние ВЖД на лейкоцитарную формулу, изменяя данные показатели на 43,3% и 60,6% относительно группы ВЖД, соответственно.

Аналогичная изменения наблюдались при оценке циркулирующих иммунных комплексов. ВЖД вела к росту данного показателя в 2,1 раза относительно интактной группы. Соединение NP-0006 и метформин понижали его до нормальных значений, на 57,5% и 53,4% относительно группы ВЖД, соответственно.

Таким образом, соединение NP-0006 достоверно корректировало маркеры метавоспаления, ассоциированные с высокожировой диетой, что является важным аспектом коррекции метаболических нарушений при СД2 [50; 99].

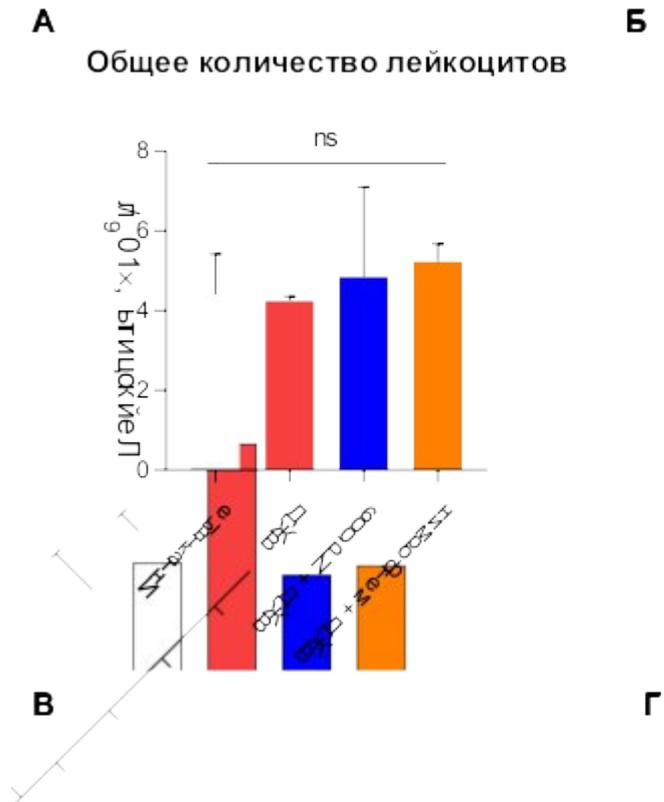


Рисунок 55 – Влияние соединения NP-0006 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на общее количество лейкоцитов (а), уровень сегментоядерных нейтрофилов (б) и лимфоцитов (в) у животных с СД2. Данные представлены как среднее±SD (n = 6). Статистическая значимость (непарный t-тест): *p <0,05, **p <0,01 к группе ВЖД; #p <0,05, ##p <0,01 к интактной группе.

7.6. Влияние на пролиферацию β-клеток поджелудочной железы

Как уже было указано в Главе 1, потеря функциональной массы β-клеток является ключевой причиной прогрессирования СД2, а значит стимуляция их регенерации может рассматриваться как одно из наиболее перспективных направлений для долгосрочной терапии заболевания. В настоящее время основным положительным регулятором базальной и

компенсаторной пролиферации β -клеток *in vivo* считается не гликемический контроль как таковой, а изменения метаболизма глюкозы в β -клетках. Эксперименты с нокаутными животными и фармакологическими средствами показали, что глюкоза индуцирует репликацию β -клеток посредством метаболизма GSK, катализирующей первую и скорость-лимитирующую стадию гликолиза, за которой следует закрытие каналов K_{ATP} и деполяризация мембраны [54].

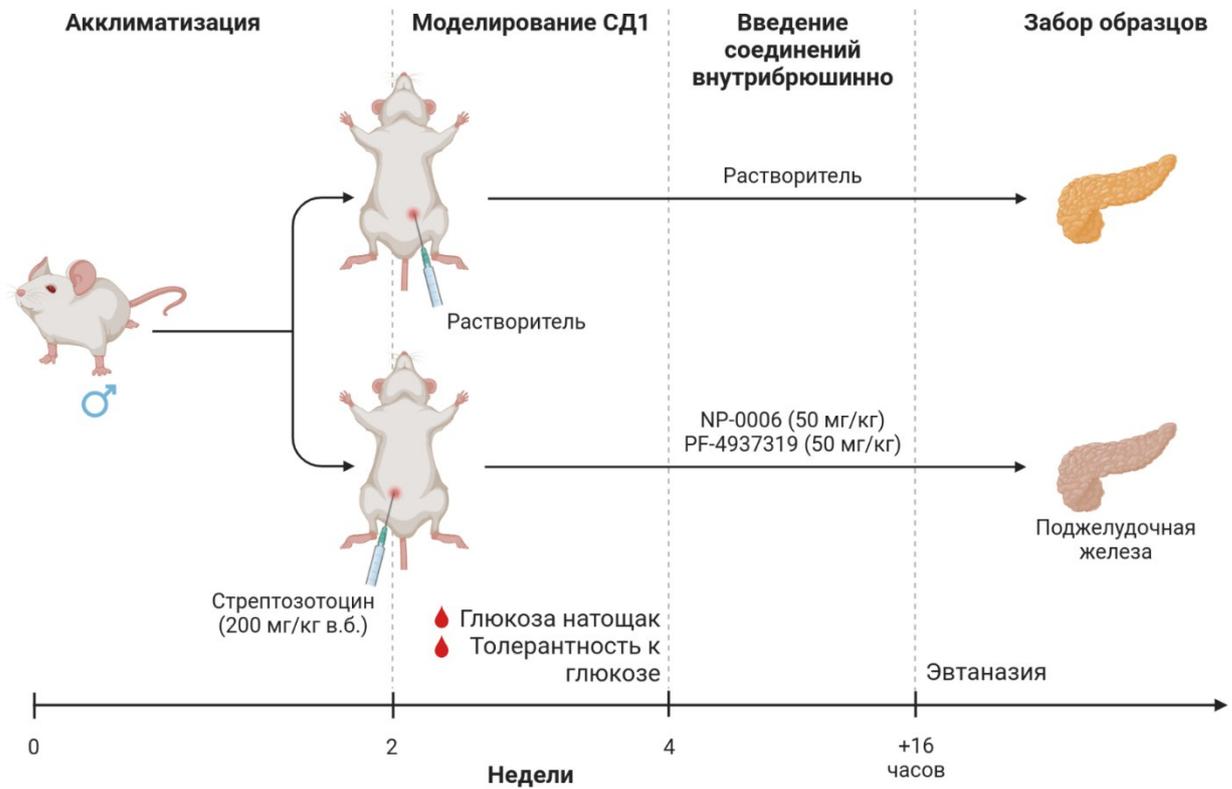


Рисунок 56 – Дизайн эксперимента по изучению влияния NP-0006 на пролиферацию β -клеток поджелудочной железы.

Для проверки влияния выявленного активатора GSK соединения NP-0006 на пролиферацию β -клеток поджелудочной железы у белых беспородных мышей был смоделирован сахарный диабет 1-ого типа. Разрушение β -клеток было индуцировано введением 200 мг/кг стрептозотоцина внутрибрюшинно [306]. Это соединение специфически цитотоксично для β -клеток поджелудочной железы, т.к. транспортируется глюкозным транспортером GLUT2. Токсический эффект связан с активацией индуцибельной NO-синтазы, генерацией активных форм кислорода, алкилированием и повреждением ДНК, активацией PARP, что в конечном итоге ведет к некрозу β -клеток островков Лангерганса [356]. Через 2 недели после введения стрептозотоцина животные с развившейся гипергликемией были рандомизированы в экспериментальные группы и получили 50 мг/кг соединения NP-0006, 50 мг/кг экспериментального активатора GSK PF-04937319 или растворитель в равном объеме внутрибрюшинно. Дизайн исследования был выбран на основе работ [83; 152] (Рисунок 56).

Иммуногистохимическое исследование срезов поджелудочной железы экспериментальных животных с использованием антител к инсулину, глюкагону и маркеру пролиферации Ki-67 показало характерную для СД1 картину. При введении стрептозотоцина обнаружено выраженное исчезновение инсулин-позитивных клеток островков Лангерганса при нормальной гистологической картине в группе интактного контроля – центральном скоплении β -клеток и α -клетками на периферии островка. Для группы СД1 характерно увеличение доли глюкагон-позитивных клеток, при этом пролиферативная активность клеток не отличалась от таковой для интактных животных. Введение активаторов глюкокиназы сопровождалось статистически достоверным увеличением удельного количества инсулоцитов и достоверным уменьшением α -клеток. Отмечалось увеличение индекса пролиферативной активности эндокриноцитов панкреатических островков.

После введения активатора GSK PF-04937319 наблюдалось увеличение удельного количества инсулоцитов и индекса пролиферативной активности в большей степени, чем при введении NP-0006. На фоне введения NP-0006 в поджелудочной железе визуализировались скопления единичных клеток или мелких групп (от 2 до 6 шт.) инсулин-позитивных клеток, общей площадью не более $285 \pm 15,5$ $\mu\text{м}^2$ в количестве $78 \pm 15,2$ шт. на микропрепарат. Единичные клетки располагались преимущественно в ацинарной ткани поджелудочной железы, скопления – рядом с панкреатическими протоками. В группе интактного контроля аналогичные по размерам скопления эндокриноцитов состояли из инсулин- и глюкагон-позитивных клеток в количестве $36 \pm 11,1$ шт на микропрепарат и располагались в непосредственной близости от протоков. В группе животных на фоне введения препарата сравнения PF-04937319 визуализировались мелкие скопления инсулин-позитивных клеток (иногда с единичными глюкагон-позитивными клетками) в количестве $25 \pm 12,7$ шт. на микропрепарат, которые располагались в ацинарной ткани рядом с протоками. При стрептозотоциновой интоксикации в микропрепаратах обнаруживались скопления, состоящие только из глюкагон-позитивных клеток (рис. 18 Б) в количестве $14 \pm 6,2$ шт на микропрепарат с преимущественным расположением рядом с протоками железы.



Рисунок 57 – Влияние соединения NP-006 и PF-04937319 на удельное количество инсулин-позитивных и глюкагон-позитивных клеток поджелудочной железы. Данные представлены как среднее \pm SD (n = 8). Статистическая значимость (непарный t-тест): * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

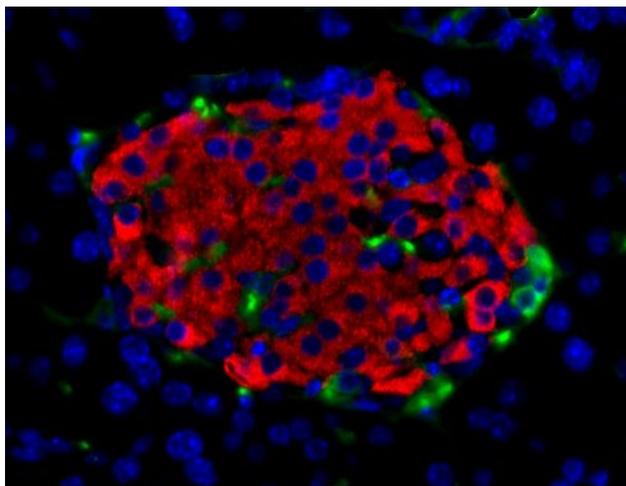
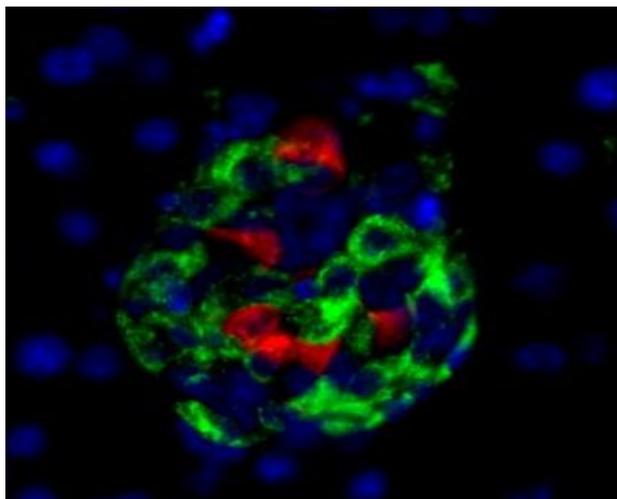
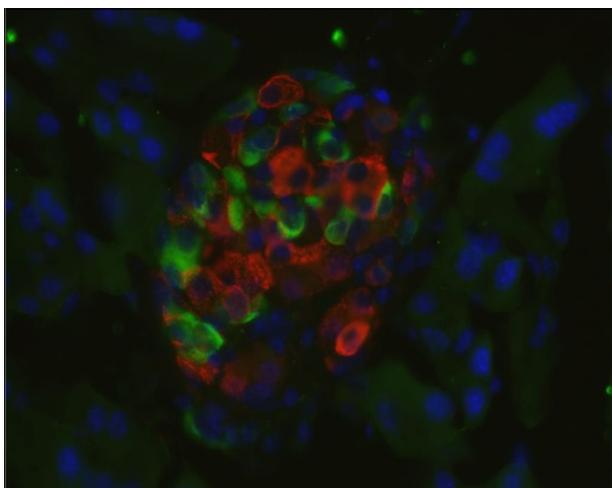
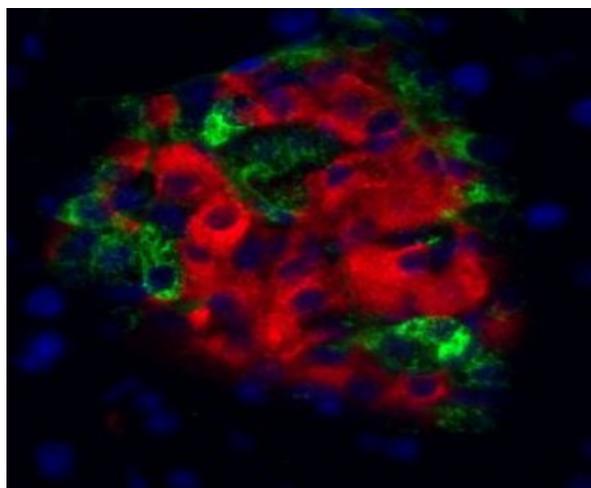
**А****Б****В****Г**

Рисунок 58 –Панкреатические островки, иммунное окрашивание первичными антителами к инсулину (красный) и глюкагону (зеленый), докраска ядер DAPI (синий). Окуляр $\times 10$, объектив $\times 20$. А). Интактный контроль. Патологические изменения не обнаружены. Б). STZ-индуцированный сахарный диабет. Единичные инсулоциты, преобладание α -клеток. В). STZ + PF-04937319. Г). STZ + NP-0006. Частичное восстановление количества инсулоцитов.

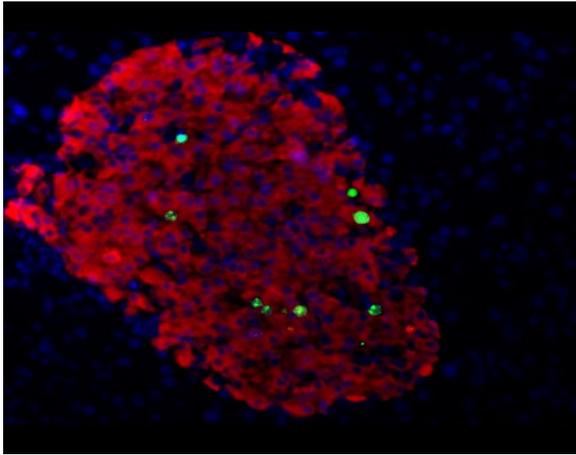
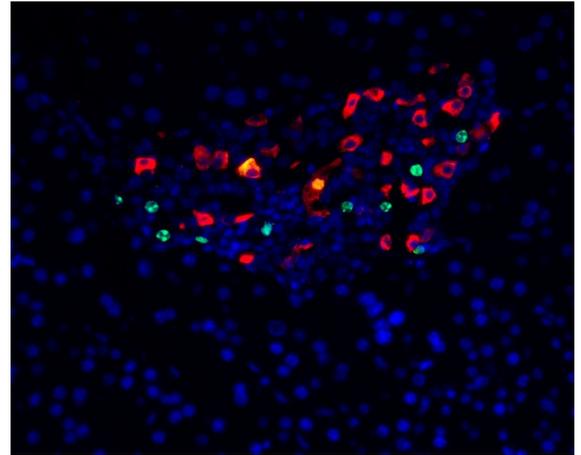
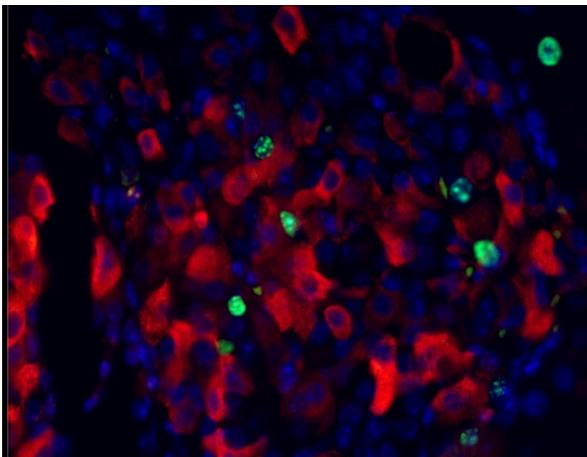
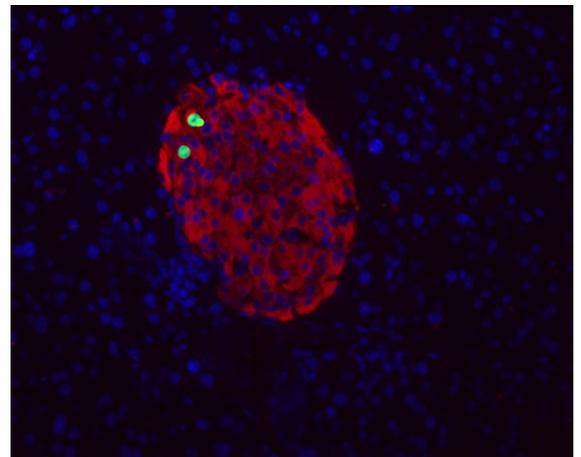
**А****Б****В****Г**

Рисунок 59 – Панкреатические островки, иммунное окрашивание первичными антителами к Ki-67 (зеленый), инсулину (красный), докраска ядер DAPI (синий). Окуляр $\times 10$, объектив $\times 20$. А). Интактный контроль. Выраженная экспрессия протеина Ki-67 в ядрах единичных инсулоцитов. Б). STZ-индуцированный сахарный диабет. Увеличение количества клеток с Ki-67-позитивными ядрами. Г). STZ + NP-0006. Единичные инсулоциты с выраженной экспрессией белка Ki-67.

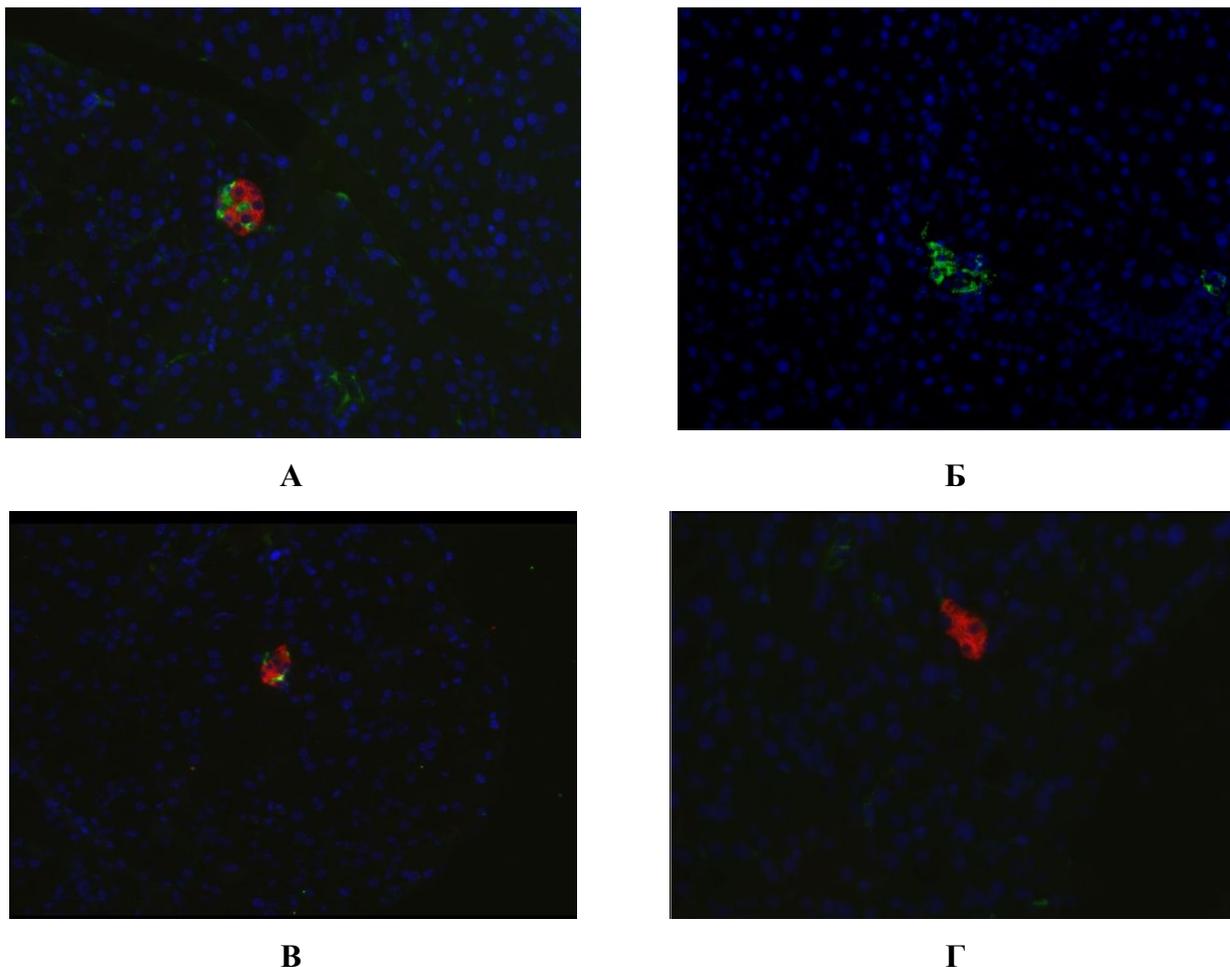


Рисунок 60 – Поджелудочная железа, иммунное окрашивание первичными антителами к глюкагону (зеленый), инсулину (красный), докраска ядер DAPI (синий). Окуляр $\times 10$, объектив $\times 20$. А). Интактный контроль. Мелкие скопления инсулоцитов с единичными глюкагон-позитивными клетками. Б). STZ-индуцированный сахарный диабет. Мелкие панкреатические островки, представленные глюкагон-позитивными клетками. В). STZ + PF-04937319. Внеостровковые скопления мелких групп инсулоцитов и глюкагон-позитивных клеток. Г). STZ + NP-0006. Внеостровковые скопления мелких групп инсулоцитов.

Таким образом, однократное введение соединения-лидера NP-0006 достоверно стимулировало пролиферацию и регенерацию β -клеток, способствуя восстановлению нормального соотношения инсулин- и глюкагон-продуцирующих клеток у мышей с тяжелой формой стрептозототин-индуцированного сахарного диабета.

7.7. Острая токсичность при пероральном введении

Острая токсичность соединения-лидера NP-0006, также, как и фармакологическая активность, была определена на двух видах грызунов – белых беспородных крысах и мышах обоего пола (Таблица 25). При пероральном введении крысам и мышам соединения NP-0006 в

максимальной рекомендованной дозе 2 г/кг [143] наблюдалось снижение двигательной активности животных в течение первых 24 часов. При ежедневном контроле в течение последующих 2 недель не наблюдалось гибели животных.

При однократном внутрибрюшинном введении NP-0006 в дозе 2 г/кг отмечено снижение двигательной активности животных. При ежедневном наблюдении в течение последующих 2 недель также подтверждена полная выживаемость животных. Таким образом, для соединения-лидера NP-0006 полуметальная доза LD₅₀ для мышей при обоих путях введения и для крыс при пероральном введении превышает 2000 мг/кг. Это позволяет отнести его к 4 классу малотоксичных соединений.

Таблица 25 – Острая токсичность соединения NP-006 при пероральном и внутрибрюшинном введении

Вид животных	Путь введения	LD ₅₀ , мг/кг
Крысы обоих полов (n = 12)	Пероральный	>2000
Мыши-самцы (n = 5)	Пероральный	>2000
Мыши-самцы (n = 5)	Внутрибрюшинный	>2000

7.8. Заключение

В результате скрининга фокусированной библиотеки соединений выявлено 27 соединений, валидированных как активаторы GSK. Таким образом, результативность скрининга составила 21,3%. Величины EC₅₀ выявленных соединений лежат в диапазоне 19 мкМ – 82 мМ, однако эффективность наиболее активных соединений (максимальная величина активации GSK) сопоставима с эффективностью соединения сравнения PF-04937319.

Выявлен новый класс активаторов GSK – биспиридоксиновые соединения, аналоги которых неизвестны из открытых источников. Представители ряда, соединения NP-0001, NP-0006, NP-0061, NP-0063, обладали наибольшей активностью среди всех выявленных соединений (EC₅₀ 18,56 – 47,71 мкМ).

Прогноз фармакокинетических и токсикологических характеристик наиболее активных соединений NP-0001 и NP-0006 показал высокую степень безопасности и благоприятные физико-химические свойства, включая высокую растворимость в воде. Оценка их влияния на жизнеспособность макрофагов мышей и фибробласты крыс показала отсутствие цитотоксичности вплоть до концентрации 250 мкМ, подтверждая перспективность оценки их фармакологической активности на животных. Согласно консенсусной компьютерной оценке,

слабыми сторонами соединений являются невысокая проницаемость клеточных мембран и пероральная биодоступность менее 20%.

Последующая оценка антигипергликемической активности соединений-лидеров на интактных крысах показала, что соединение NP-0001 не эффективно при введении перорально или внутрибрюшинно в дозе до 300 мг/кг. Соединение NP-0006 улучшало толерантность к глюкозе без развития гипергликемии в дозах 300 мг/кг и 500 мг/кг внутрибрюшинно. При этом при пероральном введении соединение теряло эффективность, что подтверждает справедливость прогнозных оценок ADMET.

Оценка антидиабетической активности соединения NP-0006 была выполнена при 21-дневном введении мышам с ожирением DIO-C57bl/6j в дозе 300 мг/кг внутрибрюшинно в сравнении с метформинем. При оценке влияния на углеводный обмен показано, что NP-0006 повышает активность GSK печени на 78,4% и нормализует содержание гликогена печени до уровня интактных животных, что подтверждает вовлечение GSK в реализацию его механизма действия. Отмечена нормализация гликемии натощак начиная с 7-ого дня введения без развития гипогликемии в течение всего эксперимента. На 21-ый день введения в экспериментальных группах, получавших NP-0006 или метформин восстанавливалась нормальная толерантность к глюкозе и индекс чувствительности к инсулину HOMA-IR. Как NP-0006, так и метформин корректировали гиперинсулинемию с равной эффективностью.

При оценке влияния на жировой обмен выявлено, что соединение NP-0006, но не метформин, статистически значимо снижало массу тела животных, находящихся на высокожировой диете. При анализе удельных масс печени и основных депо висцеральной жировой ткани выявлено, что снижение массы тела соединением NP-0006 в первую очередь связано с выраженным уменьшением мезентериальных и ретроперитонеальных жировых отложений (34,8% и 36,4% от группы контрольной группы, соответственно). При этом как метформин, так и NP-0006 нормализовали концентрацию триглицеридов в плазме крови, но только введение NP-0006 было ассоциировано с повышением содержания триглицеридов в печени. Ранее при исследовании биопсий человеческой печени выявлена ассоциация экспрессии глюкокиназы с повышением *de novo* липогенеза [95], также высказывались опасения о риске развития стеатоза печени при применении активаторов GSK [168]. С другой стороны, в работе Nakamura и соавт. [67] даже 20-недельное введение мышам активатора GSK не вело к негативным эффектам на липидный профиль крови и функции печени. Очевидно, что влияние NP-0006 на липиды печени требует особого внимания при дальнейшем изучении.

При оценке иммунного статуса животных показано, что NP-0006, как и метформин, корректировало маркеры хронического подострого воспаления, характерного для метаболического синдрома. Выявлено снижение доли сегментоядерных нейтрофилов и

восстановление нормального содержания лимфоцитов при падении уровня циркулирующих иммунных комплексов до нормальных значений.

Отдельно изучено влияние NP-0006 на процессы пролиферации β -клеток поджелудочной железы. При однократном введении мышам со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом в дозе 50 мг/кг внутривентриально NP-0006 достоверно увеличивало удельное количество β -клеток на 86,2% к контрольной группе и снижало удельное количество глюкагон-продуцирующих клеток на 43,8%. Интересно отметить, что введение NP-0006 вело к росту числа внеостровковых β -клеток в ацинарной ткани поджелудочной железы и рядом с панкреатическими протоками в 5,6 раза, тогда как для соединения сравнения PF-04937319 рост составлял 1,8 раза.

Таким образом, в результате направленного скрининга и валидации выявлен неизвестный ранее класс бис-пиридоксиновых активаторов GSK. Соединение-лидер NP-0006 не только снижает секреторную нагрузку на β -клетки, но и стимулирует их регенерацию, нормализуя периферическую чувствительность к инсулину, гликемию натощак и способствуя снижению висцеральных жировых отложений и массы тела у мышей с экспериментальным СД2. Низкая острая токсичность делает его перспективным кандидатом для дальнейшей оптимизации, которая должна быть направлена на достижение пероральной биодоступности и, возможно, ограничения влияния на липогенез в печени.

Глава 8. Обсуждение

Сахарный диабет 2-го типа – хроническое многофакторное метаболическое заболевание, которое является глобальной медико-социальной проблемой. Согласно данным ВОЗ, диабет и ассоциированные с ним заболевания являются девятой ведущей причиной смерти в мире, унося 1,5 миллиона жизней ежегодно. С 1980 по 2014 годы количество диагностированных случаев диабета возросло со 108 млн до 422 миллионов [104]. Диабет является одной из ведущих причин потери зрения, почечной недостаточности, ишемической болезни сердца, инсульта и ампутации нижних конечностей. В Российской Федерации зарегистрировано 4,9 миллиона пациентов с сахарным диабетом, ему присвоен статус социально-значимого заболевания [2].

Этиопатогенез СД2 включает генетические факторы, факторы образа жизни и факторы окружающей среды. Ведущие патофизиологические изменения характеризуются дисфункцией β -клеток, резистентностью к инсулину и хроническим воспалением, что постепенно затрудняет контроль уровня глюкозы в крови и приводит к развитию микро- и макрососудистых осложнений [154]. Выделяют, по крайней мере, восемь различных патофизиологических аномалий [273] способствующих нарушению гомеостаза глюкозы: недостаточная секреция инсулина, избыточная секреция глюкагона, дефицит инкретиннов, повышенный липолиз, повышенная реабсорбция глюкозы, недостаточный захват глюкозы периферическими тканями, избыточный глюконеогенез печени, дисбаланс нейротрансмиттеров в ЦНС.

Резистентность β -клеток к глюкагоноподобному пептиду 1 (GLP1) способствует прогрессирующему нарушению функции β -клеток, в то время как повышенные уровни глюкагона и повышенная чувствительность печени к глюкагону способствуют чрезмерной выработке глюкозы печенью [136]. Резистентность к инсулину в адипоцитах приводит к ускорению липолиза и повышению уровня свободных жирных кислот (FFA) в плазме, что усугубляет резистентность к инсулину в мышцах и печени и способствует отказу β -клеток [45]. Повышенная почечная реабсорбция глюкозы ко-транспортером натрия/глюкозы 2 (SGLT2) и повышенный порог утечки глюкозы с мочой способствуют поддержанию гипергликемии. Устойчивость к подавляющим аппетит эффектам инсулина, лептина, GLP1, амилина и пептида YY, а также низкий уровень дофамина в мозге и повышенный уровень серотонина в мозге способствуют увеличению веса, что усугубляет лежащую в основе резистентность [178]. К «зловещему октету» можно добавить две дополнительные патофизиологические аномалии: активацию воспалительных путей и нарушение опосредованной инсулином вазодилатации, что также способствует развитию резистентности мышечной ткани к инсулину [273].

Таким образом, СД2 характеризуется резистентностью тканей-мишеней к метаболическому действию инсулина и дисфункцией β -клеток поджелудочной железы.

Резистентность к инсулину тесно связана с висцеральным ожирением и возникающим в результате этого системным воспалением (метавоспалением) и эктопическим отложением жиров [99; 262]. Макрофаги М1-типа в жировой ткани секретируют провоспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α) и интерлейкин 6 (ИЛ-6), и способствуют хроническому воспалению и дисфункции адипоцитов, что приводит к увеличению высвобождения свободных жирных кислот и снижению выработки адипонектина [25]. В этой связи сериновые киназы, такие как с-JUN N-концевая киназа (JNK) и ядерный фактор NF- κ B активируются воспалительными стимулами и липидными метаболитами. В свою очередь, они индуцируют фосфорилирование рецептора инсулина и субстратов рецептора инсулина (IRS) по остаткам серина, тем самым предотвращая фосфорилирование тирозина и способствуя ингибированию передачи сигналов инсулина в тканях-мишенях [199].

β -Клетки поджелудочной железы компенсаторно резистентности к инсулину увеличивают его секрецию, но в условиях глюкозотоксичности, липотоксичности и оксидативного стресса это неизбежно приводит к истощению их функциональных возможностей, дисфункции и, в конечном итоге, постепенной потере функциональной массы β -клеток вследствие апоптоза [45]. Отказ β -клеток на фоне резистентности к инсулину, по-видимому, вызван сочетанием факторов, включая провоспалительные цитокины, свободные жирные кислоты и гипергликемию. Окислительный стресс и стресс эндоплазматического ретикулума, а также активация провоспалительных путей способствуют прогрессирующей потере функции и массы β -клеток, что в конечном итоге приводит к абсолютной недостаточности инсулина.

Было показано, что глюколипотоксичность, связанная с диабетом, вызывает воспалительную реакцию в островках, в частности, путем индуцирования хронической продукции островками высоких уровней ИЛ-1 β и других провоспалительных медиаторов [338]. Это состояние хронического воспаления ухудшает функцию и выживаемость β -клеток, еще больше ухудшая гомеостаз глюкозы.

В этой связи важно отметить, что СД2 сейчас рассматривается как состояние хронического воспаления, сочетанного с системным воспалением и воспалением жировой ткани. Макрофаги являются ключевыми участниками иммунного ответа. Метаболические изменения в активированных свободными жирными кислотами макрофагах приводят к продукции провоспалительных цитокинов, индуцируя инсулинорезистентность жировой ткани, печени и мышц, в результате нарушая системный метаболизм глюкозы [127; 338]. Установлено, что местное воспаление в эндокринной части поджелудочной железы способствует дисфункции островков при СД2 [296]. Исследования на различных животных моделях СД2, мышах, получавших диету с высоким содержанием жиров [336], показали повышенное количество тканевых макрофагов в островках Лангерганса. Аналогичные данные получены при

иммуногистохимическом анализе посмертных образцов тканей поджелудочной железы пациентов с СД2 [415].

С момента открытия инсулина в 1921 г. в лечении сахарного диабета был достигнут устойчивый прогресс. В настоящее время для клинического применения одобрены 11 классов антидиабетических лекарственных средств, и многие другие находятся в разработке, однако ни один из используемых препаратов не способен последовательно остановить, обратить, или излечить СД2. Кроме того, современные и находящиеся на поздних стадиях разработки методы лечения все еще имеют существенные недостатки, такие как ограниченная эффективность, нежелательные побочные эффекты и субоптимальные фармакокинетические параметры [194].

Пероральные антидиабетические средства могут быть классифицированы, исходя из механизма действия. Применяемые в настоящее время препараты могут быть разделены на пять групп: (1) замедляющие абсорбцию моносахаридов в кишечнике – ингибиторы α -глюкозидазы, такие как акарбоза; (2) стимулирующие секрецию (экзоцитоз) инсулина – производные сульфонилмочевины и другие стимуляторы АТФ-зависимого калиевого канала, такие как репаглинид, натеглинид и др.; (3) средства, сенсibiliзирующие периферические ткани к инсулину и обладающие плейотропным действием на метаболизм углеводов и липидов – бигуаниды, такие как метформин, и активаторы гамма-рецептора, активируемого пролифератами пероксисом, такие как росиглитазон и пиоглитазон; (4) потенцирующие действие инкретинов – эксенатид, аналог глюкагоноподобного пептида-1 продолжительного действия, и глиптины, ингибиторы дипептидилпептидазы типа 4, отвечающей за деградацию инкретинов; (5) аналоги амилина – прамлинтид [187].

Лечение СД2 осложняется множественными патофизиологическими нарушениями [274; 452] и, согласно "ABCDE"-принципу, должно учитывать такие персонализированные факторы, как возраст, массу тела, сопутствующие осложнения, продолжительность заболевания, стоимость, а также этиологию [445]. Профилактика микрососудистых осложнений фокусируется на контроле гликемии [39; 180], тогда как профилактика макрососудистых осложнений требует коррекции классических сердечно-сосудистых факторов риска, которые включают синдром резистентности к инсулину (в более широкой трактовке – метаболический синдром).

Достижение длительного контроля гликемии требует применения противодиабетических препаратов, которые устраняют патофизиологические дефекты, присутствующие при СД2 [273; 341]. Поскольку ни одно лекарство не устраняет множественные отклонения, комбинированная терапия получила широкое признание и включена в большинство национальных рекомендаций. При преддиабете фармакологическая терапия тиазолидиндионами [157], агонистами рецепторов GLP1 [428], метформином [278] и ингибиторами альфа-глюкозидазы [233] эффективно предотвращает или задерживает прогрессирование нарушенной толерантности к глюкозе до

диабета. В любом случае, главным маркером эффективности антидиабетической терапии долгое время считался гликемический контроль – глюкоза крови натощак, гликированный гемоглобин или фруктозамин плазмы крови.

Некоторые рекомендации по диабету устанавливают цели контроля низкого уровня гликемии для пациентов с СД2 (например, уровень гликированного гемоглобина от 6,5% до 7,0%), чтобы избежать или отсрочить развитие осложнений. Однако недавние крупные рандомизированные исследования показывают, что жесткий гликемический контроль обременяет пациентов сложными программами лечения, гипогликемией, увеличением веса и затратами, а взамен дает неопределенные преимущества [249; 386].

Прогрессирование от измененного метаболизма глюкозы к явному диабету, а затем и к абсолютному дефициту инсулина происходит по мере дальнейшего ухудшения функции и снижения массы β -клеток. Таким образом, привлекательным фармакологическим вмешательством сейчас считается то, которое способно остановить прогрессирующее снижение массы и функции β -клеток и предотвратить необходимость подключения экзогенного инсулина. Агенты, подавляющие воспаление, включая блокаторы $IL-1\beta$ и сальсалат (мощный ингибитор $NF-\kappa B$), показали некоторую перспективность в улучшении контроля гликемии и функции β -клеток [236]. В разработке находится множество новых средств, но наибольшая потребность наблюдается в средствах, повышающих чувствительность к инсулину, останавливающих прогрессирующую недостаточность β -клеток поджелудочной железы, снижающих избыточную массу тела и сердечно-сосудистый риск через подавление системного метавоспаления.

Таким образом, очевидна необходимость комплексной фармакологической коррекции различных звеньев патогенеза СД2, начиная от восстановления активности сигнального каскада рецептора инсулина и метаболизма глюкозы в печени, защиты и восстановления массы β -клеток до регуляции секреторной активности адипоцитов и тканевых макрофагов. В этой связи особый интерес в качестве терапевтических мишеней привлекают протеинкиназы. Они играют ключевую роль в регуляции клеточных процессов, а их дисрегуляция ассоциирована с разнообразными патологическими нарушениями метаболизма, роста и развития клеток, что характерно для сахарного диабета [134]. В частности, нерцепторные тирозинкиназы составляют внутриклеточные сигнальные каскады, регулируя метаболическую активность клетки, включая захват и утилизацию глюкозы, синтез и расщепление липидов, а также, опосредованно через факторы транскрипции, экспрессию соответствующих генов. Хорошо описано участие киназ и фосфатаз в сигнальном пути рецептора инсулина и реализации его эффектов [91]. Аналогично, киназы регулируют метаболизм и активацию иммунных клеток, таких как тканевые макрофаги. Возможность защиты β -клеток от апоптоза и стимуляции их пролиферации ингибиторами киназ также активно изучается [305]. Таким образом, фармакологическое воздействие на киназные

каскады создает широкие возможности для коррекции метаболических нарушений, связанных с инсулинорезистентностью, и противодействия системному воспалению и метавоспалению, а также поддержанию или восстановлению функциональной массы β -клеток, т.е. плеiotропному воздействию на ключевые факторы и звенья патогенеза СД2.

Первый этап исследования, доэкспериментальный, заключался в выборе мишеней фармакологического воздействия и отборе соединений для экспериментального скрининга. Очевидно, что ошибка, допущенная на этой стадии, является одним из наиболее существенных факторов риска, как в индустриальных проектах разработки ЛС, так и в академических исследованиях [55]. В силу обозначенных выше факторов особое внимание в работе было уделено целеполаганию, т.е. рациональному выбору мишеней разработки потенциальных противодиабетических средств. Использован комплексный подход к валидации инновационных мишеней, т.е. мишеней, для которых пока не существует одобренных ЛС, включающий оценку доказанности участия мишени в развитии СД2, сведений о безопасности воздействия на мишень, конкурентных преимуществ мишени, ее технической пригодности для разработки лекарственного средства (Таблица 26).

Для ответа на поставленные вопросы привлекались общедоступные источники и специализированные базы данных. Так, причинно-следственные связи изменения активности мишени с патогенезом СД2 оценивались с использованием генетических и молекулярных данных (исследования полногеномной ассоциации, фенотипы нокаутных по гену мишени животных, эффективность известных модуляторов мишени в животных моделях СД2 и в клинике, при наличии таких данных. Сведения, связанные с безопасностью воздействия на мишень и потенциальными on-target побочными эффектами также оценивались на основе имеющихся доклинических и клинических исследований. Стратегические вопросы потенциального преимущества мишени перед уже используемыми подходами рассматривались с учетом современных взглядов на патогенез и терапию СД2, в частности, учитывалось влияние мишеней на сохранение функциональной массы β -клеток или стимулирование их пролиферации, наличие противовоспалительной активности и способности корректировать иммунометаболические нарушения. Критерий технической пригодности мишени для разработки лекарственного средства подразумевал известность трехмерной структуры мишени, специфических методов определения ее активности, пригодных для микропланшетного скрининга, наличие известных соединений сравнения, наличие специфических маркеров, подтверждающих модуляцию мишени при исследованиях на модельных животных.

В результате по совокупности показателей в качестве перспективных и приоритетных были выбраны четыре мишени (AMPK, GSK, GSK3B, PTP1B), отличающиеся наиболее широким влиянием на иммунометаболические нарушения при СД2, их краткая характеристика дана ниже.

Таблица 26 – Используемые критерии оценки и валидации биологических мишеней

Критерии оценки	Оцениваемые факторы	Источники информации
Связь с заболеванием	Казуальность мишени в патогенезе, терапевтическая ценность	Данные GWAS, фенотипы нокаутных и мутантных по гену животных, экспериментальная эффективность на животных моделях заболевания
Безопасность	Возможные побочные эффекты модуляции мишени	Тканевая экспрессия мишени, фенотипы нокаутных и мутантных по гену животных, экспериментальные и клинические данные
Техническая доступность	Пригодность мишени для скрининга и разработки ЛС	Трехмерная структура мишени, наличие центров связывания малых молекул, наличие известных модуляторов и соединений-сравнения, наличие производительных методов оценки активности мишени <i>in vitro</i> и специфических биомаркеров <i>in vivo</i>
Стратегические вопросы	Перспективность терапевтического подхода	Наличие неудовлетворенной медицинской потребности, преимущества перед существующими подходами лечения согласно клиническим данным и мета-анализам, конкурентный и патентный ландшафт

GSK3B участвует в сигнальных каскадах АКТ, катенина и Wnt. Гиперактивация GSK3B опосредует инсулинорезистентность и системное воспаление при сахарном диабете 2-ого типа и метаболическом синдроме [339]. Ингибирование GSK3B нормализует углеводный и липидный обмен, стимулирует пролиферацию β -клеток поджелудочной железы через активацию катенина, подавляет провоспалительный эффект Nf- κ B, нормализует процессы агрегации и коагуляции крови. Убедительно показано, что низкомолекулярные ингибиторы фермента предотвращают апоптоз β -клеток в условиях глюко- и липотоксичности и сохраняют их функциональную массу, что крайне ценно для долговременной терапии СД2. Системный противовоспалительный эффект и подавление повышенной при СД2 агрегации тромбоцитов являются дополнительными преимуществами данного класса. Ингибиторы GSK3B проходят клинические испытания для терапии болезни Альцгеймера и комбинированной терапии резистентных форм онкологических заболеваний.

Ингибиторы GSK3B не только нормализуют периферическую инсулинорезистентность, но и защищают от потери функциональной массы β -клеток [132]. При этом наличие противовоспалительной, антиагрегантной, антитромботической, антиоксидантной активностей позволяет использовать их для профилактики отдаленных последствий сахарного диабета. Соединение препятствует развитию ожирения (снижает массу всех типов висцеральных жировых

отложений). В настоящее время отсутствуют препараты, обладающие данным механизмом действия. При этом клинические испытания ингибиторов GSK3 β против опухолевых заболеваний и болезни Альцгеймера показали их хорошую переносимость и безопасность для пациентов. Таким образом, поиск и исследование антидиабетической активности ингибиторов GSK3 β является актуальной и перспективной задачей.

АМФ-активируемая протеинкиназа (АМРК) известна как высококонсервативный и повсеместно экспрессируемый белок, являющийся датчиком энергетического статуса клетки [96; 359]. Фармакологическая активация АМРК увеличивает захват глюкозы и окисление жирных кислот, ограничивает накопление липидов и глюконеогенез печени [144]. Эффекты активации АМРК плеiotропны и направлены на коррекцию всех основных метаболических нарушений, характерных для СД2. Кроме того, иммунометаболические механизмы позволяют использовать активацию фермента для регуляции поляризации иммунных клеток, в частности, подавлять воспалительную активацию тканевых макрофагов свободными жирными кислотами, препятствуя развитию инсулинорезистентности. Действие антидиабетического препарата первой линии метформина опосредовано, по крайней мере частично, активацией АМРК. Таким образом, данная киназа является крайне привлекательной и перспективной мишенью для разработки новых ЛС. АМРК является гетеротримером, и экспрессия конкретных изоформ тканеспецифична. Было обнаружено, что активация β_2 -содержащих изоформ ведет к развитию кардиомиопатии, являясь серьезным препятствием для внедрения активаторов АМРК в клиническую практику. Однако, разработка β_1 -селективных соединений компаниями Betagenon и Roxel SA позволила получить безопасные и эффективные АМРК-активаторы, которые в настоящее время успешно проходят клинические испытания [151].

Протеинтирозинфосфатаза типа 1В (РТР1В) негативно регулирует сигнальные пути инсулина и лептина. Экспрессия РТР1В повышена в мышечной и жировой ткани при инсулинорезистентных состояниях у людей, и грызунов, что определяет ее роль в развитии сахарного диабета и ожирения [49]. На нокаутных животных и моделях СД2 убедительно доказана как роль фермента в патогенезе СД2, так и фармакологический потенциал ингибиторов РТР1В [112; 121]. Внедрение ингибиторов РТР1В в клинику долгое время ограничивалось неудовлетворительными фармакокинетическими свойствами конкурентных ингибиторов фермента - будучи миметиками тирозинфосфата, они отличаются высокой полярностью и сильным отрицательным зарядом. Большие надежды возлагались на аллостерический ингибитор фермента тродусквемин, лишенный этих недостатков. Препарат показал хорошую переносимость и безопасность в клинических исследованиях 1-ой и 2-ой фазы по показаниям сахарный диабет 2-ого типа и немелкоклеточный рак легкого (РТР1В также является противоопухолевой мишенью) [41; 79–81].

Глюкокиназа (GCK) является ключевой терапевтической мишенью и служит «датчиком глюкозы» и активатором гликолиза в β -клетках. GCK катализирует скорость-лимитирующую стадию гликолиза, фосфорилируя глюкозу до глюкозо-6-фосфата. Активация GCK нормализует метаболизм глюкозы в печени и секрецию инсулина островками поджелудочной железы. Кроме того, через регуляцию фактора транскрипции PDX, активаторы GCK стимулируют деление β -клеток [230]. Антидиабетический эффект активаторов GCK подтвержден на изолированных человеческих β -клетках и в нескольких клинических испытаниях. Однако многочисленные активаторы глюкокиназы потерпели неудачу из-за недостаточной эффективности или побочных эффектов [317].

Второй этап предложенного подхода была посвящен экспериментальному поиску модуляторов валидированных мишеней, перспективных для разработки инновационных ЛС (Рисунок 61). Традиционно, ранние этапы разработки лекарственных средств включают выявление активных соединений, за которым следует процесс их валидации на различных моделях для выявления и оптимизации соединений-лидеров. Это долгий и ресурсоемкий процесс, который обычно занимает несколько лет. Внедрение высокопроизводительного скрининга и фрагмент-ориентированных подходов позволило существенно повысить производительность и эффективность. Однако, даже их использование на библиотеках структурно-разнородных соединений нельзя считать удовлетворительным по отношению затраченных ресурсов к полученным результатам. По некоторым оценкам, только 50-84% проектов высокопроизводительного скрининга позволяют выявить пригодные для оптимизации соединения [286]. Стоимость ранних этапов разработки и ассоциированные с ними риски можно существенно уменьшить, привлекая вычислительные методы. Внедрение подходов хемоинформатики и раннего ADMET-профилирования для приоритизации соединений не только может ускорить реализацию проекта, но и увеличить шансы выявления пригодных для дальнейшей оптимизации и разработки активных соединений.

В настоящей работе использовался принцип лиганд-ориентированной разработки ЛС, подразумевающий опору на структуры известных модуляторов мишени. Такие ранее опубликованные в мировой научной литературе структуры были получены из базы данных биологически активных соединений ChEMBL и проанализированы для выявления скаффолдов наиболее активных соединений. Поиск структурных аналогов этих скаффолдов в библиотеке доступных для исследования соединений осуществлялся по фармакофорному описанию молекул исходя из предположения, что соединения со схожим набором и расположением молекулярных фрагментов, ответственных за формирование межмолекулярных взаимодействий с белком, будут обладать схожей фармакологической активностью.

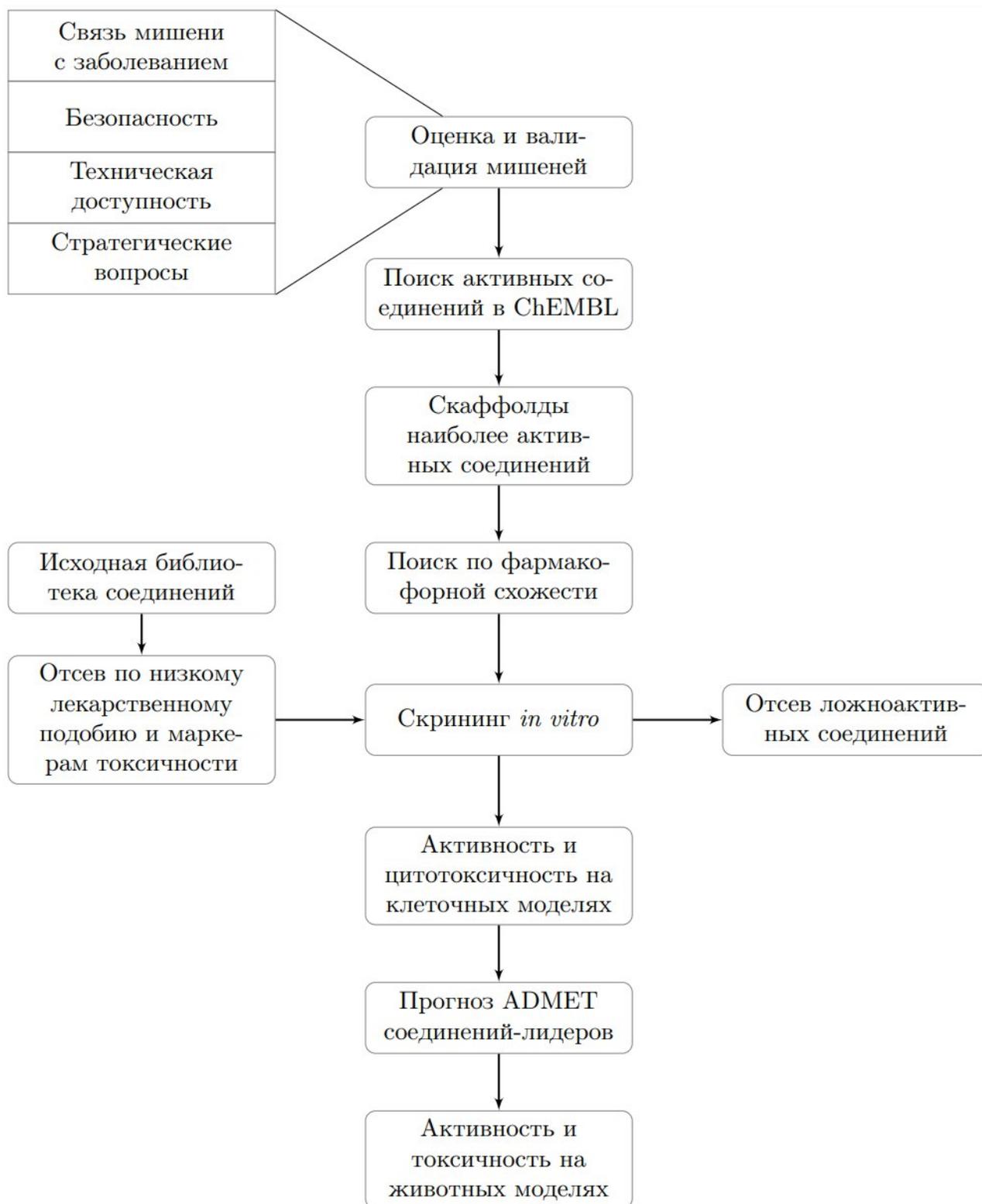


Рисунок 61 – Принципиальная схема предложенной системы мишень-ориентированного поиска.

Предварительно из общей библиотеки соединений были исключены соединения с низкими расчетными характеристиками лекарственного подобия согласно правилам GSK и Ro4, а также содержащие подструктурные маркеры основных видов специфической токсичности (канцерогенности, мутагенности, репродуктивной токсичности, местно-раздражающие). В

результате были получены четыре мишень-фокусированные библиотеки соединений, содержащие наиболее перспективные для изучения молекулы. Отбор соединений как по фармакофорной схожести с референсными соединениями, так и по расчетным характеристикам лекарственного подобия позволил сократить объем необходимых биологических исследований и исключить из рассмотрения соединения, которые с высокой вероятностью не могут стать основой создания новых ЛС, таким образом, сократив необходимые для реализации проекта время и ресурсы. Следующий, экспериментальный этап заключался в микропланшетном скрининге и определении полуэффективных концентраций для активных соединений.

Важной частью системы являлся отсев ложноактивных соединений, известных как PAINS (от англ. "Pan-Assay INterfering compoundS"). Для этого были использованы рекомендуемые сейчас методические подходы: определение величин IC_{50} или EC_{50} в присутствии и отсутствии детергентов, скрининг на структурно несвязанных мишенях, определение тиольной реактивности для соединений с сильными электрофильными центрами. После получения первичных данных скрининга проверялись также аналоги активных соединений в синтетических рядах при наличии таковых. В результате формулировались окончательные взаимосвязи структура-активность и выявлялись соединения-лидеры для дальнейшего изучения.

Третий этап исследования посвящен валидации выявленных соединений-лидеров путем поэтапной оценки их антидиабетической активности. Вначале проводилось определение их эффективности на клеточных моделях с параллельной оценкой цитотоксичности, оценке расчетных фармакокинетических характеристик и токсичности с использованием консенсуса прогнозных оценок для обоснования перспективности исследований на животных. Первичная оценка антигипергликемической активности осуществлялась при однократном введении животным с экспериментальным сахарным диабетом (или интактным животным, если фармакологическая модуляция мишени эффективна в нормальных физиологических условиях) в сравнении с известным препаратом, обладающим возможно более близким действием на патогенетические дефекты СД2. В случае положительного результата для соединений-лидеров изучалась антидиабетическая активность при длительном введении животным с экспериментальным СД2 с оценкой комплекса параметров углеводного и жирового обмена, а также системного воспаления и других аспектов, если это было обосновано механизмом действия соединения. Конкретная экспериментальная модель СД2 также выбиралась исходя из механизма действия конкретного соединения с опорой на литературные данные. Наконец, определялась острая токсичность соединений, проявивших высокую антидиабетическую активность, при аналогичном пути введения. Таким образом, в работе была использована мишень-ориентированная система поиска соединений путем поэтапной оценкой перспективности и эффективности с последовательным привлечением вычислительных, биохимических и

клеточных подходов. Только прошедшие все уровни оценки соединения испытывались на экспериментальных животных.

В настоящей работе в отношении GSK3B исследовано 42 выбранных в результате виртуального скрининга соединений, среди которых можно выделить 5 скаффолдов, отличающихся природой центрального гетероцикла. Наибольшей активностью обладают 3-замещенные 2-оксиндолы, меньшей – бензимидазолы, конденсированные с [1,2,4]триазин-4-оном (Рисунок 62). В обоих случаях можно выделить подструктуру, включающую конденсированные ароматические 6-членный и 5-членный циклы, содержащий донор и акцептор водородных связей. Такое строение типично для АТФ-конкурентных ингибиторов киназ (АТФ-миметиков). Всего выявлено 16 ингибиторов GSK3B, их валидация проведена в экспериментах по изучению концентрационной зависимости ингибирования и способности связывать восстановленный глутатион для отсева неспецифически модифицирующих белок электрофилов. Выявлен новый класс ингибиторов GSK3B – 3-арилиден-2-оксиндолы, для которого описаны взаимосвязи структура-активность.

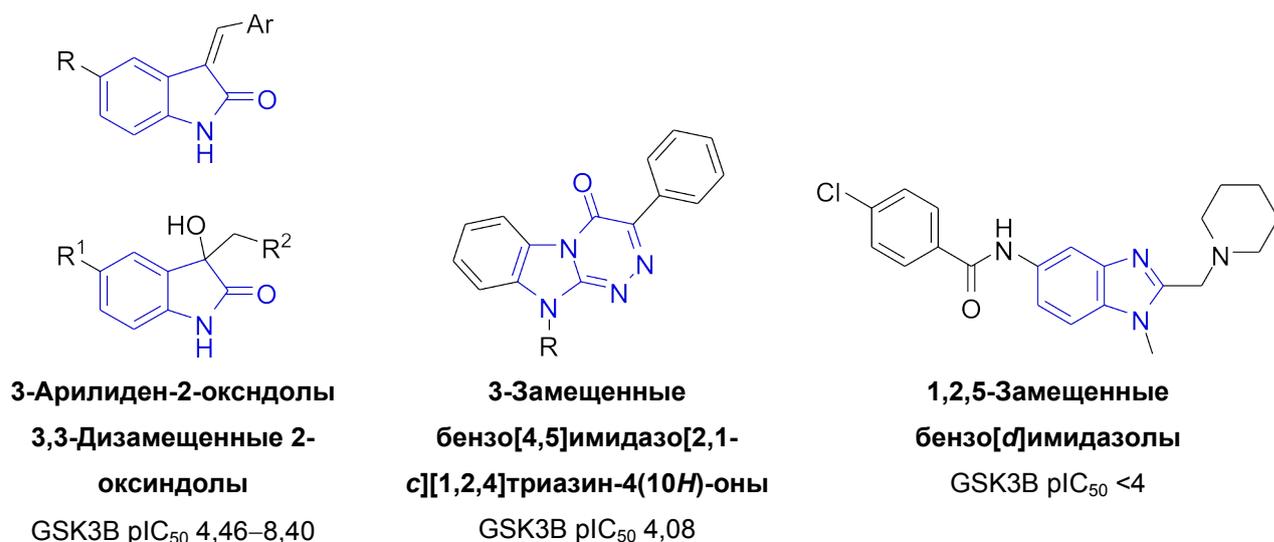


Рисунок 62 – Классы наиболее активных найденных ингибиторов GSK3B.

Оценка наиболее активных соединений на клеточных моделях показала низкую цитотоксичность по отношению к моноцитам периферической крови человека, нормальным клеткам почек человека линии HEK293, фибробластам крыс и перитонеальным макрофагам мышей, что говорит о целесообразности дальнейшего изучения этих соединений.

Исследования на клеточной модели ЛПС-индуцированного воспалительного ответа макрофагов, имитирующей активацию тканевых макрофагов при развитии алиментарного ожирения и инсулинорезистентности, подтвердили способность подавлять продукцию оксида азота макрофагами, наиболее выраженную для соединения К-167 и К-248 (IC₅₀ 13,9 и 8,8 мкМ, соответственно, Рисунок 63), также они ингибировали секрецию провоспалительного ИЛ-6 с

IC_{50} 22,4 и 21,5 мкМ. Способность ингибиторов GSK3B подавлять образование ИЛ-6 макрофагами показана на примере соединения COB-187 [133]. Антидиабетический потенциал соединений K-167 и K-248 дополнительно подтвержден способностью стимулировать захват глюкозы фибробластами крыс, культивируемыми в среде с концентрацией глюкозы 25 мМ. Таким образом, соединения-лидеры были охарактеризованы как ингибиторы GSK3B *in vitro*, а также показали ожидаемую для этого класса соединений способность проявлять противовоспалительный эффект и стимулировать утилизацию глюкозы на клеточных моделях.

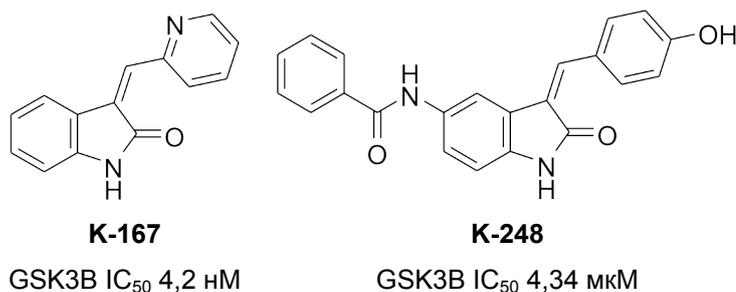


Рисунок 63 – Наиболее активные найденные ингибиторы GSK3B.

Для оценки антидиабетической активности соединений-лидеров была выбрана модель СД2, вызванная алиментарным ожирением [33]. Она не только близко воспроизводит естественный патогенез заболевания у людей, что повышает транслируемость полученных на животных данных, но и тесно связана с его иммунометаболическим компонентом – гипертрофией адипоцитов, активацией резидентных тканевых макрофагов и периферической инсулинорезистентностью. Вклад повышенной активности GSK3B в эти процессы известен из литературных и геномных данных, что делает данную модель адекватной для изучения ингибиторов фермента.

При однократном введении мышам с экспериментальным СД2 DIO-C57BL/6J в дозе 30 мг/кг внутрибрюшинно соединение K-248 не показало значимого эффекта в тесте толерантности к глюкозе и было исключено из дальнейшего исследования. Соединение K-167 в той же дозе и пути введения проявило существенную антигипергликемическую активность как у диабетических мышей с алиментарным ожирением DIO-C57BL/6J, так и у диабетических инсулинорезистентных крыс HFD+STZ. Эффект соединения K-167 был сопоставим с эффектом вилдаглиптина в дозе 10 мг/кг. Это позволило номинировать K-167 как соединение-лидер для дальнейшего изучения при длительном введении мышам с экспериментальным СД2. В качестве препарата сравнения был выбран метформин как средство, улучшающее периферическую чувствительность к инсулину подобно ингибиторам GSK3B.

Соединение K-167 при 3-месячном пероральном терапевтическом введении в дозе 30 мг/кг показало выраженную плеiotропную антидиабетическую активность, сопоставимую или превосходящую эффект метформина в дозе 150 мг/кг. Показано значительное снижение

уровня инсулина плазмы крови ($770,6 \pm 106$ пкг/мл против $3553 \pm 324,1$ пкг/мл в группе контроля), а также снижение инсулинорезистентности по показателю НОМА-IR ($5,29 \pm 0,67$ усл. ед против $7,47 \pm 0,41$ усл. ед в группе контроля). К-167 выражено улучшало толерантность к глюкозе, делая ее сопоставимой с таковой у препарата сравнения метформина в дозе 150 мг/кг перорально (площадь под кривой глюкоза время $-15,0\%$ против $-12,9\%$) на 3-ий месяц введения. Показано снижение массы висцеральных жировых отложений: ретроперитонеальных на 34,9%, мезентериальных на 33,5% и эпидидимальных на 36,9% по сравнению с контрольной группой СД2. Выявлено значимое снижение содержания триглицеридов печени на 24,3%. Отмечалось снижение признаков системного воспалительного процесса. Было показано достоверное восстановление количества сегментоядерных нейтрофилов ($18,6 \pm 3\%$ против $30,0 \pm 1,6\%$) и лимфоцитов ($76,6 \pm 3,1\%$ против $63,0 \pm 2,0\%$) по отношению к группе контроля. Соединение К-167 привело к достоверному снижению уровня ФНО- α (39,4%) и оксида азота (59,3%).

На интактных крысах К-167 в дозе 30 мг/кг оказало более выраженное антитромботическое действие, чем препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в дозе 150 мг/кг (продолгование времени окклюзии сонной артерии, индуцированной аппликацией 50% раствора FeCl_3 $78,51 \pm 19,48\%$ и $68,4 \pm 16,4\%$, соответственно). Изучение острой 2-недельной токсичности показало, что К-167 относится к 5 классу токсичности (нетоксичные соединения), $\text{LD}_{50} > 5000$ мг/кг при пероральном введении белым беспородным мышам.

Аналогичные данные были получены Min и соавт. [24] при изучении ингибитора GSK3B KICG138 (IC_{50} 8 нМ) в дозе 30 мг/кг в сравнении с метформином в дозе 250 мг/кг. Показана нормализация гликемии натощак, улучшение толерантности к глюкозе, гиперинсулинемии, снижение жировой инфильтрации печени. Антиагрегантный и антитромботический эффект ингибирования GSK3B показан ранее на примере салидрозида [172] и Ref-1 [416] на модели FeCl_3 -индуцированного тромбоза.

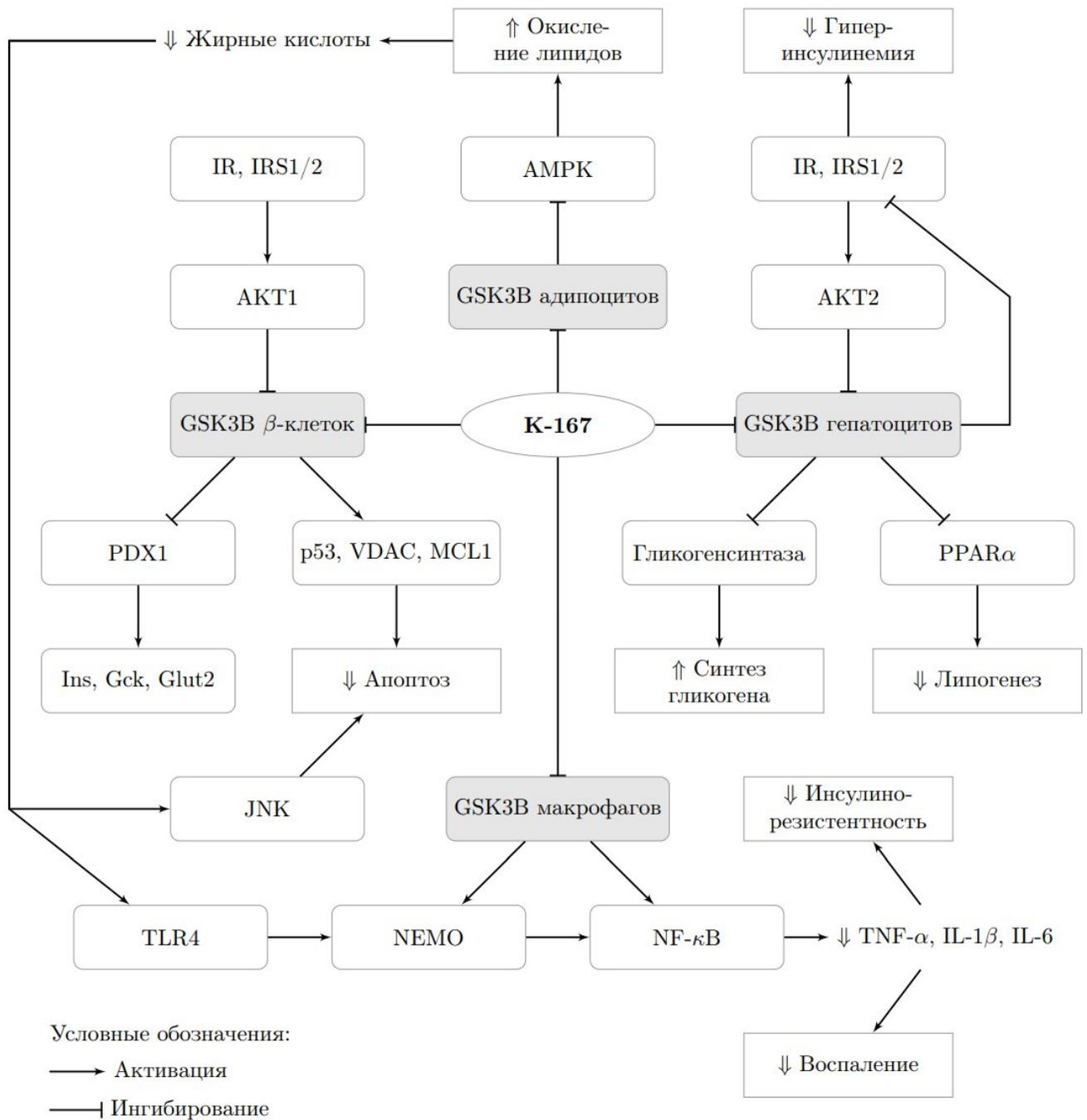


Рисунок 64 – Схема плеiotропной антидиабетической активности ингибитора GSK3B соединения К-167.

Таким образом, соединение К-167 подтвердило существенную антидиабетическую активность как при однократном, так и при длительном введении грызунам с экспериментальным СД2. Наблюдалось характерное для ингибиторов GSK3B улучшение чувствительности к инсулину, снижение гиперинсулинемии, а значит – секреторной нагрузки на β -клетки поджелудочной железы. Нормализация жирового обмена и снижение массы белого висцерального жира связаны, по всей видимости, с системным противовоспалительным эффектом соединения (Рисунок 64). Способность снижать повышенную агрегируемость

тромбоцитов и антикоагулянтное действие являются дополнительными преимуществами, потенциально важными для снижения сердечно-сосудистого риска у пациентов с СД2.

При экспериментальном изучении 83 соединений фокусированной библиотеки, относящихся к 5 различным скаффолдам, 36 соединений в концентрации 10 мкМ активировали рекомбинантную АМПК человека на 50% и более. Величины EC_{50} определены для 8 наиболее активных соединений (Рисунок 65). Наибольшая активность и явная взаимосвязь структура-активность наблюдалась для 2'-карбонитрил-бифенил-замещенных конденсированных производных бензимидазола, показавших EC_{50} в субмикромольном диапазоне (Рисунок 66). Увеличение размеров внешнего цикла гетероциклического ядра от 5-членного до 7-членного положительно коррелировала с активацией АМПК. Меньшую активность проявили производные имидазо[2,1-*a*]изохинолина и бензо[*f*]хромена. Во всех случаях можно выделить подструктурный фрагмент бифенила, конъюгированный с ароматическим или частично гидрированным гетероциклом.

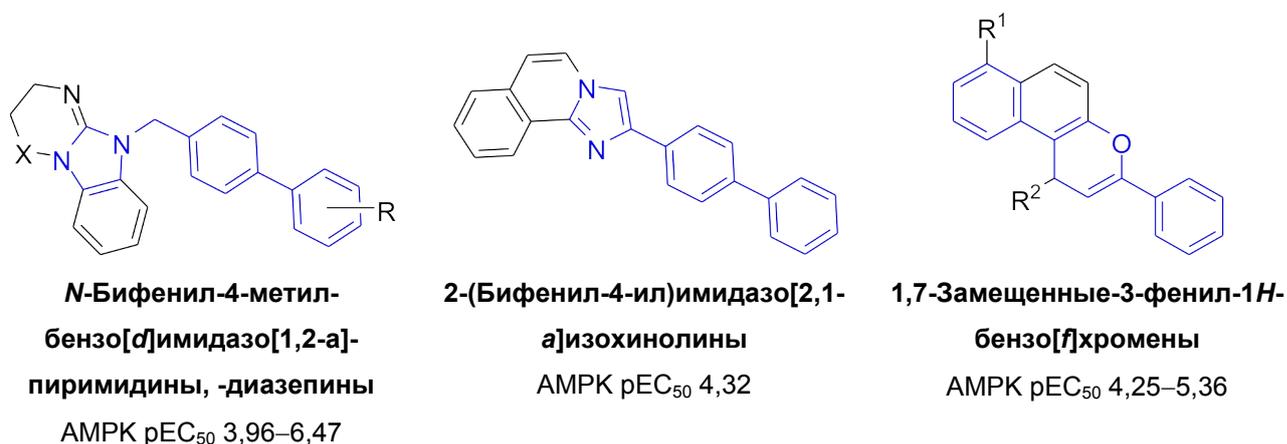


Рисунок 65 – Классы наиболее активных найденных активаторов АМПК.

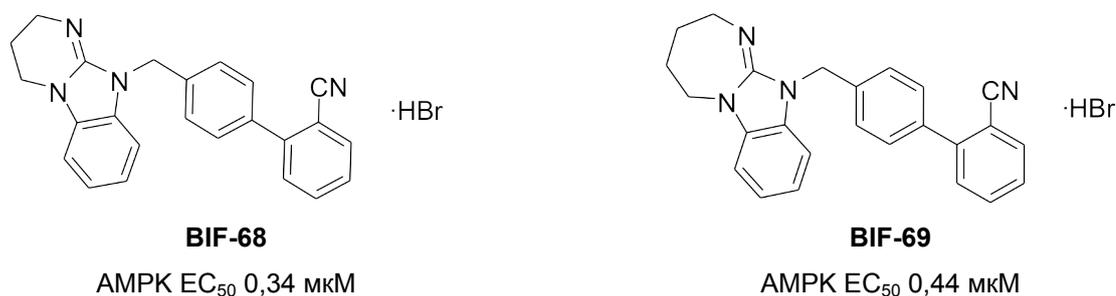


Рисунок 66 – Наиболее активные найденные активаторы АМПК.

Последующая оценка влияния соединений-лидеров на воспалительную активацию перитонеальных макрофагов мышей C57bl/6j подтвердила, что наибольшей активностью обладают бифенильные производные бензимидазола AZH-143, BIF-68, BIF-69. Наиболее активные соединения BIF-68 и BIF-69 равноэффективно ингибировали синтез оксида азота макрофагами с IC_{50} около 5 мкМ, проявляя низкую цитотоксичность ($CC_{50} > 100$ мкМ согласно

МТТ-тесту). Связь активации АМПК с подавлением синтеза NO и стимулированием противовоспалительной поляризации макрофагов описана ранее [234; 240]. К сожалению, ни ВIF-69, ни другие выявленные АМПК-активаторы не проявили гипогликемической активности в экспериментах на животных, возможно из-за недостаточной клеточной проницаемости. Известно, что наличие положительно заряженного атома азота в составе цикла может снижать проницаемость клеточной мембраны для соединения путем пассивной диффузии [253]. Тем не менее, учитывая высокую активность *in vitro*, синтетическую доступность и благоприятные характеристики лекарственного подобия, выявленные 2'-циано-бифенильные производные бензимидазолов можно рассматривать как ценную отправную точку для последующей оптимизации и разработки новых активаторов АМПК с плейотропной антидиабетической активностью. Выявленный скаффолд является новым и ранее не описан в литературе.

В результате скрининга фокусированной библиотеки из 51 соединения выявлено 12 активных, подавлявших специфическую активность РТР1В на 50% и более. Из числа последних валидировано 9 ингибиторов, обладающих активностью в микромолярном диапазоне. Для наиболее активных соединений характерен общий скаффолд – бифенильный заместитель, соединенный коротким линкерным фрагментом с ядром 2-иминобензимидазола.

Производные имидазо[2,1-а]изохинолина и бензо[*d*]имидазо[1,2-а]имидазола, содержащие конформационно менее подвижный бифенильный радикал, обладают равной или меньшей активностью (Рисунок 67). Такое строение молекул близко к известным из литературы аллостерическим ингибиторам РТР1В, содержащим объемные ароматические заместители.

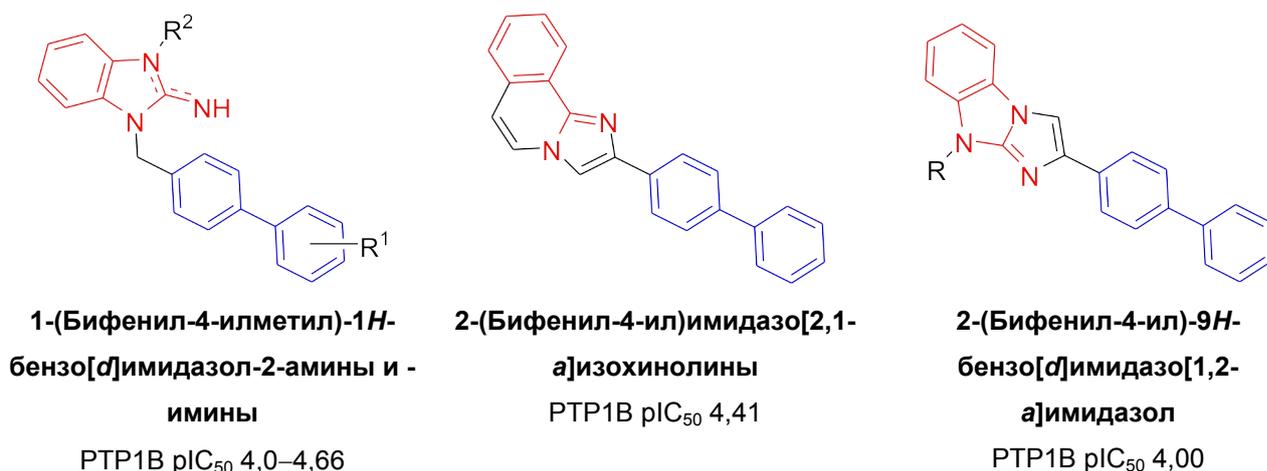


Рисунок 67 – Классы наиболее активных найденных ингибиторов РТР1В.

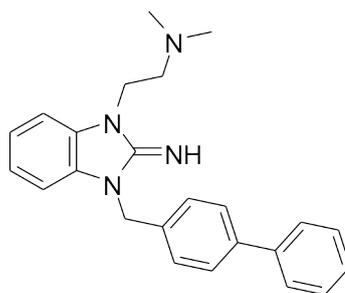
**AZH-141a**PTP1B IC₅₀ 30,47 мкМAMPK EC₅₀ 21,7 мкМ

Рисунок 68 – Наиболее активный найденный ингибитор PTP1B/активатор AMPK.

Ключевым преимуществом аллостерических ингибиторов PTP1B перед конкурентными ингибиторами, связывающимися с активным центром фермента, являются их лучшие фармакокинетические характеристики, что обусловлено большей липофильностью молекул. Также было обнаружено, что одно из наиболее активных соединений AZH-141a является не только ингибитором PTP1B, но и микромолярным активатором AMPK (Рисунок 68). Аналогичные по структуре ингибиторы PTP1B и активаторы AMPK не описаны в литературе, как и вообще низкомолекулярные соединения, обладающие двумя этими видами активностей.

Определение расчетных характеристик лекарственного подобия и фармакокинетических свойств для двух соединений-лидеров AZH-141a и BIF-10 подтвердило перспективность их дальнейшего изучения. При исследовании антидиабетической активности на животных выявлено, что AZH-141a, но не BIF-10, обладает гипогликемическим эффектом при однократном введении интактным крысам в дозе 300 мг/кг перорально. Таким образом, соединение AZH-141a перорально биодоступно, подтверждая ADMET-прогноз, но проявляет активность в высокой дозе, что коррелирует с невысокой микромолярной активностью соединения *in vitro*.

Соединение AZH-141a при 21-дневном введении крысам с ожирением и экспериментальным СД2 в дозе 30 мг/кг также обладает антигипергликемической активностью и улучшает толерантность к глюкозе. Соединение предотвращало увеличение массы тела животных и оказывало нормализующее влияние на массу висцеральных жировых отложений, хотя и менее выраженное, чем у метформина в дозе 300 мг/кг. При этом положительное влияние на липидный профиль периферической крови (снижение концентраций общего холестерина и липопротеинов низкой плотности при повышении концентрации липопротеинов высокой плотности) было более существенным для AZH-141a. Вероятно, эти данные можно объяснить реализацией эффекта соединения через ингибирование PTP1B, имеющей большое влияние на липидный гомеостаз посредством дефосфорилирования ассоциированной с рецептором лептина киназы JAK2 (Рисунок 69). В целом, эти результаты можно рассматривать как доказательство

концепции того, что соединение, модулирующее активность двух мишеней терапии СД2 (в данном случае, АМРК и РТР1В) может обладать значимым и устойчивым антидиабетическим эффектом, несмотря на относительно невысокую аффинность к этим ферментам в условиях *in vitro*.

Ито и соавт. [198] описали бифенил-содержащий ингибитор РТР1В КУ-226 (IC_{50} 0,28 мкМ) со схожей фармакологической активностью. При введении мышам db/db в дозах 10 и 30 мг/кг в течение 4 недель КУ-226 существенно снижал концентрацию глюкозы и триглицеридов плазмы крови, улучшал толерантность к глюкозе, но не влиял на массу тела. При введении мышам с алиментарным ожирением замедлял прирост массы тела и жировых отложений.

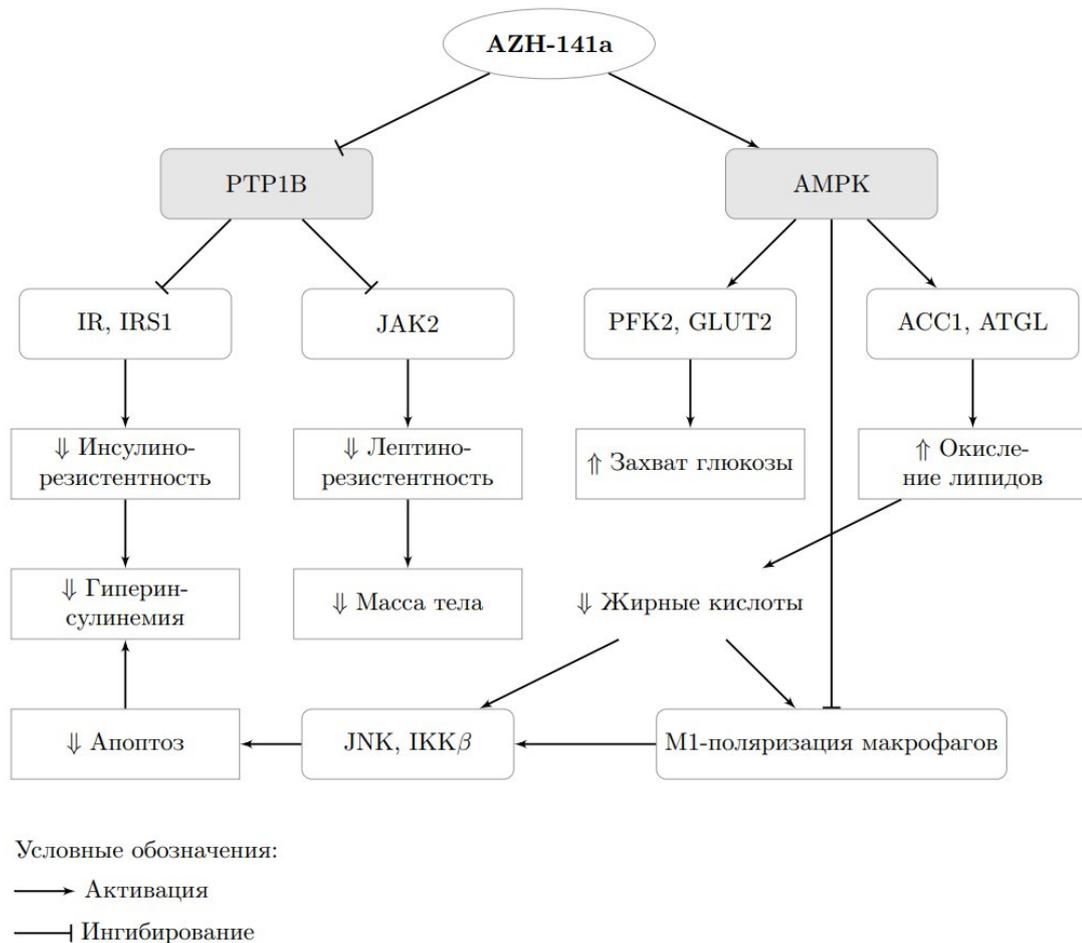


Рисунок 69 – Схема плеiotропной антидиабетической активности ингибитора РТР1В и активатора АМРК соединения AZH-141a.

В результате скрининга фокусированной библиотеки соединений выявлено 27 соединений, валидированных как активаторы GSK. Таким образом, результативность скрининга составила 21,3%. Величины EC_{50} выявленных соединений лежат в диапазоне 19 мкМ – 82 мМ. Такая относительно невысокая активность выявленных соединений, скорее всего, связана с отсутствием близких структурных аналогов референсных активаторов GSK в библиотеке доступных соединений. Наиболее типичные скаффолды известных активаторов включают три

ароматических цикла, соединенных с одним алифатическим линкерным фрагментом (Рисунок 70). Структуры подобного строения не были выявлены при проведении виртуального фармакофорного скрининга. Вместе с тем, предложенный подход позволил выявить новый класс активаторов GSK – биспиридоксиновые соединения, аналоги которых неизвестны из открытых источников. Представители ряда, соединения NP-0001, NP-0006, NP-0061, NP-0063, обладали наибольшей активностью среди всех выявленных соединений (EC_{50} 18,56 – 47,71 мкМ, Рисунок 71). При этом эффективность соединений-лидеров (максимальная величина активации GSK) сопоставима с эффективностью соединения сравнения PF-04937319. Представители прочих скаффолдов проявляют существенно меньшую активность, например бензо[4,5]имидазо[2,1-*c*][1,2,4]триазин-4(10*H*)-оны ($EC_{50} > 100$ мкМ) и бензо[*d*]имидазо[1,2-*a*]имидазолы ($EC_{50} > 500$ мкМ).

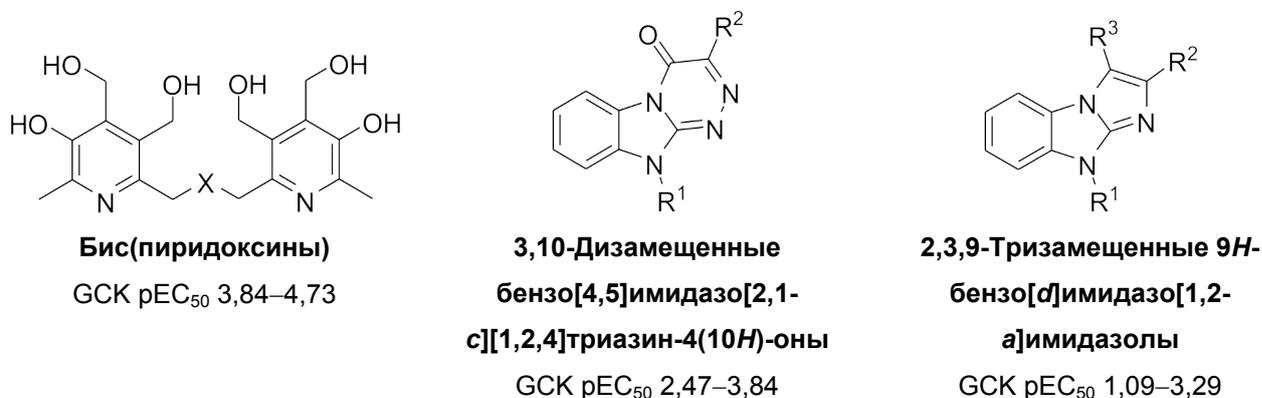


Рисунок 70 – Классы наиболее активных найденных активаторов GSK.

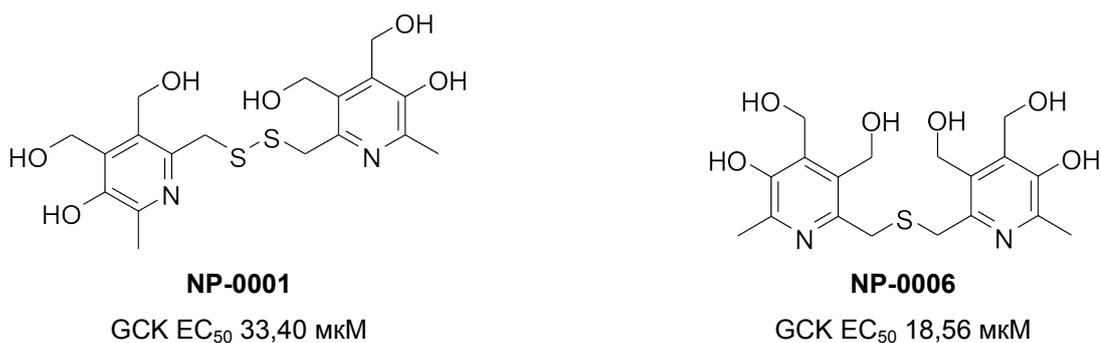


Рисунок 71 – Наиболее активные найденные активаторы GSK.

Прогноз фармакокинетических и токсикологических характеристик наиболее активных соединений NP-0001 и NP-0006 показал высокую степень безопасности и благоприятные физико-химические свойства, включая высокую растворимость в воде. Оценка их влияния на жизнеспособность макрофагов мышей и фибробластов крыс показала отсутствие цитотоксичности вплоть до концентрации 250 мкМ, подтверждая перспективность оценки их

фармакологической активности на животных. Согласно консенсусной компьютерной оценке фармакокинетических характеристик, эффективность соединений-лидеров может быть ограничена невысокой проницаемостью клеточных мембран и пероральной биодоступностью менее 20%.

Последующая оценка антигипергликемической активности соединений-лидеров на интактных крысах показала, что соединение NP-0001 не эффективно при введении как перорально, так и внутривентриально в дозе до 300 мг/кг. Соединение NP-0006 улучшало толерантность к глюкозе без развития гипергликемии в дозах 300 мг/кг и 500 мг/кг внутривентриально. При этом при пероральном введении соединение теряло эффективность, что подтверждает справедливость прогнозных оценок ADMET.

Оценка антидиабетической активности соединения NP-0006 была выполнена при 21-дневном введении мышам с ожирением DIO-C57bl/6j в дозе 300 мг/кг внутривентриально в сравнении с метформином. При оценке влияния на углеводный обмен показано, что NP-0006 повышает активность GSK печени на 78,4% и нормализует содержание гликогена печени до уровня интактных животных, что подтверждает вовлечение GSK в реализацию его механизма действия. Отмечена нормализация гликемии натощак начиная с 7-ого дня введения без развития гипогликемии в течение всего эксперимента. На 21-ый день введения в экспериментальных группах, получавших NP-0006 или метформин восстанавливалась нормальная толерантность к глюкозе и индекс чувствительности к инсулину HOMA-IR. Как NP-0006, так и метформин корректировали гиперинсулинемию с равной эффективностью.

При оценке влияния на жировой обмен выявлено, что соединение NP-0006, но не метформин, статистически значимо снижало массу тела животных, находящихся на высокожировой диете. При анализе удельных масс печени и основных депо висцеральной жировой ткани выявлено, что снижение массы тела соединением NP-0006 в первую очередь связано с выраженным уменьшением мезентериальных и ретроперитонеальных жировых отложений (34,8% и 36,4% от группы контрольной группы, соответственно). При этом как метформин, так и NP-0006 нормализовали концентрацию триглицеридов в плазме крови, но только введение NP-0006 было ассоциировано с повышением содержания триглицеридов в печени.

Ранее при исследовании биопсий человеческой печени выявлена ассоциация экспрессии глюкокиназы с повышением *de novo* липогенеза [95], также высказывались опасения о риске развития стеатоза печени при применении активаторов GSK [168; 316]. С другой стороны, в работе Nakamura и соавт. [67] даже 20-недельное введение мышам активатора GSK не вело к негативным эффектам на липидный профиль крови и функции печени, субхроническое введение активатора PF-04991532 крысам GK также не вело к увеличению триглицеридов печени [193].

Очевидно, что влияние NP-0006 на липиды печени требует особого внимания при дальнейшем изучении. Исследования, посвященные оценке антидиабетической активности других активаторов GSK, показали схожие результаты. Например, активатор TMG-123 улучшал толерантность к глюкозе без увеличения секреции инсулина у инсулин-резистентных мышей db/db, при этом не наблюдалось влияния на уровни триглицеридов плазмы крови и печени [201].

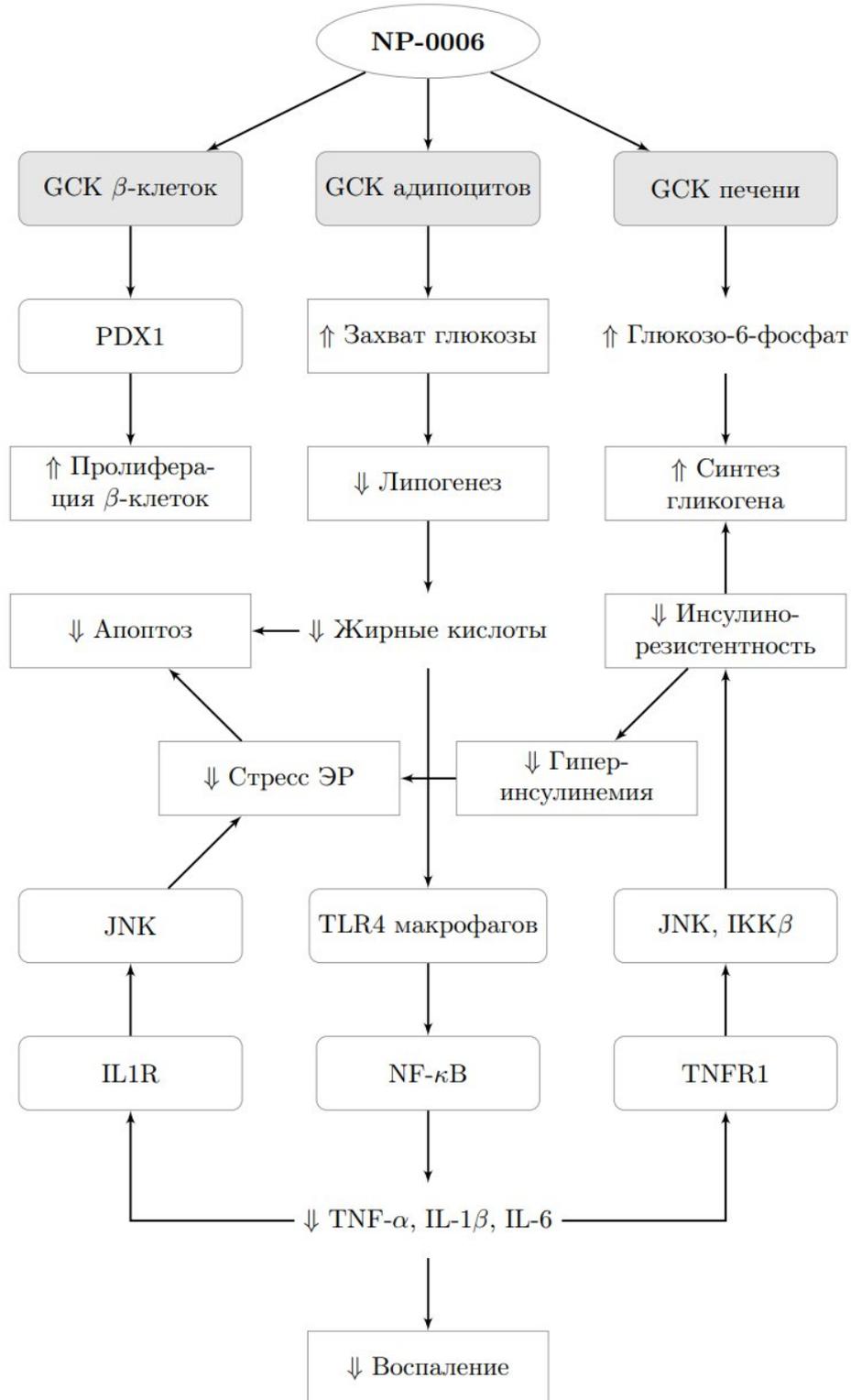


Рисунок 72 – Схема плеiotропной антидиабетической активности активатора GSK соединения NP-0006.

При оценке иммунного статуса животных показано, что NP-0006, как и метформин, корректировало маркеры хронического подострого воспаления, характерного для метаболического синдрома. Выявлено снижение доли сегментоядерных нейтрофилов и восстановление нормального содержания лимфоцитов при падении уровня циркулирующих иммунных комплексов до нормальных значений. Прямых аналогичных исследований в литературе не выявлено. Возможно, маркеры системного воспаления корректируются вследствие общей нормализации углеводно-липидного гомеостаза.

Отдельно изучено влияние NP-0006 на процессы пролиферации β -клеток поджелудочной железы, так как это свойство является особо ценным для долговременных целей терапии СД2. При однократном введении мышам со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом в дозе 50 мг/кг внутривентриально NP-0006 достоверно увеличивало удельное количество β -клеток на 86,2% к контрольной группе и снижало удельное количество глюкагон-продуцирующих клеток на 43,8%. Интересно отметить, что введение NP-0006 вело к росту числа внеостровковых β -клеток в ацинарной ткани поджелудочной железы и рядом с панкреатическими протоками в 5,6 раза, тогда как для соединения сравнения PF-04937319 рост составлял 1,8 раза. Эти данные согласуются с результатами [54], где активатор GKA (50 мг/кг) вызывал 2-кратное увеличение пролиферирующих β -клеток мышей через 17 часов после введения.

Таким образом, в результате направленного скрининга и валидации выявлен неизвестный ранее класс бис-пиридоксиновых активаторов GCK. Соединение-лидер NP-0006 подтвердило способность улучшать толерантность к глюкозе как при однократном, так и при субхроническом внутривентриальном введении животным с СД2. Показано, что введение NP-0006 значительно повышает активность глюкокиназы печени, что подтверждает механизм его действия. Соединение не только снижает секреторную нагрузку на β -клетки, препятствуя гиперинсулинемии, но и стимулирует их регенерацию, нормализуя периферическую чувствительность к инсулину, гликемию натощак и способствуя снижению висцеральных жировых отложений и массы тела у мышей с экспериментальным СД2 (Рисунок 72). Низкая острая токсичность делает его перспективным кандидатом для дальнейшей оптимизации, которая должна быть направлена на достижение пероральной биодоступности и, возможно, ограничения влияния на липогенез в печени.

В заключении необходимо отметить, что СД2 – это многофакторное хроническое заболевание, которое требует постоянного медицинского ухода, самоконтроля пациентом уровня глюкозы крови и многофакторных стратегий снижения риска для нормализации уровня глюкозы в крови, липидного профиля и артериального давления для предотвращения или минимизации острых и отдаленных микрососудистых осложнений (включая ретинопатию, нефропатию и нейропатию) и макрососудистых осложнений (таких как инфаркт миокарда и инсульт). СД2

следует рассматривать и лечить как гетерогенное заболевание с множественными патофизиологическими отклонениями, различной восприимчивостью к осложнениям и различной клинической реакцией на терапевтическое вмешательство [445]. В конечном счете, настоящее «излечение» от СД2 потребует, по крайней мере, полного выяснения его молекулярной этиологии и разработки эффективных мер борьбы с распространением ожирения. В настоящее время общепринятая точка зрения заключается в том, что долгосрочная нормализация уровня глюкозы в крови при СД2 зависит от задержки или обращения вспять нарушения функции β -клеток для обеспечения соответствующей секреции инсулина и улучшения чувствительности к инсулину. В настоящее время разрабатываются новые методы лечения [393], которые в сочетании с существующими препаратами могут достичь долговременного и устойчивого гликемического контроля, что, в свою очередь, создаст возможность замедления или предотвращения прогрессирующих микрососудистых и макрососудистых осложнений.

Одним из перспективных направлений разработки таких инновационных ЛС является фармакологическая регуляция метаболических и сигнальных путей в β -клетках поджелудочной железы, тканях-мишенях инсулина и тканевых макрофагах. Используя комплексный подход к оценке и валидации мишеней, в работе были выбраны как приоритетные следующие белки: киназа гликогенсинтазы 3-бета (GSK3B), АМФ-активируемая протеинкиназа (АМПК), протеинтирозинфосфатаза типа 1В (PTP1B), глюкокиназа (GCK). Их терапевтическая ценность в отношении СД2 приведена в Таблице 27.

Таблица 27 – Характеристика выбранных антидиабетических стратегий

Механизм действия	Влияние на инсулин-зависимые ткани	Влияние на β -клетки поджелудочной железы	Влияние на системное воспаление
Ингибирование киназы гликогенсинтазы 3-бета (GSK3B)	Стимулирует захват и утилизацию глюкозы, синтез гликогена	Защищает от апоптоза	Подавляет провоспалительную активацию макрофагов и выброс цитокинов
Активирование АМФ - активируемой протеинкиназы (АМПК)	Стимулирует утилизацию глюкозы, расщепление липидов и окисление жирных кислот, подавляет глюконеогенез	Защищает от глюко- и липотоксичности	Стимулирует противовоспалительную активацию макрофагов
Ингибирование протеин-тирозинфосфатазы типа 1В (PTP1B)	Нормализует инсулино- и лептиночувствительность, снижает потребление пищи	Снижение секреторной нагрузки	Косвенное через нормализацию гомеостаза липидов
Активирование глюкокиназы (GCK)	Стимулирует захват и окисление глюкозы	Нормализует секрецию инсулина, стимулирует регенерацию	Косвенное через нормализацию гомеостаза глюкозы

Отбор соединений для экспериментального исследования, т.е. скрининга на целевых мишенях, проводился с учетом критериев лекарственного подобия GSK3 и Ro4 и подструктурных маркеров токсичности. Не отвечающие им соединения исключались из исследования как неперспективные. Далее проводили поиск наиболее активных ранее описанных низкомолекулярных ингибиторов или активаторов выбранных мишеней в публичной базе данных ChEMBL и использовали их скаффолды как образец для виртуального скрининга библиотеки исследуемых соединений. В результате формировали фокусированные мишень-специфические библиотеки для экспериментального скрининга. Выявленные активные соединения служили основой для формулирования закономерностей структура-активность и выбора соединений для дальнейшей валидации на клеточных и животных моделях. Одной из наиболее удобных клеточных моделей служили ЛПС-активированные первичные макрофаги мышей C57bl/6j, которые позволяют параллельно оценить цитотоксичность и противовоспалительную активность соединений, важную в контексте способности соединений подавлять системное хроническое метавоспаление и индуцированную M1-макрофагами периферическую инсулинорезистентность. Далее проводилась оценка расчетных параметров фармакокинетики и безопасности соединений-лидеров. Наконец, оценивали их фармакологическую активность на животных моделях СД с определением мишень-специфических аспектов влияния на β -клетки и маркеры углеводного и жирового обмена.

Предложенная оригинальная система выбора мишеней, виртуального и экспериментального скрининга позволила идентифицировать соединения, которые действуют через валидированные мишени и обладают плеiotропной антидиабетической активностью, нормализуя углеводный и жировой обмен, уменьшая системное воспаление и способствуя снижению массы тела животных с экспериментальным СД2 (Таблица 27). Активатор глюкокиназы NP-0006 стимулирует образование новых β -клеток поджелудочной железы у мышей с СД1, эффект защиты β -клеток от апоптоза описан в литературе для ингибиторов GSK3B. В сочетании с низкой острой токсичностью полученные данные позволяют рекомендовать выявленные соединения-лидеры для дальнейшей оптимизации и полного доклинического изучения как инновационных антидиабетических средств.

Прогресс, достигнутый в изучении молекулярных механизмов инсулинорезистентности, глюко- и липотоксичности, дисфункции и регуляции пролиферации β -клеток, роли метаболических и иммунометаболических изменений в макрофагах, адипоцитах и гепатоцитах, создает фундаментальную основу создания новых антидиабетических средств, способных преодолеть ограничения существующих препаратов. Выбранные в работе биологические мишени регулируют активность сигнальных путей инсулина (GSK3B, PTP1B), лептина (PTP1B) и метаболических каскадов глюкозы и липидов (AMPK, GSK). Регуляция их

тканеспецифических функций ведет к развитию комплементарных фармакологических эффектов, направленных на нормализацию углеводного, липидного и энергетического гомеостаза клеток, а также коррекцию системного воспаления. Идентифицированные в настоящей работе ингибиторы и активаторы мультифункциональных киназ корректируют системный гомеостаз глюкозы и липидов, устраняют повреждающие β -клетки факторы и стимулируют их регенерацию (Таблица 28), доказывая возможность и перспективность плейотропного воздействия на метаболические дефекты СД2 через регуляцию активности внутриклеточных сигнальных каскадов, что является принципиально новым подходом к лечению СД2.

Таблица 28 – Сравнение антидиабетической активности соединений-лидеров на животных моделях СД2

Фармакологический показатель	Соединение (мишень)		
	К-167 (GSK3B)	AZH-141a (AMPK/PTP1B)	NP-0006 (GCK)
Гликемия натощак	↓↓↓	↓↓	↓↓↓
Толерантность к глюкозе	↑↑↑	↑	↑↑
Гиперинсулинемия	↓↓↓	н.д.	↓↓
Инсулинорезистентность	↓↓	н.д.	↓↓↓
Липиды крови	–	↓↓↓	↓
Триглицериды печени	↓↓	н.д.	↑
Масса висцерального жира	↓↓	↓↓	↓↓↓
Масса тела	–	↓↓	↓↓
Системное воспаление	↓↓	н.д.	↓
Пролиферация β -клеток	н.д.	н.д.	↑↑

«н.д.» – нет данных;

«–» – нет значимого эффекта.

Выводы

1. Разработана оригинальная система мишень-ориентированного поиска антидиабетических соединений с использованием информационных технологий, включающая выбор валидированных мишеней, представляющих наибольший интерес для разработки новых ЛС, ранний отсев неперспективных соединений по расчетным критериям лекарственного подобия и токсичности, отбор соединений для экспериментального изучения на основании фармакофорной схожести к скаффолдам ранее описанных модуляторов мишени, валидацию активных соединений для выявления ложноположительных результатов, оценку активности и цитотоксичности на клеточных моделях, расчет ADMET-характеристик, последовательное определение эффективности соединений-лидеров при однократном и хроническом введении животным с экспериментальным СД2.
2. Выявлен перспективный скаффолд ингибиторов GSK3B – 3-арилиден-2-оксиндолы, показана важность электронодонорного заместителя в 3-арилиденовом фрагменте и возможность введения ацетамидных и карбаматных заместителей в положении 5 2-оксиндольного ядра для увеличения растворимости. Валидированы 16 активных соединений из 42 (38,1%), отобранных для изучения. Найден новый перспективный скаффолд активаторов АМРК – бифенил-2'-карбонитрил-конъюгированные бензо[*d*]имидазо[1,2-*a*]имидазолы. Валидированы 8 активных соединений из 83 (9,6%), отобранных для изучения. Идентифицирован новый класс ингибиторов РТР1В – бифенил-замещенные 2-аминобензимидазолы и 2-иминобензимидазолы, допускающие разнообразную природу линкерных фрагментов и заместителей в боковых цепях. Эффективность скрининга составила 17,6% (валидированы 9 активных соединений из 51 исследованного). Выявлен ранее неизвестный скаффолд активаторов GSK – бис-пиридоксиновые соединения с линкерным серусодержащим алифатическим фрагментом. При этом их аналоги, имеющие кислородсодержащий или азотсодержащий линкерный фрагмент, проявляют в 2-5 раз меньшую активность. Найдено 27 активных соединений из 127 (21,3%), отобранных для изучения. Общая результативность скрининга после отсева ложноположительных соединений составила 19,8% (60 активных соединений из 303 исследованных).
3. Соединение К-167 (Z-3-(пиридин-2-илметил)индолин-2-он) является наномолярным ингибитором GSK3B (IC₅₀ 4 нМ) и обладает плеiotропной антидиабетической активностью на животной модели сахарного диабета 2-го типа

(мышь C57BL/6J с алиментарным ожирением) при 3-х месячном пероральном введении в дозе 30 мг/кг. Показано значительное снижение уровня инсулина плазмы крови ($770,6 \pm 106$ пкг/мл против $3553 \pm 324,1$ пкг/мл в группе контроля), а также инсулинорезистентности по показателю НОМА-IR ($5,29 \pm 0,67$ усл. ед против $7,47 \pm 0,41$ усл. ед в группе контроля). Соединение улучшает толерантность к глюкозе сопоставимо с препаратом сравнения метформином в дозе 150 мг/кг перорально (площадь под кривой глюкоза-время $-15,0\%$ против $-12,9\%$) на 3-й месяц введения. Показано уменьшение массы висцеральных жировых отложений: ретроперитонеальных на $34,9\%$, мезентериальных на $33,54\%$ и эпидидимальных на $36,9\%$ по сравнению с группой сахарного диабета. Выявлено значимое сокращение содержания триглицеридов печени на $24,3\%$ от группы сахарного диабета. Отмечалось снижение признаков системного воспалительного процесса: достоверное восстановление количества сегментоядерных нейтрофилов ($18,6 \pm 3\%$ против $30,0 \pm 1,6\%$) и лимфоцитов ($76,6 \pm 3,1\%$ против $63,0 \pm 2,0\%$) по отношению к группе контроля. Соединение К-167 привело к достоверному подавлению секреции ФНО- α ($39,4\%$) и оксида азота ($59,3\%$). На клеточных моделях выявлено отсутствие иммунотоксичности (перитонеальные макрофаги и нейтрофилы), гепатотоксичности (НерG2), а также влияния на быстропролиферирующие линии клеток (неонатальные фибробласты) вплоть до концентрации 100 мкМ. К-167 предотвращает индуцированную бактериальным липополисахаридом провоспалительную активацию макрофагов, при этом не влияя на процесс фагоцитоза. Соединение К-167 в дозе 30 мг/кг оказало более выраженное антитромботическое действие, чем препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в дозе 150 мг/кг (продолгование времени окклюзии сонной артерии, индуцированной аппликацией 50% раствора FeCl₃ $78,51 \pm 19,48\%$ и $68,4 \pm 16,4\%$, соответственно). К-167 относится к 5-му классу токсичности (нетоксичные соединения), LD₅₀ >5000 мг/кг при пероральном введении мышам.

4. Соединения ВIF-68 и ВIF-69 (гидробромид 4'-(3,4-дигидро-пиримидо-[1,2-а]бензимидазол-10(2H)-ил-метил)бифенил-2-карбонитрила и гидробромид 4'-(2,3,4,5-тетрагидро-1H[1,3]дiazепино[1,2-а]-бензимидазол-11-ил-метил)бифенил-2-карбонитрила) являются субмикромольными активаторами АМПК (EC₅₀ 0,34 мкМ и 0,44 мкМ, соответственно), а также равноэффективно ингибируют синтез оксида азота ЛПС-стимулированными макрофагами с IC₅₀ 5,3 мкМ и 5,0 мкМ, соответственно, проявляя низкую цитотоксичность (CC₅₀ >100 мкМ согласно МТТ-

тесту). При этом соединения не проявили гипогликемической активности на животных при внутрибрюшинном введении. Согласно ADMET-прогнозу, это может быть связано с недостаточной клеточной проницаемостью.

5. Соединение AZH-141a (1-(2-диметиламиноэтил)-3-(бифенил-4-ил)метил-2-иминобензамидазолия гидробромид) является микромолярным ингибитором РТР1В (IC_{50} 30,5 мкМ) и микромолярным активатором АМРК (EC_{50} 21,7 мкМ) и обладает плеiotропной антидиабетической активностью на животной модели сахарного диабета 2-го типа (крысы с алиментарным ожирением и индукцией стрептозотоцином) при 21-дневном пероральном введении в дозе 30 мг/кг. Показано значимое улучшение толерантности к глюкозе, несколько уступающее эффекту препарата сравнения метформина в дозе 300 мг/кг перорально (площадь под кривой глюкоза-время $-19,8\%$ против $-31,0\%$) и нормализация гликемии натощак ($-41,7\%$ против $-22,7\%$) на 21-ый день введения. Соединение AZH-141a вызвало падение массы висцеральных жировых отложений: ретроперитонеальных на 43,1%, мезентериальных на 19,1% и эпидидимальных на 42,9% по сравнению с группой сахарного диабета, и общее снижение массы тела ($-23,9\%$ против $-28,2\%$ в группе метформина). Выявлено значимое уменьшение содержания общего холестерина и липопротеинов низкой плотности на 57,9% и 44,3% от группы сахарного диабета, соответственно, при повышении содержание липопротеинов высокой плотности в 1,9 раза. AZH-141a относится к 3-му классу токсичности (умеренно токсичные соединения), LD_{50} $163,8 \pm 24,5$ мг/кг при пероральном введении мышам.
6. Соединение NP-0006 (бис[3,4-дигидроксиметил-5-гидрокси-6-метилпиридин-2-илметил]сульфан) является микромолярным активатором GCK (EC_{50} 18,6 мкМ; E_{max} $150,6 \pm 1,8\%$) и обладает плеiotропной антидиабетической активностью на животной модели сахарного диабета 2-го типа (мыши C57BL/6J с алиментарным ожирением) при 3-х недельном внутрибрюшинном введении. Показано значительное снижение гиперинсулинемии ($5,57 \pm 2,6$ мкЕд/мл против $16,3 \pm 2,38$ мкЕд/мл в группе контроля), а также инсулинорезистентности по показателю НОМА-IR ($1,36 \pm 0,64$ усл. ед. против $4,93 \pm 1,9$ усл. ед. в группе контроля). Соединение обладает выраженной способностью улучшать толерантность к глюкозе, сопоставимой с таковой у препарата сравнения метформина в дозе 150 мг/кг внутрибрюшинно (площадь под кривой глюкоза-время $-27,9\%$ против $-31,3\%$). Выявлено восстановление синтеза гликогена ($1,85 \pm 0,05$ мМ против $1,52 \pm 0,05$ мМ), ингибирование глюконеогенеза и активирование глюкокиназы печени ($12,1 \pm 3,36$ мЕД/мг белка против $6,79 \pm 2,64$ мЕД/мг белка) по отношению к

группе контроля. Показано снижение массы тела животных ($28,9 \pm 1,8$ г против $33,4 \pm 4,3$ г у группы контроля, $p < 0,05$), в основном за счет ретроперитонеальных и мезентериальных висцеральных жировых отложений (в 1,6 и 1,5 раз, соответственно, по сравнению с группой сахарного диабета). Отсутствовало влияния на уровень холестерина и ЛПНП при незначимом сокращении содержания триглицеридов в плазме крови. Отмечалось подавление системного воспалительного процесса: показано достоверное восстановление количества сегментоядерных нейтрофилов ($29,3 \pm 4,7\%$ против $51,8 \pm 5,8\%$) и лимфоцитов ($61,4 \pm 5,8\%$ против $38,25 \pm 3,8\%$) по отношению к группе контроля, статистически незначимое снижение уровня палочкоядерных нейтрофилов ($2,67 \pm 1,3\%$ против $4,25 \pm 1,25\%$ у группы контроля), а также уменьшение содержания циркулирующих иммунных комплексов в 2,4 раза. NP-0006 повышает пролиферативную активность β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы мышей с сахарным диабетом 1-го типа при однократном введении в дозе 50 мг/кг. Показано увеличение удельного количества инсулин-позитивных клеток, сопоставимое с таковым у препарата соединения сравнения – активатора глюкокиназы PF-04937319 ($43,2 \pm 22,6\%$ против $42,4 \pm 12,1\%$). NP-0006 относится к 4-му классу токсичности (малотоксичные соединения), $LD_{50} > 2000$ мг/кг при пероральном введении мышам, $LD_{50} > 1000$ мг/кг при внутрибрюшинном введении.

Практические рекомендации

1. Рекомендуется использовать разработанную систему мишень-ориентированного поиска антидиабетических соединений для эффективного выявления новых валидированных фармакологически активных веществ и сокращения объема экспериментальных исследований.
2. Целесообразно продолжить поиск новых ингибиторов GSK3B среди производных 3-арилиден-2-оксиндола, замещенных по 5-му положению и/или арильному радикалу. Целесообразен поиск и оптимизация новых активаторов АМРК в ряду бифенил-2'-карбонитрил-конъюгированных бензо[*d*]имидазо[1,2-*a*]имидазолов, при этом важно учитывать фактор клеточной проницаемости. Рекомендуется синтез новых бифенил-замещенных 2-аминобензимидазолов и 2-иминобензимидазолов для поиска ингибиторов РТР1В, в том числе одновременно являющихся прямыми активаторами АМРК. Целесообразно направить усилия на оптимизацию бис(пиридоксиновых) соединений для разработки новых активаторов GSK с пероральной биодоступностью и/или на разработку соответствующих систем доставки.
3. Целесообразно проведение полных доклинических исследований плеiotропного антидиабетического соединения ингибитора GSK3B К-167 (*Z*-3-(пиридин-2-илметил)индолин-2-он), сочетающего инсулин-сенситизирующее действие, способность нормализовать обмен глюкозы и липидов с противовоспалительным и антитромботическим действием.
4. Рекомендуется проведение полных доклинических исследований плеiotропного антидиабетического соединения активатора GSK NP-0006 (бис[3,4-дигидроксиметил-5-гидрокси-6-метилпиридин-2-илметил]сульфан), обладающего выраженной способностью нормализовывать показатели углеводного обмена, чувствительности к инсулину, корректировать системное воспаление и стимулировать образование новых β -клеток в условиях сахарного диабета.

Список сокращений и условных обозначений

ADMET	– англ. Absorbtion, distribution, metabolism, excretion, toxicity – «абсорбция, распределение, метаболизм, выведение, токсичность»
АКТ	– протеинкиназа В типа α
АМПК	– АМФ-активируемая протеинкиназа
AUC	– англ. Area under curve – «площадь, ограниченная кривой и осью абсцисс»
DMEM	– англ. Dulbecco's modified Eagles medium
DPP-4	– дипептидилпептидаза-4
GCK	– глюкокиназа
GLP-1	– глюкагоноподобный пептид-1
GSK3B	– Киназа-3 бета гликогенсинтазы
GWAS	– англ. Genome-wide association studies – «исследования полногеномной ассоциации»
НОМА-IR	– англ. Homeostasis model assessment of insulin resistance – «гомеостатическая модель оценки резистентности к инсулину»
IKK β	– ингибитор β -субъединицы киназы NF- κ B
IRS1/2	– субстрат рецептора инсулина 1 и 2
JNK	– N-концевая киназа c-Jun
NEMO	– регуляторная субъединица γ протеинкиназы IKK
NF- κ B	– ядерный фактор κ B
PDX1	– фактор транскрипции 1 промотора инсулина
PPAR α	– рецептор типа α , активируемый пероксисомным пролифератором
PTP1B	– протеинтирозинфосфатаза 1B
TLR4	– толл-подобный рецептор 4
БСА	– бычий сывороточный альбумин
ВЖД	– высокожировая диета
ДМСО	– диметилсульфоксид
ДТТ	– дитиотреитол
ЛПВП	– липопротеины высокой плотности
ЛПНП	– липопротеины низкой плотности
ЛС	– лекарственное средство
СД2	– сахарный диабет 2-ого типа

Список литературы

1. Петров В.И. Фармакоэкономический анализ эффективности комплексной терапии больных с сахарным диабетом 2-го типа / В.И. Петров, Н.В. Рогова, Д.О. Михайлова // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2010. – № 1 (33). – С. 28-32.
2. Федеральный регистр больных сахарным диабетом [Электронный ресурс]. – URL: <https://sd.diaregistry.ru/> (дата обращения: 27.05.2021).
3. Фундаментальные основы поиска лекарственных средств для терапии сахарного диабета 2-го типа / А.А. Спасов [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. – Т. 68. – № 2. – С. 43-49.
4. A family of human cdc2-related protein kinases. / M. Meyerson [и др.] // The EMBO journal. – 1992. – Т. 11. – № 8. – С. 2909-17.
5. A Novel Phenylchromane Derivative Increases the Rate of Glucose Uptake in L6 Myotubes and Augments Insulin Secretion from Pancreatic Beta-Cells by Activating AMPK / N. Rozentul [и др.] // Pharmaceutical Research. – 2017. – С. 1-18.
6. A Phase II Trial of Tideglusib in Alzheimer's Disease / S. Lovestone [и др.] // Journal of Alzheimer's Disease. – 2015. – Т. 45. – № 1. – С. 75-88.
7. A potent and selective AMPK activator that inhibits de novo lipogenesis / J.E. Gómez-Galeno [и др.] // ACS Medicinal Chemistry Letters. – 2010. – Т. 1. – № 9. – С. 478-482.
8. A769662, a novel activator of AMP-activated protein kinase, inhibits non-proteolytic components of the 26S proteasome by an AMPK-independent mechanism / D. Moreno [и др.] // FEBS Letters. – 2008. – Т. 582. – № 17. – С. 2650-2654.
9. Acid F. AMPK Signaling: The fuel sensor and regulator / F. Acid, F. Acid, F. Acid. – 2011. – С. 2011.
10. Activation of AMPK inhibits inflammation in MRL/lpr mouse mesangial cells / A. Peairs [и др.] // Clinical and Experimental Immunology. – 2009. – Т. 156. – № 3. – С. 542-551.
11. Activation of Skeletal Muscle AMPK Promotes Glucose Disposal and Glucose Lowering in Non-human Primates and Mice Article Activation of Skeletal Muscle AMPK Promotes Glucose Disposal and Glucose Lowering in Non-human Primates and Mice / E.C. Cokorinos [и др.] // Cell Metabolism. – 2017. – Т. 25. – № 5. – С. 1147-1159.e10.
12. Actuate Therapeutics Inc. Phase 1/2 Study of 9-ING-41, a Glycogen Synthase Kinase-3 Beta (GSK-3 β) Inhibitor, as a Single Agent and Combined With Chemotherapy, in Patients With Refractory Hematologic Malignancies or Solid Tumors. 9-ING-41 in Patients With Advanced Cancers / Actuate Therapeutics Inc. – clinicaltrials.gov, 2021.

13. Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate in Vivo and in Vitro Insulin Sensitivity / W. Ying [и др.] // *Cell*. – 2017. – Т. 171. – № 2. – С. 372-384.e12.
14. ADMETlab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. / J. Dong [и др.] // *Journal of cheminformatics*. – 2018. – Т. 10. – № 1. – С. 29.
15. admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties / H. Yang [и др.] // *Bioinformatics*. – 2019. – Т. 35. – № 6. – С. 1067-1069.
16. ADP-Glo Kinase Assay // Promega Corporation. – 2011. – С. 22.
17. Agius L. Lessons from glucokinase activators: the problem of declining efficacy. / L. Agius // *Expert opinion on therapeutic patents*. – 2014. – Т. 24. – № 11. – С. 1155-1159.
18. Ajala O.N. Glucokinase mutation—a rare cause of recurrent hypoglycemia in adults: a case report and literature review / O.N. Ajala, D.M. Huffman, I.I. Ghobrial // *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives*. – 2016. – Т. 6. – Glucokinase mutation—a rare cause of recurrent hypoglycemia in adults. – № 5.
19. Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B. / C. Wiesmann [и др.] // *Nat Struct Mol Biol*. – 2004. – Т. 11. – № 8. – С. 730-737.
20. Ambient fine particles (PM_{2.5}) attenuate collagen-induced platelet activation through interference of the PLC γ 2/Akt/GSK3 β signaling pathway / Z. Yin [и др.] // *Environmental Toxicology*. – 2017. – Т. 32. – № 2. – С. 530-540.
21. AMPK activation by A-769662 controls IL-6 expression in inflammatory arthritis / M. Guma [и др.] // *PLoS ONE*. – 2015. – Т. 10. – № 10. – С. 1-13.
22. AMPK regulates immunometabolism in sepsis / J. Huang [и др.] // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2018. – Т. 72. – С. 89-100.
23. An Aggregation Advisor for Ligand Discovery / J.J. Irwin [и др.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2015. – Т. 58. – № 17. – С. 7076-7087.
24. Anti-diabetic efficacy of KICG1338, a novel glycogen synthase kinase-3 β inhibitor, and its molecular characterization in animal models of type 2 diabetes and insulin resistance / K. Min [и др.] // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2015. – Т. 409. – С. 1-10.
25. Appari M. Metabolic Regulation of Adipose Tissue Macrophage Function in Obesity and Diabetes / M. Appari, K.M. Channon, E. McNeill // *Antioxidants and Redox Signaling*. – 2018. – Т. 29. – № 3. – С. 297-312.
26. Approaches to target tractability assessment—a practical perspective / K.K. Brown [и др.] // *MedChemComm*. – 2018. – Т. 9. – № 4. – С. 606-613.
27. Arulmozhi V. Chemoinformatics — A quick review / V. Arulmozhi, R. Rajesh // *2011 3rd International Conference on Electronics Computer Technology*. – 2011. – Т. 6. – С. 416-419.

28. Asymptomatic Congenital Hyperinsulinism due to a Glucokinase-Activating Mutation, Treated as Adrenal Insufficiency for Twelve Years / K. Morishita [и др.] // *Case Reports in Endocrinology*. – 2017. – Т. 2017.
29. Autoimmune aspects of type 2 diabetes mellitus - A mini-review / B.K. Itariu [и др.] // *Gerontology*. – 2014. – Т. 60. – № 3. – С. 189-196.
30. Baell J.B. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays / J.B. Baell, G.A. Holloway // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2010. – Т. 53. – № 7. – С. 2719-2740.
31. Baell J.B. Observations on screening-based research and some concerning trends in the literature / J.B. Baell // *Future Medicinal Chemistry*. – 2010. – Т. 2. – № 10. – С. 1529-1546.
32. Bajusz D. Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? / D. Bajusz, A. Rácz, K. Héberger // *Journal of Cheminformatics*. – 2015. – Т. 7. – № 1. – С. 20.
33. Baribault H. Mouse Models for Drug Discovery : Methods in Molecular Biology / H. Baribault. – 2010. – Т. 602. – С. 135-155.
34. Bemis G.W. The Properties of Known Drugs. 1. Molecular Frameworks / G.W. Bemis, M.A. Murcko // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1996. – Т. 39. – № 15. – С. 2887-2893.
35. Bener A. Genetics, obesity, and environmental risk factors associated with type 2 diabetes / A. Bener, M. Ziric, A. Al-Rikabi // *Croat Med J*. – 2005. – Т. 46. – № 2. – С. 302-307.
36. Bioactivity-explorer: a web application for interactive visualization and exploration of bioactivity data / L. Liang [и др.] // *Journal of Cheminformatics*. – 2019. – Т. 11. – Bioactivity-explorer. – № 1. – С. 47.
37. Boland B.B. The dynamic plasticity of insulin production in β -cells / B.B. Boland, C.J. Rhodes, J.S. Grimsby // *Molecular Metabolism*. – 2017. – Т. 6. – № 9. – С. 958-973.
38. Böyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. / A. Böyum // *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum*. – 1968. – Т. 97. – С. 7.
39. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. / M. Brownlee // *Diabetes*. – 2005. – Т. 54. – № 6. – С. 1615-25.
40. Bruns R.F. Rules for Identifying Potentially Reactive or Promiscuous Compounds / R.F. Bruns, I.A. Watson // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2012. – Т. 55. – № 22. – С. 9763-9772.
41. Budman D. A Phase I Study of the Safety and Tolerability of Single Agent MSI-1436C in Metastatic Breast Cancer Patients. Safety and Tolerability of MSI-1436C in Metastatic Breast Cancer / D. Budman. – clinicaltrials.gov, 2018.

42. Burkey B.F. Acute and Chronic Effects of the Incretin Enhancer Vildagliptin in Insulin-Resistant Rats / B.F. Burkey // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2005. – Т. 315. – № 2. – С. 688-695.
43. Cade W.T. Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting / W.T. Cade. – 2008.
44. Canagliflozin: from glycemic control to improvement of cardiovascular and renal prognosis in patients with type 2 diabetes mellitus. Resolution of Advisory Board / M.V. Shestakova [и др.] // *Diabetes mellitus*. – 2022. – Т. 24. – Canagliflozin. – № 5. – С. 479-486.
45. Cerf M.E. Beta cell dysfunction and insulin resistance / M.E. Cerf // *Frontiers in Endocrinology*. – 2013. – Т. 4. – № MAR. – С. 1-12.
46. Chaudhary S. Consensus Recommendations on Sulfonylurea and Sulfonylurea Combinations in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus – International Task Force / S. Chaudhary // *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. – 2018. – Т. 22.
47. ChEMBL: towards direct deposition of bioassay data / D. Mendez [и др.] // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Т. 47. – ChEMBL. – № D1. – С. D930-D940.
48. ChEMBL web services: streamlining access to drug discovery data and utilities / M. Davies [и др.] // *Nucleic Acids Research*. – 2015. – Т. 43. – ChEMBL web services. – № Web Server issue. – С. W612-W620.
49. Cho H. Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) And Obesity. Т. 91 / H. Cho. – 1. – Elsevier Inc., 2013. – 405-424 с.
50. Christ A. The Western lifestyle has lasting effects on metaflammation / A. Christ, E. Latz // *Nature Reviews Immunology*. – 2019. – Т. 19. – № 5. – С. 267-268.
51. Clark A.M. 2D depiction of fragment hierarchies / A.M. Clark // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2010. – Т. 50. – № 1. – С. 37-46.
52. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening / K. Srinivasan [и др.] // *Pharmacological Research*. – 2005. – Т. 52. – № 4. – С. 313-320.
53. Conditional ablation of Gsk-3 β in islet beta cells results in expanded mass and resistance to fat feeding-induced diabetes in mice / Y. Liu [и др.] // *Diabetologia*. – 2010. – Т. 53. – № 12. – С. 2600-2610.
54. Control of pancreatic β cell regeneration by glucose metabolism / S. Porat [и др.] // *Cell Metabolism*. – 2011. – Т. 13. – № 4. – С. 440-449.
55. Dahlin J.L. Mitigating risk in academic preclinical drug discovery / J.L. Dahlin, J. Inglese, M.A. Walters // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2015. – Т. 14. – № 4. – С. 279-294.

56. Daniell C. Effects of High-Fat Diet and Ethanol on Cognition and Behavior in Mice / C. Daniell, S. Bartlett, J.A. Siegel // *Journal of Young Investigators*. – 2013. – Т. 25. – № 7. – С. 96-100.
57. DataWarrior: An open-source program for chemistry aware data visualization and analysis / T. Sander [и др.] // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2015. – Т. 55. – № 2. – С. 460-473.
58. Decision Making in Structure-Based Drug Discovery: Visual Inspection of Docking Results / A. Fischer [и др.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2021. – Т. 64. – Decision Making in Structure-Based Drug Discovery. – № 5. – С. 2489-2500.
59. Diabetes epidemiology in Russia: what has changed over the decade? / M.V. Shestakova [и др.] // *Terapevticheskii arkhiv*. – 2019. – Т. 91. – Diabetes epidemiology in Russia. – № 10. – С. 4-13.
60. Diabetes mellitus and thrombosis / N. Vazzana [и др.]. – 2012.
61. Diabetes mellitus as an economic problem in Russian Federation / I.I. Dedov [и др.] // *Diabetes Mellitus*. – 2016. – Т. 19. – № 1. – С. 30-43.
62. Diabetes mellitus in Russian Federation: Prevalence, morbidity, mortality, parameters of glycaemic control and structure of glucose lowering therapy according to the federal diabetes register, status 2017 / I.I. Dedov [и др.] // *Diabetes Mellitus*. – 2018. – Т. 21. – № 3. – С. 144-159.
63. Diabetes mellitus type 2 in adults / I.I. Dedov [и др.] // *Diabetes mellitus*. – 2020. – Т. 23. – № 2S. – С. 4-102.
64. Dicker D. DPP-4 Inhibitors: Impact on glycemic control and cardiovascular risk factors / D. Dicker // *Diabetes Care*. – 2011. – Т. 34. – № SUPPL. 2. – С. 276-278.
65. Diet-induced obesity attenuates endotoxin-induced cognitive deficits / S.E. Setti [и др.] // *Physiology and Behavior*. – 2015. – Т. 141. – С. 1-8.
66. Discovery of novel 2-(pyridine-2-yl)-1H-benzimidazole derivatives as potent glucokinase activators / M. Ishikawa [и др.] // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2009. – Т. 19. – № 15. – С. 4450-4454.
67. Effect of long-term treatment with a small-molecule glucokinase activator on glucose metabolism, lipid profiles and hepatic function / A. Nakamura [и др.] // *Journal of Diabetes Investigation*. – 2011. – Т. 2. – № 4. – С. 276-279.
68. Effects of a novel glycogen synthase kinase-3 inhibitor on insulin-stimulated glucose metabolism in Zucker diabetic fatty (falfa) rats / G.W. Cline [и др.] // *Diabetes*. – 2002. – Т. 51. – № 10. – С. 2903-2910.
69. Effects of glucokinase activators GKA50 and LY2121260 on proliferation and apoptosis in pancreatic INS-1 beta cells / P. Wei [и др.] // *Diabetologia*. – 2009. – Т. 52. – № 10. – С. 2142-2150.

70. Effects of Rosiglitazone, Glyburide, and Metformin on β -Cell Function and Insulin Sensitivity in ADOPT / S.E. Kahn [и др.] // *Diabetes*. – 2011. – Т. 60. – № 5. – С. 1552-1560.
71. Engel T. Basic Overview of Chemoinformatics / T. Engel // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2006. – Т. 46. – № 6. – С. 2267-2277.
72. Enhanced glycogen synthase kinase-3 β activity mediates podocyte apoptosis under diabetic conditions / J. Paeng [и др.] // *Apoptosis*. – 2014. – Т. 19. – № 12. – С. 1678-1690.
73. Estevez B. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling / B. Estevez, X. Du // *Physiology*. – 2017. – Т. 32. – № 2. – С. 162-177.
74. Failure to Reach Target Glycated A1c Levels Among Patients with Diabetes Who Are Adherent to Their Antidiabetic Medication / D.T. Juarez [и др.] // *Population Health Management*. – 2014. – Т. 17. – № 4. – С. 218-223.
75. Fonseca S.G. Endoplasmic reticulum stress and pancreatic beta cell death / S.G. Fonseca, J. Gromada, F. Urano // *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. – 2011. – Т. 22. – № 7. – С. 266-274.
76. Foretz M. Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus / M. Foretz, B. Guigas, B. Viollet // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2019.
77. Frontoni S. Impact of Drugs on Diabetes Risk and Glycemic Control / S. Frontoni, F. Picconi // *Diabetes Complications, Comorbidities and Related Disorders : Endocrinology* / ред. E. Bonora, R.A. DeFronzo. – Cham: Springer International Publishing, 2018. – С. 541-573.
78. Furan-2-ylmethylene Thiazolidinediones as Novel, Potent, and Selective Inhibitors of Phosphoinositide 3-Kinase γ | *Journal of Medicinal Chemistry* [Электронный ресурс]. – URL: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm0601598> (дата обращения: 12.05.2021).
79. Genaera Corporation. A Phase I, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Ascending IV Multiple Dose Tolerance and Pharmacokinetic Study of Trodusquemine (MSI-1436) in Obese or Overweight Type 2 Diabetic Volunteers. An Ascending Multi-Dose, Tolerance and Pharmacokinetic Study in Obese or Overweight Type 2 Diabetic Volunteers / Genaera Corporation. – clinicaltrials.gov, 2009.
80. Genaera Corporation. A Phase I, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Ascending IV Single-Dose Tolerance and Pharmacokinetic Study of Trodusquemine in Healthy Volunteers. A Tolerance and Pharmacokinetic Study of Trodusquemine in Healthy Volunteers / Genaera Corporation. – clinicaltrials.gov, 2008.
81. Genaera Corporation. A Phase I, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Ascending IV Single-Dose Tolerance and Pharmacokinetic Study of Trodusquemine (MSI-1436) in Obese Type 2 Diabetics. A Single Dose, Tolerance and Pharmacokinetic Study in Obese or Overweight Type 2 Diabetic Volunteers / Genaera Corporation. – clinicaltrials.gov, 2009.

82. Gleeson M.P. Generation of a Set of Simple, Interpretable ADMET Rules of Thumb / M.P. Gleeson // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2008. – Т. 51. – № 4. – С. 817-834.
83. Glucose and aging control the quiescence period that follows pancreatic beta cell replication. / S.J. Salpeter [и др.] // *Development (Cambridge, England)*. – 2010. – Т. 137. – № 19. – С. 3205-3213.
84. Glycemic Durability of Rosiglitazone, Metformin, or Glyburide Monotherapy / S.E. Kahn [и др.] // *New England Journal of Medicine*. – 2006. – Т. 355. – № 23. – С. 2427-2443.
85. Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors as new promising drugs for diabetes, neurodegeneration, cancer, and inflammation / A. Martinez [и др.] // *Medicinal Research Reviews*. – 2002. – Т. 22. – № 4. – С. 373-384.
86. Glycogen Synthase Kinase 3 β Modulates the Inflammatory Response Activated by Bacteria, Viruses, and Parasites / R. Cortés-Vieyra [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Т. 12. – С. 1487.
87. Goh S.Y. The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes / S.Y. Goh, M.E. Cooper. – 2008.
88. Goldstein B.J. Protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B): a novel therapeutic target for type 2 diabetes mellitus, obesity and related states of insulin resistance. / B.J. Goldstein // *Current drug targets. Immune, endocrine and metabolic disorders*. – 2001. – Т. 1. – № 3. – С. 265-75.
89. Goodman M. AMPK Activators as a Drug for Diabetes, Cancer and Cardiovascular Disease / M. Goodman // *Pharmaceutical Regulatory Affairs: Open Access*. – 2014. – Т. 03. – № 02. – С. 2-7.
90. GSK3 β Kinase Assay / J. Vidugiriene [и др.] // *Promega Corporation*. – 2015. – С. 2-3.
91. Haeusler R.A. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling / R.A. Haeusler, T.E. McGraw, D. Accili // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2017.
92. Hardie D.G. AMPK: Positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis / D.G. Hardie // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2015. – Т. 33. – С. 1-7.
93. He L. Metformin action: Concentrations matter / L. He, F.E. Wondisford // *Cell Metabolism*. – 2015. – Т. 21. – № 2. – С. 159-162.
94. Hematopoietic AMPK β 1 reduces mouse adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in obesity / S. Galic [и др.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 2011. – Т. 121. – № 12. – С. 4903-4915.
95. Hepatic Glucokinase Expression Is Associated with Lipogenesis and Fatty Liver in Humans / A. Peter [и др.] // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2011. – Т. 96. – № 7. – С. E1126-E1130.

96. Herzig S. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis / S. Herzig, R.J. Shaw // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2017. – Т. 19. – № 2. – С. 121-135.
97. Hirsch I.B. Using Insulin to Treat Poorly Controlled Type 2 Diabetes in 2020 / I.B. Hirsch, L.M. Gaudiani // *JAMA*. – 2020. – Т. 323. – № 23. – С. 2419-2420.
98. Hit Dexter 2.0: Machine-Learning Models for the Prediction of Frequent Hitters / C. Stork [и др.] // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2019. – Т. 59. – Hit Dexter 2.0. – № 3. – С. 1030-1043.
99. Hotamisligil G.S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders / G.S. Hotamisligil // *Nature*. – 2017. – Т. 542. – № 7640. – С. 177-185.
100. How Beyond Rule of 5 Drugs and Clinical Candidates Bind to Their Targets / B.C. Doak [и др.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2016. – Т. 59. – № 6. – С. 2312-2327.
101. <http://betagenon.se/wp-content/uploads/2017/04/Betagenon-O304-2016.pdf>.
102. Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome / B. Cool [и др.] // *Cell Metabolism*. – 2006. – Т. 3. – № 6. – С. 403-416.
103. Identification of functional angiotensin II receptors on rat cardiac fibroblasts. / F.J. Villarreal [и др.] // *Circulation*. – 1993. – Т. 88. – № 6. – С. 2849-2861.
104. IDF Diabetes Atlas. Ninth edition. – International Diabetes Federation, 2019.
105. Imeglimin: A Potential New Multi-Target Drug for Type 2 Diabetes / V. Vuylsteke [и др.] // *Drugs in R and D*. – 2015. – Т. 15. – № 3. – С. 227-232.
106. Improving target assessment in biomedical research: the GOT-IT recommendations / C.H. Emmerich [и др.] // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2021. – Т. 20. – № 1. – С. 64-81.
107. In vitro enzymatic assays of protein tyrosine phosphatase 1B. / T. Lubben [и др.] // *Current protocols in pharmacology / editorial board, S.J. Enna (editor-in-chief) ... [et al.]*. – 2001. – Т. Chapter 3. – С. Unit3.8.
108. Influence of novel GPR119 agonist in combination with metformin and sitagliptin on glycemia, body weight and food intake in rats fed a high-fat diet / I.N. Tyurenkov [и др.] // *Obesity and metabolism*. – 2019. – Т. 16. – № 3. – С. 46-54.
109. Inhibiting Glycogen Synthase Kinase 3 Reverses Obesity-Induced White Adipose Tissue Inflammation by Regulating Apoptosis Inhibitor of Macrophage/CD5L-Mediated Macrophage Migration / L. Wang [и др.] // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2018. – Т. 38. – № 9. – С. 2103-2116.
110. Inhibition of GSK3 promotes replication and survival of pancreatic beta cells / R. Mussmann [и др.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Т. 282. – № 16. – С. 12030-12037.

111. Inhibition of GSK-3 selectively reduces glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression / P.A. Lochhead [и др.] // *Diabetes*. – 2001. – Т. 50. – № 5. – С. 937-946.
112. Inhibition of PTP1B by trodusquemine (MSI-1436) causes fat-specific weight loss in diet-induced obese mice / K.A. Lantz [и др.] // *Obesity*. – 2010. – Т. 18. – № 8. – С. 1516-1523.
113. Johnson T.W. Lipophilic Efficiency as an Important Metric in Drug Design / T.W. Johnson, R.A. Gallego, M.P. Edwards // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2018. – Т. 61. – № 15. – С. 6401-6420.
114. Jope R.S. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Inflammation, Diseases, and Therapeutics / R.S. Jope, C.J. Yuskaitis, E. Beurel // *Neurochemical research*. – 2007. – Т. 32. – Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3). – № 4-5. – С. 577-595.
115. Kinase Assay / B.K. Hsiao [и др.] // *Technical Manual #TM313 or TM343*). – 2004. – С. 1-2.
116. Koren S. Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: potential therapy for obesity, insulin resistance and type-2 diabetes mellitus. / S. Koren, I.G. Fantus // *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*. – 2007. – Т. 21. – № 4. – С. 621-640.
117. Krentz A.J. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. / A.J. Krentz, C.J. Bailey // *Drugs*. – 2005. – Т. 65. – № 3. – С. 385-411.
118. Kumar A. Advances in the Development of Shape Similarity Methods and Their Application in Drug Discovery / A. Kumar, K.Y.J. Zhang // *Frontiers in Chemistry*. – 2018. – Т. 6.
119. Lee H. Effect of Metformin on Metabolic Improvement and Gut Microbiota / H. Lee // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2014. – Т. 80. – № 19. – С. 5935-5943.
120. Leighton B. Small molecule glucokinase activators as novel anti-diabetic agents / B. Leighton, A. Atkinson, M.P.P. Coghlan // *Biochemical Society Transactions*. – 2005. – Т. 33. – № 2. – С. 371-374.
121. Liver-Specific Deletion of Protein-Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Improves Metabolic Syndrome and Attenuates Diet-Induced Endoplasmic Reticulum Stress / M. Delibegovic [и др.] // *Diabetes*. – 2009. – Т. 58. – № 3. – С. 590-599.
122. Liver-specific Protein-tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Re-expression Alters Glucose Homeostasis of PTP1B^{-/-}Mice / F.G. Haj [и др.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Т. 280. – № 15. – С. 15038-15046.
123. López-López E. DataWarrior: an evaluation of the open-source drug discovery tool / E. López-López, J.J. Naveja, J.L. Medina-Franco // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – 2019. – Т. 14. – DataWarrior. – № 4. – С. 335-341.

124. Ma C. Compound Acquisition and Prioritization Algorithm for Constructing Structurally Diverse Compound Libraries / C. Ma, J.S. Lazo, X.-Q. Xie // *ACS Combinatorial Science*. – 2011. – Т. 13. – № 3. – С. 223-231.
125. Makowski L. Immunometabolism: From basic mechanisms to translation / L. Makowski, M. Chaib, J.C. Rathmell // *Immunological Reviews*. – 2020. – Т. 295. – № 1. – С. 5-14.
126. Martin Y.C. Do structurally similar molecules have similar biological activity? / Y.C. Martin, J.L. Kofron, L.M. Traphagen // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2002. – Т. 45. – № 19. – С. 4350-4358.
127. Mechanisms of Macrophage Polarization in Insulin Signaling and Sensitivity / L. Orliaguet [и др.] // *Frontiers in Endocrinology*. – 2020. – Т. 11. – С. 62.
128. Merz K.M. Drug Design: Structure- and Ligand-Based Approaches / K.M. Merz, D. Ringe, C.H. Reynolds. – Cambridge University Press, 2010. – 286 с.
129. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug / H. Wu [и др.] // *Nature Medicine*. – 2017. – № May.
130. Metformin as an archetype immuno-metabolic adjuvant for cancer immunotherapy / S. Verdura [и др.] // *OncoImmunology*. – 2019. – Т. 8. – № 10. – С. 1-10.
131. Metformin Inhibits Advanced Glycation End Products-Induced Inflammatory Response in Murine Macrophages Partly through AMPK Activation and RAGE/NF κ B Pathway Suppression / Z. Zhou [и др.] // *Journal of Diabetes Research*. – 2016. – Т. 2016. – С. 1-10.
132. Microdose Lithium Protects against Pancreatic Islet Destruction and Renal Impairment in Streptozotocin-Elicited Diabetes / J. Zhang [и др.] // *Antioxidants*. – 2021. – Т. 10. – № 1. – С. 138.
133. Modulation of LPS-induced inflammatory cytokine production by a novel glycogen synthase kinase-3 inhibitor / M.S. Noori [и др.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2020. – Т. 883. – № July. – С. 173340.
134. Mokhtari D. Potential utility of small tyrosine kinase inhibitors in the treatment of diabetes / D. Mokhtari, N. Welsh // *Clinical Science*. – 2010. – Т. 118. – № 4. – С. 241-247.
135. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases / A. Cavalli [и др.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2008. – Т. 51. – № 3. – С. 347-372.
136. Nadkarni P. Regulation of glucose homeostasis by GLP-1. T. 121 / P. Nadkarni, O.G. Chepurny, G.G. Holz. – 1. – Elsevier Inc., 2014. – 23–65 с.
137. Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action / K.K. Bence [и др.] // *Nature Medicine*. – 2006. – Т. 12. – № 8. – С. 917-924.
138. Nilakantan R. A novel approach to combinatorial library design / R. Nilakantan, F. Immermann, K. Haraki // *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*. – 2002. – Т. 5. – № 2. – С. 105-110.

139. Nir T. Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration. / T. Nir, D. a Melton, Y. Dor // *The Journal of clinical investigation*. – 2007. – Т. 117. – № 9. – С. 2553-2561.
140. Novel oxindole derivatives prevent oxidative stress-induced cell death in mouse hippocampal HT22 cells / Y. Hirata [и др.] // *Neuropharmacology*. – 2018.
141. NSC-87877, inhibitor of SHP-1/2 PTPs, inhibits dual-specificity phosphatase 26 (DUSP26) / M. Song [и др.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2009. – Т. 381. – № 4. – С. 491-495.
142. O 304 - AdisInsight [Электронный ресурс]. – URL: <https://adisinsight.springer.com/drugs/800035145> (дата обращения: 23.04.2021).
143. OECD. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method / OECD. – 2002.
144. Olivier S. Promise and challenges for direct small molecule AMPK activators / S. Olivier, M. Foretz, B. Viollet // *Biochemical Pharmacology*. – 2018. – Т. 153. – № January. – С. 147-158.
145. O'Neill L.A.J. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation / L.A.J. O'Neill, D. Grahame Hardie // *Nature*. – 2013. – Т. 493. – № 7432. – С. 346-355.
146. Open Targets Platform [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.targetvalidation.org/> (дата обращения: 24.04.2021).
147. Open Targets Platform: New developments and updates two years on / D. Carvalho-Silva [и др.] // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Т. 47. – № D1. – С. D1056-D1065.
148. Open Targets Platform: supporting systematic drug–target identification and prioritisation / D. Ochoa [и др.] // *Nucleic Acids Research*. – 2021. – Т. 49. – Open Targets Platform. – № D1. – С. D1302-D1310.
149. Overexpression of a glucokinase point mutant in the treatment of diabetes mellitus / G. Lu [и др.] // *Gene Therapy*. – 2016. – Т. 23. – № 4. – С. 323-329.
150. PAINS in the assay: Chemical mechanisms of assay interference and promiscuous enzymatic inhibition observed during a sulfhydryl-scavenging HTS / J.L. Dahlin [и др.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2015. – Т. 58. – № 5. – С. 2091-2113.
151. PAN-AMPK activator O304 improves glucose homeostasis and microvascular perfusion in mice and type 2 diabetes patients / H. Edlund [и др.] // *JCI Insight*. – 2018. – Т. 3. – № 12. – С. 1-19.
152. Pancreatic beta cells in very old mice retain capacity for compensatory proliferation / M. Stolovich-Rain [и др.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Т. 287. – № 33. – С. 27407-27414.
153. Patel D.S. Selectivity criterion for pyrazolo[3,4-b]pyrid[az]ine derivatives as GSK-3 inhibitors: CoMFA and molecular docking studies / D.S. Patel, P.V. Bharatam // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2008. – Т. 43. – № 5. – С. 949-957.
154. Pathogenesis of Macrovascular Complications in Diabetes / S.P. Gray [и др.] // *Textbook of Diabetes*. – Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2016. – С. 599-628.

155. Peripheral white blood cell toxicity induced by broad spectrum cyclin-dependent kinase inhibitors / B.A. Jessen [и др.] // *Journal of Applied Toxicology*. – 2007. – Т. 27. – № 2. – С. 133-142.
156. Phenotypic Correction of Diabetic Mice by Adenovirus-Mediated Glucokinase Expression / U.J. Desai [и др.] // *Diabetes*. – 2001. – Т. 50. – № 10. – С. 2287-2295.
157. Pioglitazone for Diabetes Prevention in Impaired Glucose Tolerance / R.A. DeFronzo [и др.] // *New England Journal of Medicine*. – 2011. – Т. 364. – № 12. – С. 1104-1115.
158. Posner B.A. Enhanced HTS hit selection via a local hit rate analysis / B.A. Posner, H. Xi, J.E.J. Mills // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2009. – Т. 49. – № 10. – С. 2202-2210.
159. Poxel SA. A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Parallel Group Trial to Assess the Efficacy and Safety of PXL770 Versus Placebo After 12 Weeks of Treatment in Patients With NAFLD. A Study of the Efficacy and Safety of PXL770 Versus Placebo After 12 Weeks of Treatment in Patients With NAFLD / Poxel SA. – clinicaltrials.gov, 2020.
160. Proschak E. Polypharmacology by Design: A Medicinal Chemist's Perspective on Multitargeting Compounds / E. Proschak, H. Stark, D. Merk // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2018. – Т. 62. – С. 420-444.
161. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals / P. Banerjee [и др.] // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – Т. 46. – № W1. – С. W257-W263.
162. Pyridoxine dipharmacophore derivatives as potent glucokinase activators for the treatment of type 2 diabetes mellitus / M.S. Dzyurkevich [и др.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Т. 7. – № 1. – С. 16072.
163. Pyrrolo[2,3-c]azepine derivatives: a new class of potent protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors. / J. Xie [и др.] // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2011. – Т. 21. – № 14. – С. 4306-9.
164. Rana S. Small Molecule Adenosine 5'-Monophosphate Activated Protein Kinase (AMPK) Modulators and Human Diseases / S. Rana, E.C. Blowers, A. Natarajan // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2015. – Т. 58. – № 1. – С. 2-29.
165. Reddy M.A. Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory / M.A. Reddy, E. Zhang, R. Natarajan. – 2015.
166. Reduced oxidative capacity in macrophages results in systemic insulin resistance / S. Jung [и др.] // *Nature Communications*. – 2018. – Т. 9. – № 1. – С. 1551.
167. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin // *The New England journal of medicine*. – 2002. – Т. 346. – № 6. – С. 393-403.
168. Rees M.G. Small molecular glucokinase activators: Has another new anti-diabetic therapeutic lost favour? / M.G. Rees, A.L. Gloyn // *British Journal of Pharmacology*. – 2013. – Т. 168. – № 2. – С. 335-338.

169. Röhrborn D. DPP4 in diabetes / D. Röhrborn, N. Wronkowitz, J. Eckel // *Frontiers in Immunology*. – 2015. – Т. 6. – № JUL. – С. 1-20.
170. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action / G. Zhou [и др.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 2001. – Т. 108. – № 8. – С. 1167-1174.
171. Saisho Y. An emerging new concept for the management of type 2 diabetes with a paradigm shift from the glucose-centric to beta cell-centric concept of diabetes - an Asian perspective / Y. Saisho // *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. – 2020. – Т. 21. – № 13. – С. 1565-1578.
172. Salidroside inhibits platelet function and thrombus formation through AKT / GSK3 β signaling pathway / G. Wei [и др.]. – 2020. – Т. 12. – № 9. – С. 8151-8166.
173. Santos J.M. Dos. The role of oxidative stress in the development of diabetes mellitus and its complications / J.M. Dos Santos, S. Tewari, R.H. Mendes // *Journal of Diabetes Research*. – 2019.
174. Scarpino A. Covalent Docking in Drug Discovery: Scope and Limitations / A. Scarpino, G.G. Ferenczy, G.M. Keserű // *Current Pharmaceutical Design*. – 2020. – Т. 26. – Covalent Docking in Drug Discovery. – № 44. – С. 5684-5699.
175. Selective Activation of AMPK β 1-Containing Isoforms Improves Kidney Function in a Rat Model of Diabetic Nephropathy / C.T. Salatto [и др.] // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2017. – Т. 361. – № 2. – С. 303-311.
176. Selective Activation of AMPK β 1 -containing Isoforms Improves Kidney Function in a Rat Model of Diabetic Nephropathy / C.T. Salatto [и др.]. – 2017. – Т. 02139.
177. Selective Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibitors Potentiate Insulin Activation of Glucose Transport and Utilization In Vitro and In Vivo / D.B. Ring [и др.] // *Diabetes*. – 2003. – Т. 52. – № 3. – С. 588-595.
178. Shpakov A.O. Functional Activity of the Insulin Signaling System of the Brain in Health and Type 2 Diabetes Mellitus / A.O. Shpakov // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2017. – Т. 47. – № 2. – С. 190-203.
179. Steinberg G.R. AMP-activated protein kinase: the current landscape for drug development / G.R. Steinberg, D. Carling // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2019.
180. Stratton I.M. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study / I.M. Stratton // *BMJ*. – 2000. – Т. 321. – Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35). – № 7258. – С. 405-412.
181. Structure-based design of benzo[e]isoindole-1,3-dione derivatives as selective GSK-3 β inhibitors to activate Wnt/ β -catenin pathway / H. Yue [и др.] // *Bioorganic Chemistry*. – 2015. – Т. 61. – С. 21-27.

182. Surviving in the Valley of Death: Opportunities and Challenges in Translating Academic Drug Discoveries / M.C. Parrish [и др.] // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. – 2018. – Т. 59. – № 1. – С. 405-421.
183. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules | *Scientific Reports* [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.nature.com/articles/srep42717> (дата обращения: 05.08.2021).
184. Synthesis and biological evaluation of 3-substituted 2-oxindole derivatives as new glycogen synthase kinase 3 β inhibitors / N.A. Lozinskaya [и др.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2019. – Т. 27. – № 9. – С. 1804-1817.
185. Systemic pan-AMPK activator MK-8722 improves glucose homeostasis but induces cardiac hypertrophy / M. van Heek [и др.] // *Science*. – 2017. – Т. 357. – № 6350. – С. 507-511.
186. Systemic pan-AMPK activator MK-8722 improves glucose homeostasis but induces cardiac hypertrophy / R.W. Myers [и др.] // *Science*. – 2017. – Т. 357. – № 6350. – С. 507-511.
187. Tahrani A.A. Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus / A.A. Tahrani, A.H. Barnett, C.J. Bailey // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2016. – Т. 12. – № 10. – С. 566-592.
188. Targeting hepatic glucokinase to treat diabetes with TTP399, a hepatoselective glucokinase activator / A. Vella [и др.] // *Science Translational Medicine*. – 2019. – Т. 11. – № 475. – С. eaau3441.
189. Taylor R. Insulin resistance and type 2 diabetes / R. Taylor // *Diabetes*. – 2012. – Т. 61. – № 4. – С. 778-779.
190. Taylor S.D. Inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) / S.D. Taylor // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – 2003. – Т. 3. – № 7. – С. 759-782.
191. The Conundrum of GSK3 Inhibitors: Is it the Dawn of a New Beginning? / S. Andersson [и др.] // *Journal of Alzheimer's Disease*. – 2018. – Т. 64. – № s1. – С. S547-S554.
192. The design and optimization of a series of 2-(pyridin-2-yl)-1H-benzimidazole compounds as allosteric glucokinase activators / K. Takahashi [и др.] // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. – 2009. – Т. 17. – № 19. – С. 7042-7051.
193. The hepatoselective glucokinase activator PF-04991532 ameliorates hyperglycemia without causing hepatic steatosis in diabetic rats / D.M. Erion [и др.] // *PLoS ONE*. – 2014. – Т. 9. – № 5.
194. The ideal diabetes therapy: What will it look like? How close are we? / L.S. Rotenstein [и др.] // *Clinical Diabetes*. – 2012. – Т. 30. – № 2. – С. 44-53.
195. The impact of chemoinformatics on drug discovery in the pharmaceutical industry / K. Martinez-Mayorga [и др.] // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – 2020. – Т. 15. – № 3. – С. 293-306.

196. The scaffold tree - Visualization of the scaffold universe by hierarchical scaffold classification / A. Schuffenhauer [и др.] // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2007. – Т. 47. – № 1. – С. 47-58.
197. The TargetMine Data Warehouse: Enhancement and Updates / Y.A. Chen [и др.] // *Frontiers in Genetics*. – 2019. – Т. 10. – № October. – С. 1-9.
198. Therapeutic effects of the allosteric protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor KY-226 on experimental diabetes and obesity via enhancements in insulin and leptin signaling in mice / Y. Ito [и др.] // *Journal of Pharmacological Sciences*. – 2018. – Т. 137. – № 1. – С. 38-46.
199. Tkachuk V.A. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance Development / V.A. Tkachuk, A.V. Vorotnikov // *Diabetes mellitus*. – 2014. – Т. 17. – № 2. – С. 29.
200. TLR4 links innate immunity and fatty acid – induced insulin resistance / H. Shi [и др.] // *The journal of clinical investigation*. – 2006. – Т. 116. – № 11. – С. 3015-3025.
201. TMG-123, a novel glucokinase activator, exerts durable effects on hyperglycemia without increasing triglyceride in diabetic animal models / Y. Tsumura [и др.] // *PLoS ONE*. – 2017. – Т. 12. – № 2. – С. 1-16.
202. Towards multi-target antidiabetic agents: Discovery of biphenyl-benzimidazole conjugates as AMPK activators / D.A. Babkov [и др.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2019. – Т. 29. – № 17. – С. 2443-2447.
203. Towler M.C. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling / M.C. Towler, D.G. Hardie // *Circulation Research*. – 2007. – Т. 100. – № 3. – С. 328-341.
204. Tsai L.H. Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase. / L.H. Tsai, E. Harlow, M. Meyerson // *Nature*. – 1991. – Т. 353. – № 6340. – С. 174-7.
205. Two dose-ranging studies with PF-04937319, a systemic partial activator of glucokinase, as add-on therapy to metformin in adults with type 2 diabetes / N.B. Amin [и др.] // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. – 2015. – Т. 17. – № 8. – С. 751-759.
206. Two-Year Treatment With Metformin During Puberty Does Not Preserve β -Cell Function in Youth With Obesity / M.M. Kelsey [и др.] // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2021. – Т. 106. – № 7. – С. e2622-e2632.
207. UniProt [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P49841/entry#structure> (дата обращения: 19.07.2022).
208. Unique mechanistic insights into the beneficial effects of angiotensin-(1-7) on the prevention of cardiac fibrosis: A metabolomic analysis of primary cardiac fibroblasts / Y. Chen [и др.] // *Experimental Cell Research*. – 2019. – Т. 378. – № 2. – С. 158-170.

209. Wasserstein R.L. Moving to a World Beyond “ $p < 0.05$ ” / R.L. Wasserstein, A.L. Schirm, N.A. Lazar // *The American Statistician*. – 2019. – T. 73. – № sup1. – С. 1-19.
210. Wendler A. The translatability of animal models for clinical development: biomarkers and disease models / A. Wendler, M. Wehling // *Current Opinion in Pharmacology*. – 2010. – T. 10. – № 5. – С. 601-606.
211. What Do Medicinal Chemists Actually Make? A 50-Year Retrospective / W.P. Walters [и др.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2011. – T. 54. – What Do Medicinal Chemists Actually Make? – № 19. – С. 6405-6416.
212. What makes a good drug target? / I. Gashaw [и др.] // *Drug Discovery Today*. – 2011. – T. 16. – № 23-24. – С. 1037-1043.
213. Wilkens S.J. HierS: Hierarchical scaffold clustering using topological chemical graphs / S.J. Wilkens, J. Janes, A.I. Su // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2005. – T. 48. – HierS. – № 9. – С. 3182-3193.
214. Wysham C. Beta-cell failure in type 2 diabetes: mechanisms, markers, and clinical implications / C. Wysham, J. Shubrook // *Postgraduate Medicine*. – 2020. – T. 132. – Beta-cell failure in type 2 diabetes. – № 8. – С. 676-686.
215. Xu L. The Role of AMPK Pathway in Neuroprotection / L. Xu, J.D. Ash. – 2016. – С. 425-430.
216. Zdrzil B. The Rise and Fall of a Scaffold: A Trend Analysis of Scaffolds in the Medicinal Chemistry Literature / B. Zdrzil, R. Guha // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2018. – T. 61. – № 11. – С. 4688-4703.
217. Zhang. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. / Zhang, Chung, Oldenburg // *Journal of biomolecular screening*. – 1999. – T. 4. – № 2. – С. 67-73.
218. β -Cell Failure in Type 2 Diabetes: Postulated Mechanisms and Prospects for Prevention and Treatment / P.A. Halban [и др.] // *Diabetes Care*. – 2014. – T. 37. – β -Cell Failure in Type 2 Diabetes. – № 6. – С. 1751-1758.
219. 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle / E.J. Kurth-Kraczek [и др.] // *Diabetes*. – 1999. – T. 48. – № 8. – С. 1667-1671.
220. 9-ING-41, a small-molecule glycogen synthase kinase-3 inhibitor, is active in neuroblastoma / A.V. Ugolkov [и др.] // *Anti-Cancer Drugs*. – 2018. – С. 1.
221. 2019 Update to: Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD) / J.B. Buse [et al.] // *Diabetes Care*. – 2020. – Vol. 43. – 2019 Update to. – № 2. – P. 487-493.

222. Аметов А.С. Инсулинорезистентность и липотоксичность – две грани одной проблемы при сахарном диабете типа 2 и ожирении / А.С. Аметов, Е.А. Тертычная // Эндокринология: Новости. Мнения. Обучение. – 2019. – № 2 (27). – С. 25-33.
223. Глоссарий русскоязычных терминов в медицинской химии / О.Н. Зефирова [и др.] // Известия Академии Наук. Серия Химическая. – 2019. – № 12. – С. 2381-2395.
224. Дедов. Сахарный диабет: диагностика, лечение, профилактика / Дедов, Шестакова. – Москва: ООО «Издательство „Медицинское информационное агентство“», 2011. – 808 с.
225. Недогода С.В. Обращение К Читателям / С.В. Недогода // Российский Кардиологический Журнал. – 2020. – Т. 25. – № 4.
226. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / ред. А.Н. Миронов. – Гриф и К, 2012. – 944 с.
227. A call for a better understanding of causation in cell biology / M. Bizzarri [et al.] // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2019. – Vol. 20. – № 5. – P. 261-262.
228. A clinical trial to maintain glycemic control in youth with type 2 diabetes / TODAY Study Group [и др.] // The New England Journal of Medicine. – 2012. – Т. 366. – № 24. – С. 2247-2256.
229. A Common Mechanism Underlying Promiscuous Inhibitors from Virtual and High-Throughput Screening / S.L. McGovern [и др.] // Journal of Medicinal Chemistry. – 2002. – Т. 45. – № 8. – С. 1712-1722.
230. A comprehensive review on glucokinase activators: Promising agents for the treatment of Type 2 diabetes / R. Thilagavathi [et al.] // Chemical Biology & Drug Design. – 2022. – Vol. 99. – A comprehensive review on glucokinase activators. – № 2. – P. 247-263.
231. A novel mechanism of imeglimin-mediated insulin secretion via the cADPR-TRP channel pathway / S. Funazaki [et al.] // Journal of Diabetes Investigation. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 34-41.
232. Abnormal regulation of HGP by hyperglycemia in mice with a disrupted glucokinase allele / L. Rossetti [et al.] // American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. – 1997. – Vol. 273. – № 4. – P. E743-E750.
233. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial / J.-L. Chiasson [и др.] // Lancet (London, England). – 2002. – Т. 359. – Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus. – № 9323. – С. 2072-2077.
234. Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase Promotes Macrophage Polarization to an Anti-Inflammatory Functional Phenotype / D. Sag [et al.] // The Journal of Immunology. – 2008. – Vol. 181. – № 12. – P. 8633-8641.

235. ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties / G. Xiong [и др.] // *Nucleic Acids Research*. – 2021. – Т. 49. – ADMETlab 2.0. – № W1. – С. W5-W14.
236. Agrawal N.K. Targeting inflammation in diabetes: Newer therapeutic options / N.K. Agrawal, S. Kant // *World Journal of Diabetes*. – 2014. – Т. 5. – Targeting inflammation in diabetes. – № 5. – С. 697-710.
237. Akbari M. IL-6 signalling pathways and the development of type 2 diabetes / M. Akbari, V. Hassan-Zadeh // *Inflammopharmacology*. – 2018. – Vol. 26. – № 3. – P. 685-698.
238. Alogliptin after acute coronary syndrome in patients with type 2 diabetes / W.B. White [и др.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2013. – Т. 369. – № 14. – С. 1327-1335.
239. American Association of Clinical Endocrinologists' Comprehensive Diabetes Management Algorithm 2013 Consensus Statement - Executive Summary / A.J. Garber [et al.] // *Endocrine Practice*. – 2013. – Vol. 19. – № 3. – P. 536-557.
240. AMPK Activation Inhibits Expression of Proinflammatory Mediators Through Downregulation of PI3K/p38 MAPK and NF- κ B Signaling in Murine Macrophages / B.-P. Huang [et al.] // *DNA and Cell Biology*. – 2015. – Vol. 34. – № 2. – P. 133-141.
241. AMPK-dependent Repression of Hepatic Gluconeogenesis via Disruption of CREB·CRTC2 Complex by Orphan Nuclear Receptor Small Heterodimer Partner * / J.-M. Lee [и др.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – Т. 285. – № 42. – С. 32182-32191.
242. An Empirical Process for the Design of High-Throughput Screening Deck Filters / B.C. Pearce [et al.] // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2006. – Vol. 46. – № 3. – P. 1060-1068.
243. Anti-inflammatory action of exendin-4 in human islets is enhanced by phosphodiesterase inhibitors: potential therapeutic benefits in diabetic patients / U. Pugazhenthii [и др.] // *Diabetologia*. – 2010. – Т. 53. – Anti-inflammatory action of exendin-4 in human islets is enhanced by phosphodiesterase inhibitors. – № 11. – С. 2357-2368.
244. Assessing drug target suitability using TargetMine / Y.-A. Chen [et al.] // *F1000Research*. – 2019. – Vol. 8. – P. 233.
245. Baggio L.L. Biology of incretins: GLP-1 and GIP / L.L. Baggio, D.J. Drucker // *Gastroenterology*. – 2007. – Т. 132. – Biology of incretins. – № 6. – С. 2131-2157.
246. Basal insulin and cardiovascular and other outcomes in dysglycemia / ORIGIN Trial Investigators [и др.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2012. – Т. 367. – № 4. – С. 319-328.
247. Begam B.F. A Study on Cheminformatics and its Applications on Modern Drug Discovery : INTERNATIONAL CONFERENCE ON MODELLING OPTIMIZATION AND COMPUTING / B.F. Begam, J.S. Kumar // *Procedia Engineering*. – 2012. – Vol. 38. – P. 1264-1275.

248. Belete T.M. A Recent Achievement In the Discovery and Development of Novel Targets for the Treatment of Type-2 Diabetes Mellitus / T.M. Belete // *Journal of Experimental Pharmacology*. – 2020. – Т. 12. – С. 1-15.
249. Benefits and harms of intensive glycemc control in patients with type 2 diabetes / R. Rodriguez-Gutierrez [et al.] // *BMJ*. – 2019. – P. 15887.
250. Beta cell function following 1 year vildagliptin or placebo treatment and after 12 week washout in drug-naive patients with type 2 diabetes and mild hyperglycaemia: a randomised controlled trial / J.E. Foley [и др.] // *Diabetologia*. – 2011. – Т. 54. – Beta cell function following 1 year vildagliptin or placebo treatment and after 12 week washout in drug-naive patients with type 2 diabetes and mild hyperglycaemia. – № 8. – С. 1985-1991.
251. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes / A.E. Butler [и др.] // *Diabetes*. – 2003. – Т. 52. – № 1. – С. 102-110.
252. Beta-cell deterioration determines the onset and rate of progression of secondary dietary failure in type 2 diabetes mellitus: the 10-year follow-up of the Belfast Diet Study / J. Levy [и др.] // *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*. – 1998. – Т. 15. – Beta-cell deterioration determines the onset and rate of progression of secondary dietary failure in type 2 diabetes mellitus. – № 4. – С. 290-296.
253. Biwersi J. Cell-permeable fluorescent indicator for cytosolic chloride / J. Biwersi, A.S. Verkman // *Biochemistry*. – 1991. – Т. 30. – № 32. – С. 7879-7883.
254. Brem H. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes / H. Brem, M. Tomic-Canic // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2007. – Vol. 117. – № 5. – P. 1219-1222.
255. Broccatelli F. Why Decreasing Lipophilicity Alone Is Often Not a Reliable Strategy for Extending IV Half-life / F. Broccatelli, I. Aliagas, H. Zheng // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2018. – Vol. 9. – № 6. – P. 522-527.
256. Brown N. On scaffolds and hopping in medicinal chemistry / N. Brown, E. Jacoby // *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. – 2006. – Т. 6. – № 11. – С. 1217-1229.
257. Bugger H. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy / H. Bugger, E.D. Abel // *Diabetologia*. – 2014. – Vol. 57. – № 4. – P. 660-671.
258. Calculation of molecular lipophilicity: State-of-the-art and comparison of log P methods on more than 96,000 compounds / R. Mannhold [и др.] // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2009. – Т. 98. – Calculation of molecular lipophilicity. – № 3. – С. 861-893.
259. Campbell I.W. Beta-cell preservation with thiazolidinediones / I.W. Campbell, S. Mariz // *Diabetes Research and Clinical Practice*. – 2007. – Т. 76. – № 2. – С. 163-176.

260. Cavallaro C.L. *Molecular Diversity in Lead Discovery: From Quantity to Quality* / C.L. Cavallaro, D.M. Schnur, A.J. Tebben // *Methods and Principles in Medicinal Chemistry* / ed. T.I. Oprea. – Wiley, 2005. – *Molecular Diversity in Lead Discovery*. – P. 175-198.
261. Choosing an adipose tissue depot for sampling: factors in selection and depot specificity / L. Casteilla [и др.] // *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). – 2008. – Т. 456. – *Choosing an adipose tissue depot for sampling*. – С. 23-38.
262. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance / Н. Xu [и др.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2003. – Т. 112. – № 12. – С. 1821-1830.
263. Combination therapy with sitagliptin and lansoprazole in patients with recent-onset type 1 diabetes (REPAIR-T1D): 12-month results of a multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial / K.J. Griffin [и др.] // *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*. – 2014. – Т. 2. – *Combination therapy with sitagliptin and lansoprazole in patients with recent-onset type 1 diabetes (REPAIR-T1D)*. – № 9. – С. 710-718.
264. Comparison of medication adherence and persistence in type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis / A. McGovern [et al.] // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. – 2018. – Vol. 20. – *Comparison of medication adherence and persistence in type 2 diabetes*. – № 4. – P. 1040-1043.
265. Comparisons between dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and other classes of hypoglycemic drugs using two distinct biomarkers of pancreatic beta-cell function: A meta-analysis / M. Takahashi [и др.] // *PloS One*. – 2020. – Т. 15. – *Comparisons between dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and other classes of hypoglycemic drugs using two distinct biomarkers of pancreatic beta-cell function*. – № 7. – С. e0236603.
266. Contrasting Effects of Lixisenatide and Liraglutide on Postprandial Glycemic Control, Gastric Emptying, and Safety Parameters in Patients With Type 2 Diabetes on Optimized Insulin Glargine With or Without Metformin: A Randomized, Open-Label Trial / J.J. Meier [и др.] // *Diabetes Care*. – 2015. – Т. 38. – *Contrasting Effects of Lixisenatide and Liraglutide on Postprandial Glycemic Control, Gastric Emptying, and Safety Parameters in Patients With Type 2 Diabetes on Optimized Insulin Glargine With or Without Metformin*. – № 7. – С. 1263-1273.
267. Corbeil C.R. Variability in docking success rates due to dataset preparation / C.R. Corbeil, C.I. Williams, P. Labute // *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. – 2012. – Vol. 26. – № 6. – P. 775-786.
268. Cosmi F. Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes / F. Cosmi, R. Laini, A. Nicolucci // *The New England Journal of Medicine*. – 2017. – Т. 376. – № 9. – С. 890.

269. Cytokine-mediated down-regulation of the transcription factor cAMP-response element-binding protein in pancreatic beta-cells / P. Jambal [и др.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Т. 278. – № 25. – С. 23055-23065.
270. Daina A. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules / A. Daina, O. Michielin, V. Zoete // *Scientific Reports*. – 2017. – Т. 7. – SwissADME. – С. 42717.
271. Data completeness—the Achilles heel of drug-target networks / J. Mestres [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2008. – Vol. 26. – № 9. – P. 983-984.
272. Decher N. Putative impact of RNA editing on drug discovery / N. Decher, M.F. Netter, A.K. Streit // *Chemical Biology & Drug Design*. – 2013. – Т. 81. – № 1. – С. 13-21.
273. DeFronzo R.A. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus / R.A. DeFronzo // *Diabetes*. – 2009. – Т. 58. – Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet. – № 4. – С. 773-795.
274. DeFronzo R.A. Pathophysiologic approach to therapy in patients with newly diagnosed type 2 diabetes / R.A. DeFronzo, R. Eldor, M. Abdul-Ghani // *Diabetes Care*. – 2013. – Т. 36 Suppl 2. – С. S127-138.
275. Di L. Biological assay challenges from compound solubility: strategies for bioassay optimization / L. Di, E.H. Kerns // *Drug Discovery Today*. – 2006. – Vol. 11. – Biological assay challenges from compound solubility. – № 9. – P. 446-451.
276. Diabetes mellitus and thrombosis / N. Vazzana [и др.] // *Thrombosis Research*. – 2012. – Т. 129. – № 3. – С. 371-377.
277. Diabetes mellitus--advances and challenges in human β -cell proliferation / P. Wang [и др.] // *Nature Reviews. Endocrinology*. – 2015. – Т. 11. – № 4. – С. 201-212.
278. Diabetes Prevention Program Research Group. Long-term effects of lifestyle intervention or metformin on diabetes development and microvascular complications over 15-year follow-up: the Diabetes Prevention Program Outcomes Study / Diabetes Prevention Program Research Group // *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*. – 2015. – Т. 3. – Long-term effects of lifestyle intervention or metformin on diabetes development and microvascular complications over 15-year follow-up. – № 11. – С. 866-875.
279. Dirnagl U. The p value wars (again) / U. Dirnagl // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. – 2019. – Т. 46. – № 12. – С. 2421-2423.
280. Discovery of 318 new risk loci for type 2 diabetes and related vascular outcomes among 1.4 million participants in a multi-ancestry meta-analysis / M. Vujkovic [и др.] // *Nature Genetics*. – 2020. – Т. 52. – № 7. – С. 680-691.

281. Diverse convergent evidence in the genetic analysis of complex disease: coordinating omic, informatic, and experimental evidence to better identify and validate risk factors / T.H. Ciesielski [и др.] // *BioData Mining*. – 2014. – Т. 7. – Diverse convergent evidence in the genetic analysis of complex disease. – С. 10.
282. Drug Target Identification and Validation: Global Pharmaceutical Industry Experts on Challenges, Best Strategies, Innovative Precompetitive Collaboration Concepts, and Future Areas of Industry Precompetitive Research and Development / T. Bergauer [и др.] // *Therapeutic Innovation & Regulatory Science*. – 2016. – Т. 50. – Drug Target Identification and Validation. – № 6. – С. 769-776.
283. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase / C. Postic [и др.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Т. 274. – № 1. – С. 305-315.
284. Dynamic Docking: A Paradigm Shift in Computational Drug Discovery / D. Gioia [et al.] // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22. – Dynamic Docking. – № 11. – P. 2029.
285. Dynamics of glucose-induced insulin secretion in normal human islets / J.-C. Henquin [et al.] // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. – 2015. – Vol. 309. – № 7. – P. E640-E650.
286. Early phase drug discovery: Cheminformatics and computational techniques in identifying lead series : Chemoinformatics in Drug Discovery / B.C. Duffy [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2012. – Vol. 20. – Early phase drug discovery. – № 18. – P. 5324-5342.
287. Effect of intensive insulin therapy on beta-cell function and glycaemic control in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a multicentre randomised parallel-group trial / J. Weng [и др.] // *Lancet (London, England)*. – 2008. – Т. 371. – Effect of intensive insulin therapy on beta-cell function and glycaemic control in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. – № 9626. – С. 1753-1760.
288. Effect of pioglitazone on pancreatic beta-cell function and diabetes risk in Hispanic women with prior gestational diabetes / A.H. Xiang [и др.] // *Diabetes*. – 2006. – Т. 55. – № 2. – С. 517-522.
289. Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial / DREAM (Diabetes REduction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication) Trial Investigators [и др.] // *Lancet (London, England)*. – 2006. – Т. 368. – Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose. – № 9541. – С. 1096-1105.
290. Effect of Sitagliptin on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes / J.B. Green [и др.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2015. – Т. 373. – № 3. – С. 232-242.
291. Effectiveness and side effects of thiazolidinediones for type 2 diabetes: real-life experience from a tertiary hospital / Z. Hussein [et al.] // *Medical Journal of Australia*. – 2004. –

Vol. 181. – Effectiveness and side effects of thiazolidinediones for type 2 diabetes. – № 10. – P. 536-539.

292. Effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on beta-cell function and insulin resistance in type 2 diabetes: meta-analysis of randomized controlled trials / X. Lyu [и др.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Т. 7. – Effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on beta-cell function and insulin resistance in type 2 diabetes. – С. 44865.

293. Effects of exenatide on measures of β -cell function after 3 years in metformin-treated patients with type 2 diabetes / M.C. Bunck [и др.] // *Diabetes Care*. – 2011. – Т. 34. – № 9. – С. 2041-2047.

294. Effects of insulin vs. glibenclamide in recently diagnosed patients with type 2 diabetes: a 4-year follow-up / M. Alvarsson [и др.] // *Diabetes, Obesity & Metabolism*. – 2008. – Т. 10. – Effects of insulin vs. glibenclamide in recently diagnosed patients with type 2 diabetes. – № 5. – С. 421-429.

295. Egner U. A structural biology view of target drugability / U. Egner, R.C. Hillig // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – 2008. – Т. 3. – № 4. – С. 391-401.

296. Eguchi K. Islet inflammation in type 2 diabetes and physiology / K. Eguchi, R. Nagai // *Journal of Clinical Investigation*. – 2017. – Vol. 127. – № 1. – P. 14-23.

297. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes / B. Zinman [и др.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2015. – Т. 373. – № 22. – С. 2117-2128.

298. Engel T. Applied Chemoinformatics: Achievements and Future Opportunities. *Applied Chemoinformatics* / T. Engel, J. Gasteiger Google-Books-ID: fLFVDwAAQBAJ. – John Wiley & Sons, 2018. – 644 p.

299. Engel T. Chemoinformatics: Basic Concepts and Methods. *Chemoinformatics* / T. Engel, J. Gasteiger Google-Books-ID: X7paDwAAQBAJ. – John Wiley & Sons, 2018. – 604 p.

300. Exenatide improves β -cell function up to 3 years of treatment in patients with type 2 diabetes: a randomised controlled trial / D.H. van Raalte [и др.] // *European Journal of Endocrinology*. – 2016. – Т. 175. – Exenatide improves β -cell function up to 3 years of treatment in patients with type 2 diabetes. – № 4. – С. 345-352.

301. Exogenous and Endogenous Adenosine Inhibits Fetal Calf Serum-Induced Growth of Rat Cardiac Fibroblasts: Role of A_{2B} Receptors / R.K. Dubey [et al.] // *Circulation*. – 1997. – Vol. 96. – Exogenous and Endogenous Adenosine Inhibits Fetal Calf Serum-Induced Growth of Rat Cardiac Fibroblasts. – № 8. – P. 2656-2666.

302. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings : In Vitro Models for Selection of Development Candidates / C.A. Lipinski [et al.] // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 1997. – Vol. 23. – № 1. – P. 3-25.

303. Exploratory toxicology as an integrated part of drug discovery. Part I: Why and how / J.J. Hornberg [и др.] // *Drug Discovery Today*. – 2014. – Т. 19. – Exploratory toxicology as an integrated part of drug discovery. Part I. – № 8. – С. 1131-1136.
304. Force T. Cardiotoxicity of kinase inhibitors: the prediction and translation of preclinical models to clinical outcomes / T. Force, K.L. Kolaja // *Nature Reviews. Drug Discovery*. – 2011. – Т. 10. – Cardiotoxicity of kinase inhibitors. – № 2. – С. 111-126.
305. Fountas A. Tyrosine Kinase Inhibitors and Diabetes: A Novel Treatment Paradigm? / A. Fountas, L.-N. Diamantopoulos, A. Tsatsoulis // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. – 2015. – Vol. 26. – Tyrosine Kinase Inhibitors and Diabetes. – № 11. – P. 643-656.
306. Furman B.L. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats / B.L. Furman // *Current Protocols in Pharmacology*. – 2015. – Vol. 70. – № 1. – P. 5.47.1-5.47.20.
307. Future unmet medical need as a guiding principle for pharmaceutical R&D / M. Vennemann [и др.] // *Drug Discovery Today*. – 2019. – Т. 24. – № 9. – С. 1924-1929.
308. Gasteiger J. Chemoinformatics – An Important Scientific Discipline / J. Gasteiger, K. Funatsu // *Journal of Computer Chemistry, Japan*. – 2006. – Vol. 5. – № 2. – P. 53-58.
309. GCK profile page | Open Targets Platform [Электронный ресурс]. – URL: <https://platform.opentargets.org/target/ENSG00000106633> (дата обращения: 20.07.2022).
310. GDF15 mediates the effects of metformin on body weight and energy balance / A.P. Coll [и др.] // *Nature*. – 2020. – Т. 578. – № 7795. – С. 444-448.
311. Genetic deficiency of glycogen synthase kinase-3beta corrects diabetes in mouse models of insulin resistance / K. Tanabe [и др.] // *PLoS biology*. – 2008. – Т. 6. – № 2. – С. e37.
312. Ghasemi J.B. Molecular Docking Challenges and Limitations [Электронный ресурс] : chapter. – URL: www.igi-global.com/chapter/molecular-docking-challenges-and-limitations/174150 (дата обращения: 20.04.2021).
313. Glossary of terms used in medicinal chemistry. Part II (IUPAC Recommendations 2013) / D.R. Buckle [и др.] // *Pure and Applied Chemistry*. – 2013. – Т. 85. – № 8. – С. 1725-1758.
314. GLP-1 Receptor Activation Modulates Appetite- and Reward-Related Brain Areas in Humans / L. van Bloemendaal [et al.] // *Diabetes*. – 2014. – Vol. 63. – № 12. – P. 4186-4196.
315. Glucagon-like peptide-1 agonists protect pancreatic beta-cells from lipotoxic endoplasmic reticulum stress through upregulation of BiP and JunB / D.A. Cunha [и др.] // *Diabetes*. – 2009. – Т. 58. – № 12. – С. 2851-2862.
316. Glucokinase activation leads to an unsustained hypoglycaemic effect with hepatic triglyceride accumulation in db/db mice / S. Kawata [et al.] // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. – 2022. – Vol. 24. – № 3. – P. 391-401.

317. Glucokinase Activators for Diabetes Therapy / F.M. Matschinsky [et al.] // *Diabetes Care*. – 2011. – Vol. 34. – № Supplement_2. – P. S236-S243.
318. Glucokinase as an emerging anti-diabetes target and recent progress in the development of its agonists / Y. Ren [и др.] // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. – 2022. – Т. 37. – № 1. – С. 606-615.
319. Gray S.P. Alleviating the burden of diabetic nephropathy / S.P. Gray, M.E. Cooper // *Nature Reviews Nephrology*. – 2011. – Vol. 7. – № 2. – P. 71-73.
320. Group U.K.P.D.S. U.K. Prospective Diabetes Study 16: Overview of 6 Years' Therapy of Type II Diabetes: A Progressive Disease / U.K.P.D.S. Group // *Diabetes*. – 1995. – Vol. 44. – U.K. Prospective Diabetes Study 16. – № 11. – P. 1249-1258.
321. GSK3B profile page | Open Targets Platform [Электронный ресурс]. – URL: <https://platform.opentargets.org/target/ENSG00000082701> (дата обращения: 20.07.2022).
322. Guengerich F.P. Mechanisms of drug toxicity and relevance to pharmaceutical development / F.P. Guengerich // *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. – 2011. – Т. 26. – № 1. – С. 3-14.
323. Gupta D. The role of peroxisome proliferator-activated receptor γ in pancreatic β cell function and survival: therapeutic implications for the treatment of type 2 diabetes mellitus / D. Gupta, T. Kono, C. Evans-Molina // *Diabetes, Obesity & Metabolism*. – 2010. – Т. 12. – The role of peroxisome proliferator-activated receptor γ in pancreatic β cell function and survival. – № 12. – С. 1036-1047.
324. Harmalkar A. Advances to tackle backbone flexibility in protein docking : Theory and Simulation/Computational Methods • Macromolecular Assemblies / A. Harmalkar, J.J. Gray // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2021. – Vol. 67. – P. 178-186.
325. HbA1c and Hypoglycemia Reductions at 24 and 52 Weeks With Sotagliflozin in Combination With Insulin in Adults With Type 1 Diabetes: The European inTandem2 Study / T. Danne [et al.] // *Diabetes Care*. – 2018. – Vol. 41. – HbA1c and Hypoglycemia Reductions at 24 and 52 Weeks With Sotagliflozin in Combination With Insulin in Adults With Type 1 Diabetes. – № 9. – P. 1981-1990.
326. Hotamisligil G.S. Foundations of Immunometabolism and Implications for Metabolic Health and Disease / G.S. Hotamisligil // *Immunity*. – 2017. – Т. 47. – № 3. – С. 406-420.
327. Hotamisligil G.S. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance / G.S. Hotamisligil, N.S. Shargill, B.M. Spiegelman // *Science (New York, N.Y.)*. – 1993. – Т. 259. – Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha. – № 5091. – С. 87-91.
328. Hu Y. EXPLORING COMPOUND PROMISCUITY PATTERNS AND MULTI-TARGET ACTIVITY SPACES / Y. Hu, D. Gupta-Ostermann, J. Bajorath // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. – 2014. – Vol. 9. – № 13. – P. e201401003.

329. Hu Y. Lessons Learned from Molecular Scaffold Analysis / Y. Hu, D. Stumpfe, J. Bajorath // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2011. – Vol. 51. – № 8. – P. 1742-1753.
330. Huggins D.J. Rational methods for the selection of diverse screening compounds / D.J. Huggins, A.R. Venkitaraman, D.R. Spring // *ACS chemical biology*. – 2011. – Т. 6. – № 3. – С. 208-217.
331. Human Beta Cell Regenerative Drug Therapy for Diabetes: Past Achievements and Future Challenges / P. Wang [и др.] // *Frontiers in Endocrinology*. – 2021. – Т. 12. – Human Beta Cell Regenerative Drug Therapy for Diabetes. – С. 671946.
332. Impact of Childhood Malnutrition on Host Defense and Infection / M.K. Ibrahim [и др.] // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2017. – Т. 30. – № 4. – С. 919-971.
333. Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects. / G. Velho [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 1996. – Vol. 98. – № 8. – P. 1755-1761.
334. Impairment of glucose-induced insulin secretion in human pancreatic islets transplanted to diabetic nude mice / L. Jansson [и др.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 1995. – Т. 96. – № 2. – С. 721-726.
335. Increased Expression of Hepatic Organic Cation Transporter 1 and Hepatic Distribution of Metformin in High-fat Diet-induced Obese Mice / E.-H. Jang [et al.] // *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. – 2010. – Vol. 25. – № 4. – P. 392-397.
336. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes / J.A. Ehses [и др.] // *Diabetes*. – 2007. – Т. 56. – № 9. – С. 2356-2370.
337. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? / S. Leclerc [и др.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Т. 276. – № 1. – С. 251-260.
338. Inflammation in obesity and diabetes: islet dysfunction and therapeutic opportunity / M.Y. Donath [и др.] // *Cell Metabolism*. – 2013. – Т. 17. – Inflammation in obesity and diabetes. – № 6. – С. 860-872.
339. Inhibiting Glycogen Synthase Kinase 3 Reverses Obesity-Induced White Adipose Tissue Inflammation by Regulating Apoptosis Inhibitor of Macrophage/CD5L-Mediated Macrophage Migration / L. Wang [и др.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2018. – Т. 38. – № 9. – С. 2103-2116.
340. Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion / C. Bonner [и др.] // *Nature Medicine*. – 2015. – Т. 21. – № 5. – С. 512-517.

341. Initial combination therapy with metformin, pioglitazone and exenatide is more effective than sequential add-on therapy in subjects with new-onset diabetes. Results from the Efficacy and Durability of Initial Combination Therapy for Type 2 Diabetes (EDICT / M.A. Abdul-Ghani [et al.] // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. – 2015. – Vol. 17. – № 3. – P. 268-275.

342. Inpatient Management of Diabetic Foot Disorders: A Clinical Guide / D.K. Wukich [et al.] // *Diabetes Care*. – 2013. – Vol. 36. – Inpatient Management of Diabetic Foot Disorders. – № 9. – P. 2862-2871.

343. Insights into Mechanism of Glucokinase Activation: OBSERVATION OF MULTIPLE DISTINCT PROTEIN CONFORMATIONS / S. Liu [и др.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Т. 287. – Insights into Mechanism of Glucokinase Activation. – № 17. – С. 13598-13610.

344. International Mouse Phenotyping Consortium [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.mousephenotype.org/> (дата обращения: 19.07.2022).

345. IP and Business: Launching a New Product: freedom to operate [Электронный ресурс]. – URL: https://www.wipo.int/wipo_magazine/en/2005/05/article_0006.html (дата обращения: 23.01.2022).

346. Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes / R.L. Hull [и др.] // *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2004. – Т. 89. – Islet amyloid. – № 8. – С. 3629-3643.

347. Jalencas X. On the origins of drug polypharmacology / X. Jalencas, J. Mestres // *MedChemComm*. – 2012. – Vol. 4. – № 1. – P. 80-87.

348. Johnson T.W. Using the Golden Triangle to optimize clearance and oral absorption / T.W. Johnson, K.R. Dress, M. Edwards // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2009. – Vol. 19. – № 19. – P. 5560-5564.

349. Kaelin W.G. Common pitfalls in preclinical cancer target validation / W.G. Kaelin // *Nature Reviews. Cancer*. – 2017. – Т. 17. – № 7. – С. 425-440.

350. Keller T.H. A practical view of ‘druggability’ : Next-generation therapeutics / T.H. Keller, A. Pichota, Z. Yin // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2006. – Vol. 10. – № 4. – P. 357-361.

351. Khanna I. Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends / I. Khanna // *Drug Discovery Today*. – 2012. – Vol. 17. – Drug discovery in pharmaceutical industry. – № 19. – P. 1088-1102.

352. Konkwo C. Imeglimin: Current Development and Future Potential in Type 2 Diabetes / C. Konkwo, R.J. Perry // *Drugs*. – 2021. – Vol. 81. – Imeglimin. – № 2. – P. 185-190.

353. Kostev K. Diabetic retinopathy at diagnosis of type 2 diabetes in the UK: a database analysis / K. Kostev, W. Rathmann // *Diabetologia*. – 2013. – Vol. 56. – Diabetic retinopathy at diagnosis of type 2 diabetes in the UK. – № 1. – P. 109-111.
354. Kramer C.K. Short-term intensive insulin therapy in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis / C.K. Kramer, B. Zinman, R. Retnakaran // *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*. – 2013. – T. 1. – Short-term intensive insulin therapy in type 2 diabetes mellitus. – № 1. – C. 28-34.
355. Lee W.H. Open access target validation is a more efficient way to accelerate drug discovery / W.H. Lee // *PLoS biology*. – 2015. – T. 13. – № 6. – C. e1002164.
356. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes / S. Lenzen // *Diabetologia*. – 2008. – Vol. 51. – № 2. – P. 216-226.
357. Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework / D. Cook [и др.] // *Nature Reviews. Drug Discovery*. – 2014. – T. 13. – Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline. – № 6. – C. 419-431.
358. Li D. GSK3beta is a negative regulator of platelet function and thrombosis / D. Li, S. August, D.S. Woulfe // *Blood*. – 2008. – T. 111. – № 7. – C. 3522-3530.
359. Lin S.-C. AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status / S.-C. Lin, D.G. Hardie // *Cell Metabolism*. – 2018. – Vol. 27. – AMPK. – № 2. – P. 299-313.
360. Lin X. A Review on Applications of Computational Methods in Drug Screening and Design / X. Lin, X. Li, X. Lin // *Molecules (Basel, Switzerland)*. – 2020. – T. 25. – № 6. – C. E1375.
361. Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes / S.P. Marso [и др.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2016. – T. 375. – № 4. – C. 311-322.
362. Liraglutide and the preservation of pancreatic β -cell function in early type 2 diabetes: the LIBRA trial / R. Retnakaran [и др.] // *Diabetes Care*. – 2014. – T. 37. – Liraglutide and the preservation of pancreatic β -cell function in early type 2 diabetes. – № 12. – C. 3270-3278.
363. Lixisenatide in Patients with Type 2 Diabetes and Acute Coronary Syndrome / M.A. Pfeffer [и др.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2015. – T. 373. – № 23. – C. 2247-2257.
364. Loke Y.K. Long-term use of thiazolidinediones and fractures in type 2 diabetes: a meta-analysis / Y.K. Loke, S. Singh, C.D. Furberg // *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. – 2009. – T. 180. – Long-term use of thiazolidinediones and fractures in type 2 diabetes. – № 1. – C. 32-39.
365. Long-term effect of rosiglitazone and/or ramipril on the incidence of diabetes / DREAM On (Diabetes Reduction Assessment with Ramipril and Rosiglitazone Medication Ongoing Follow-up) Investigators [и др.] // *Diabetologia*. – 2011. – T. 54. – № 3. – C. 487-495.

366. Long-term glycaemic response and tolerability of dapagliflozin versus a sulphonylurea as add-on therapy to metformin in patients with type 2 diabetes: 4-year data / S. Del Prato [и др.] // *Diabetes, Obesity & Metabolism*. – 2015. – Т. 17. – Long-term glycaemic response and tolerability of dapagliflozin versus a sulphonylurea as add-on therapy to metformin in patients with type 2 diabetes. – № 6. – С. 581-590.
367. Maggiora G.M. Introduction to Molecular Similarity and Chemical Space / G.M. Maggiora // *Foodinformatics: Applications of Chemical Information to Food Chemistry* / eds. K. Martinez-Mayorga, J.L. Medina-Franco. – Cham: Springer International Publishing, 2014. – P. 1-81.
368. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes / I. Se [et al.] // *Diabetes care*. – 2015. – Vol. 38. – Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015. – № 1.
369. Manduca J.D. Glycogen synthase kinase-3: The missing link to aberrant circuit function in disorders of cognitive dysfunction? / J.D. Manduca, R.-K. Thériault, M.L. Perreault // *Pharmacological Research*. – 2020. – Vol. 157. – Glycogen synthase kinase-3. – P. 104819.
370. Martin E.J. Biased Diversity for Effective Virtual Screening / E.J. Martin, J.M. Jansen // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2020. – Vol. 60. – № 9. – P. 4116-4119.
371. Maturity Onset Diabetes of the Young Type 2 / G. Velho [и др.] // *Glucokinase and Glycemic Disease: From Basics to Novel Therapeutics*. – 2004. – Т. 16. – С. 42-64.
372. Mechanism of action of exenatide to reduce postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes / A. Cervera [и др.] // *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. – 2008. – Т. 294. – № 5. – С. E846-852.
373. Mechanism of action of Imeglimin: A novel therapeutic agent for type 2 diabetes / S. Hallakou-Bozec [et al.] // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. – 2021. – Vol. 23. – Mechanism of action of Imeglimin. – № 3. – P. 664-673.
374. Mechanisms of defective glucose-induced insulin release in human pancreatic islets transplanted to diabetic nude mice / D.L. Eizirik [и др.] // *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 1997. – Т. 82. – № 8. – С. 2660-2663.
375. Medina-Franco J.L. Molecular Similarity Analysis / J.L. Medina-Franco, G.M. Maggiora // *Chemoinformatics for Drug Discovery*. – John Wiley & Sons, Ltd, 2013. – P. 343-399.
376. Meier J.J. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus / J.J. Meier // *Nature Reviews. Endocrinology*. – 2012. – Т. 8. – № 12. – С. 728-742.
377. Metabolic consequences of acute and chronic empagliflozin administration in treatment-naive and metformin pretreated patients with type 2 diabetes / E. Muscelli [и др.] // *Diabetologia*. – 2016. – Т. 59. – № 4. – С. 700-708.

378. Metabolic stress, IAPP and islet amyloid / J. Montane [и др.] // *Diabetes, Obesity & Metabolism*. – 2012. – Т. 14 Suppl 3. – С. 68-77.
379. Metformin Inhibits Hepatic Gluconeogenesis Through AMP-Activated Protein Kinase-Dependent Regulation of the Orphan Nuclear Receptor SHP / Y.D. Kim [et al.] // *Diabetes*. – 2008. – Vol. 57. – № 2. – P. 306-314.
380. Metformin Inhibits Mouse Islet Insulin Secretion and Alters Intracellular Calcium in a Concentration-Dependent and Duration-Dependent Manner near the Circulating Range / L. Gelin [et al.] // *Journal of Diabetes Research*. – 2018. – Vol. 2018. – P. e9163052.
381. Metformin Preserves β -Cell Compensation in Insulin Secretion and Mass Expansion in Prediabetic Nile Rats / H. Huang [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 1. – P. 421.
382. Metformin prevents glucotoxicity by alleviating oxidative and ER stress-induced CD36 expression in pancreatic beta cells / J.S. Moon [et al.] // *Journal of Diabetes and its Complications*. – 2017. – Vol. 31. – № 1. – P. 21-30.
383. Meyers V.K. Chapter 2 Registry of Toxic Effects of Chemical Substances as a Source for Compilino a List of Teratogens / V.K. Meyers // *Studies in Environmental Science : Teratogens: Chemicals Which Cause Birth Defects* / ed. V.K. Meyers. – Elsevier, 1988. – Vol. 31. – P. 42-238.
384. Model-Based Drug Development: Strengths, Weaknesses, Opportunities, and Threats for Broad Application of Pharmacometrics in Drug Development / J.D. Wetherington [et al.] // *The Journal of Clinical Pharmacology*. – 2010. – Vol. 50. – Model-Based Drug Development. – № S9. – P. 31S-46S.
385. Molecular determinants of drug-receptor binding kinetics / A.C. Pan [et al.] // *Drug Discovery Today*. – 2013. – Vol. 18. – № 13. – P. 667-673.
386. Montori V.M. Glycemic Control in Type 2 Diabetes: Time for an Evidence-Based About-Face? / V.M. Montori // *Annals of Internal Medicine*. – 2009. – Vol. 150. – Glycemic Control in Type 2 Diabetes. – № 11. – P. 803.
387. Neuropathy and Related Findings in the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study / C.L. Martin [et al.] // *Diabetes Care*. – 2014. – Vol. 37. – № 1. – P. 31-38.
388. Neuroprotective Effects of Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibition against ER Stress-Induced Toxicity / Y.-M. Jeon [и др.] // *Molecules and Cells*. – 2017. – Т. 40. – № 4. – С. 280-290.
389. Nonaka H. FTO (Freedom to operate) in the pharmaceutical industry / H. Nonaka. – 2018.
390. Novel Small-Molecule AMP-Activated Protein Kinase Allosteric Activator with Beneficial Effects in db/db Mice / L.-N. Zhang [et al.] // *PLOS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – № 8. – P. e72092.

391. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue / S.P. Weisberg [и др.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2003. – Т. 112. – № 12. – С. 1796-1808.
392. Perola E. Development of a rule-based method for the assessment of protein druggability / E. Perola, L. Herman, J. Weiss // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2012. – Т. 52. – № 4. – С. 1027-1038.
393. Perreault L. Novel therapies with precision mechanisms for type 2 diabetes mellitus / L. Perreault, J.S. Skyler, J. Rosenstock // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2021. – Vol. 17. – № 6. – P. 364-377.
394. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A / X. Fang [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2000. – Т. 97. – № 22. – С. 11960-11965.
395. Physiochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes / J.D. Hughes [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2008. – Vol. 18. – № 17. – P. 4872-4875.
396. Pioglitazone and the secondary prevention of cardiovascular disease. A meta-analysis of randomized-controlled trials / M. de Jong [и др.] // *Cardiovascular Diabetology*. – 2017. – Т. 16. – № 1. – С. 134.
397. Pioglitazone is equally effective for diabetes prevention in older versus younger adults with impaired glucose tolerance / S.E. Espinoza [и др.] // *Age (Dordrecht, Netherlands)*. – 2016. – Т. 38. – № 5-6. – С. 485-493.
398. Pioglitazone: The forgotten, cost-effective cardioprotective drug for type 2 diabetes / R.A. DeFronzo [и др.] // *Diabetes & Vascular Disease Research*. – 2019. – Т. 16. – Pioglitazone. – № 2. – С. 133-143.
399. Pirags V. Imeglimin, a novel glimin oral antidiabetic, exhibits a good efficacy and safety profile in type 2 diabetic patients / V. Pirags, H. Lebovitz, P. Fouqueray // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. – 2012. – Vol. 14. – № 9. – P. 852-858.
400. Polidori D. Canagliflozin, a sodium glucose co-transporter 2 inhibitor, improves model-based indices of beta cell function in patients with type 2 diabetes / D. Polidori, A. Mari, E. Ferrannini // *Diabetologia*. – 2014. – Т. 57. – № 5. – С. 891-901.
401. Postmarket Safety Events Among Novel Therapeutics Approved by the US Food and Drug Administration Between 2001 and 2010 / N.S. Downing [и др.] // *JAMA*. – 2017. – Т. 317. – № 18. – С. 1854-1863.
402. Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience / K.S. Button [и др.] // *Nature Reviews. Neuroscience*. – 2013. – Т. 14. – Power failure. – № 5. – С. 365-376.
403. Poxel Announces Positive Results From Phase 2a NASH Trial With PXL770, an Oral First-in-Class Direct AMPK Activator [Электронный ресурс]. – URL:

https://www.poxelpharma.com/en_us/news-media/press-releases/detail/164 (дата обращения: 23.04.2021).

404. Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk hispanic women / T.A. Buchanan [и др.] // *Diabetes*. – 2002. – Т. 51. – № 9. – С. 2796-2803.

405. Prevention of type 2 diabetes with troglitazone in the Diabetes Prevention Program / W.C. Knowler [и др.] // *Diabetes*. – 2005. – Т. 54. – № 4. – С. 1150-1156.

406. Principles of early drug discovery / J.P. Hughes [и др.] // *British Journal of Pharmacology*. – 2011. – Т. 162. – № 6. – С. 1239-1249.

407. PRKAA1 profile page | Open Targets Platform [Электронный ресурс]. – URL: <https://platform.opentargets.org/target/ENSG00000132356/associations> (дата обращения: 20.07.2022).

408. PTPN1 profile page | Open Targets Platform [Электронный ресурс]. – URL: <https://platform.opentargets.org/target/ENSG00000196396> (дата обращения: 20.07.2022).

409. PXL770 [Электронный ресурс]. – URL: https://www.poxelpharma.com/en_us/product-pipeline/pxl770 (дата обращения: 23.04.2021).

410. Quo vadis, virtual screening? A comprehensive survey of prospective applications / P. Ripphausen [и др.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2010. – Т. 53. – Quo vadis, virtual screening? – № 24. – С. 8461-8467.

411. Qvigstad E. Nine weeks of bedtime diazoxide is well tolerated and improves beta-cell function in subjects with Type 2 diabetes / E. Qvigstad, M. Kollind, V. Grill // *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*. – 2004. – Т. 21. – № 1. – С. 73-76.

412. Raalte D.H. van. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists: Beta-Cell Protection or Exhaustion? / D.H. van Raalte, C.B. Verchere // *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. – 2016. – Т. 27. – Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists. – № 7. – С. 442-445.

413. Rajala R.V.S. Neuroprotective role of protein tyrosine phosphatase-1B in rod photoreceptor neurons / R.V.S. Rajala, A. Rajala // *Protein & Cell*. – 2013. – Т. 4. – № 12. – С. 890-892.

414. Recent updates on development of protein-tyrosine phosphatase 1B inhibitors for treatment of diabetes, obesity and related disorders / S. Singh [et al.] // *Bioorganic Chemistry*. – 2022. – Vol. 121. – P. 105626.

415. Reduced Adipose Tissue Macrophage Content Is Associated With Improved Insulin Sensitivity in Thiazolidinedione-Treated Diabetic Humans / S. Koppaka [et al.] // *Diabetes*. – 2013. – Vol. 62. – № 6. – P. 1843-1854.

416. Ref-1 protects against FeCl₃-induced thrombosis and tissue factor expression *via* the GSK3 β -NF- κ B pathway / I. Lee [et al.] // *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*. – 2021. – Vol. 25. – № 1. – P. 59-68.
417. Regional fat distribution and metabolism in a new mouse model (C57BL6J) of non-insulin-dependent diabetes mellitus / M. Rebuffé-Scrive [et al.] // *Metabolism*. – 1993. – Vol. 42. – № 11. – P. 1405-1409.
418. Relationship between Oxidative Stress, Inflammation and Dyslipidemia with Fatty Liver Index in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus / A. Klisic [et al.] // *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. – 2018. – Vol. 126. – № 6. – P. 371-378.
419. Retnakaran R. Short-term intensified insulin treatment in type 2 diabetes: long-term effects on β -cell function / R. Retnakaran, B. Zinman // *Diabetes, Obesity & Metabolism*. – 2012. – T. 14 Suppl 3. – Short-term intensified insulin treatment in type 2 diabetes. – C. 161-166.
420. Reversal of type 2 diabetes: normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol / E.L. Lim [и др.] // *Diabetologia*. – 2011. – T. 54. – Reversal of type 2 diabetes. – № 10. – C. 2506-2514.
421. Riddle M.C. Combined Therapy With Insulin Plus Oral Agents: Is There Any Advantage?: An argument in favor / M.C. Riddle // *Diabetes Care*. – 2008. – Vol. 31. – Combined Therapy With Insulin Plus Oral Agents. – № Supplement 2. – P. S125-S130.
422. Ripphausen P. State-of-the-art in ligand-based virtual screening / P. Ripphausen, B. Nisius, J. Bajorath // *Drug Discovery Today*. – 2011. – Vol. 16. – № 9. – P. 372-376.
423. RISE Consortium. Impact of Insulin and Metformin Versus Metformin Alone on β -Cell Function in Youth With Impaired Glucose Tolerance or Recently Diagnosed Type 2 Diabetes / RISE Consortium // *Diabetes Care*. – 2018. – T. 41. – № 8. – C. 1717-1725.
424. Roberts R.A. Understanding drug targets: no such thing as bad news / R.A. Roberts // *Drug Discovery Today*. – 2018. – T. 23. – Understanding drug targets. – № 12. – C. 1925-1928.
425. Rogers D.J. A Computer Program for Classifying Plants / D.J. Rogers, T.T. Tanimoto // *Science (New York, N.Y.)*. – 1960. – T. 132. – № 3434. – C. 1115-1118.
426. Role of insulin secretion and sensitivity in the evolution of type 2 diabetes in the diabetes prevention program: effects of lifestyle intervention and metformin / A.E. Kitabchi [и др.] // *Diabetes*. – 2005. – T. 54. – Role of insulin secretion and sensitivity in the evolution of type 2 diabetes in the diabetes prevention program. – № 8. – C. 2404-2414.
427. Rudmann D.G. On-target and off-target-based toxicologic effects / D.G. Rudmann // *Toxicologic Pathology*. – 2013. – T. 41. – № 2. – C. 310-314.

428. Safety, tolerability and sustained weight loss over 2 years with the once-daily human GLP-1 analog, liraglutide / A. Astrup [et al.] // *International Journal of Obesity*. – 2012. – Vol. 36. – № 6. – P. 843-854.
429. Saisho Y. Changing the Concept of Type 2 Diabetes: Beta Cell Workload Hypothesis Revisited / Y. Saisho // *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*. – 2019. – Т. 19. – Changing the Concept of Type 2 Diabetes. – № 2. – С. 121-127.
430. Saisho Y. β -cell dysfunction: Its critical role in prevention and management of type 2 diabetes / Y. Saisho // *World Journal of Diabetes*. – 2015. – Т. 6. – β -cell dysfunction. – № 1. – С. 109-124.
431. Screening requirements | European Lead Factory [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.europeanleadfactory.eu/screening-requirements> (дата обращения: 23.01.2022).
432. Searching for Molecular Solutions: Empirical Discovery and Its Future | Wiley [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.wiley.com/en-us/Searching+for+Molecular+Solutions%3A+Empirical+Discovery+and+Its+Future-p-9780470551448> (дата обращения: 23.01.2022).
433. Shift to Fatty Substrate Utilization in Response to Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibition in Subjects Without Diabetes and Patients With Type 2 Diabetes / E. Ferrannini [и др.] // *Diabetes*. – 2016. – Т. 65. – № 5. – С. 1190-1195.
434. Small-molecule inhibition of inflammatory β -cell death / M. Lundh [et al.] // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. – 2013. – Vol. 15. – № s3. – P. 176-184.
435. Sodium-Glucose Cotransporter Inhibitors: Effects on Renal and Intestinal Glucose Transport: From Bench to Bedside / S. Mudaliar [и др.] // *Diabetes Care*. – 2015. – Т. 38. – Sodium-Glucose Cotransporter Inhibitors. – № 12. – С. 2344-2353.
436. Softening the Rule of Five—where to draw the line? : Chemoinformatics in Drug Discovery / J. Petit [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2012. – Vol. 20. – № 18. – P. 5343-5351.
437. Sotagliflozin in Patients with Diabetes and Recent Worsening Heart Failure / D.L. Bhatt [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. 384. – № 2. – P. 117-128.
438. Sotagliflozin, the first dual SGLT inhibitor: current outlook and perspectives / C.M.A. Cefalo [et al.] // *Cardiovascular Diabetology*. – 2019. – Vol. 18. – Sotagliflozin, the first dual SGLT inhibitor. – № 1. – P. 20.
439. Statsenko M.E. The role of insulin resistance and systemic inflammation in reducing the elasticity of the main arteries in patients with arterial hypertension and non-alcoholic fatty liver disease / M.E. Statsenko, A.M. Streltsova, M.I. Turovets // *Profilakticheskaya meditsina*. – 2021. – Vol. 24. – № 5. – P. 60.

440. Sternisha S.M. Molecular and cellular regulation of human glucokinase / S.M. Sternisha, B.G. Miller // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2019. – Vol. 663. – P. 199-213.
441. Stress-impaired transcription factor expression and insulin secretion in transplanted human islets / C. Dai [и др.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2016. – Т. 126. – № 5. – С. 1857-1870.
442. Sullivan G.M. Using Effect Size-or Why the P Value Is Not Enough / G.M. Sullivan, R. Feinn // *Journal of Graduate Medical Education*. – 2012. – Т. 4. – № 3. – С. 279-282.
443. Sutherland C. What Are the bona fide GSK3 Substrates? / C. Sutherland // *International Journal of Alzheimer's Disease*. – 2011. – Vol. 2011. – P. e505607.
444. Synthetic exendin-4 (exenatide) significantly reduces postprandial and fasting plasma glucose in subjects with type 2 diabetes / O.G. Kolterman [и др.] // *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2003. – Т. 88. – № 7. – С. 3082-3089.
445. The A1C and ABCD of glycaemia management in type 2 diabetes: a physician's personalized approach / P. Pozzilli [et al.] // *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. – 2010. – Vol. 26. – The A1C and ABCD of glycaemia management in type 2 diabetes. – № 4. – P. 239-244.
446. The combination of insulin resistance and visceral adipose tissue estimation improves the performance of metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes / N.E. Antonio-Villa [et al.] // *Diabetic Medicine*. – 2020. – Vol. 37. – № 7. – P. 1192-1201.
447. The DPP-4 inhibitor linagliptin restores β -cell function and survival in human isolated islets through GLP-1 stabilization / P. Shah [и др.] // *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2013. – Т. 98. – № 7. – С. E1163-1172.
448. The glucagon-like peptide-1 receptor agonist exenatide restores impaired pro-islet amyloid polypeptide processing in cultured human islets: implications in type 2 diabetes and islet transplantation / Y.J. Park [и др.] // *Diabetologia*. – 2013. – Т. 56. – The glucagon-like peptide-1 receptor agonist exenatide restores impaired pro-islet amyloid polypeptide processing in cultured human islets. – № 3. – С. 508-519.
449. The mechanism by which imeglimin inhibits gluconeogenesis in rat liver cells / G. Vial [et al.] // *Endocrinology, Diabetes & Metabolism*. – 2021. – Vol. 4. – № 2.
450. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus / C. Weyer [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 1999. – Vol. 104. – № 6. – P. 787-794.
451. The “rule of three” for fragment-based drug discovery: where are we now? / H. Jhoti [et al.] // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2013. – Vol. 12. – The “rule of three” for fragment-based drug discovery. – № 8. – P. 644-644.

452. Type 2 diabetes mellitus / R.A. DeFronzo [et al.] // Nature Reviews Disease Primers. – 2015. – Vol. 1. – № 1. – P. 1-22.
453. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Multi-Target Drugs / A. Artasensi [et al.] // Molecules. – 2020. – Vol. 25. – Type 2 Diabetes Mellitus. – № 8. – P. 1987.
454. Varnek A. Chemoinformatics as a Theoretical Chemistry Discipline / A. Varnek, I.I. Baskin // Molecular Informatics. – 2011. – Vol. 30. – № 1. – P. 20-32.
455. Very Low-Calorie Diet and 6 Months of Weight Stability in Type 2 Diabetes: Pathophysiological Changes in Responders and Nonresponders / S. Steven [и др.] // Diabetes Care. – 2016. – Т. 39. – Very Low-Calorie Diet and 6 Months of Weight Stability in Type 2 Diabetes. – № 5. – С. 808-815.
456. Visceral Adipose Tissue Accumulation and Residual Cardiovascular Risk / T.H. Le Jemtel [et al.] // Current Hypertension Reports. – 2018. – Vol. 20. – № 9. – P. 77.
457. Weir G.C. Inadequate β -cell mass is essential for the pathogenesis of type 2 diabetes / G.C. Weir, J. Gaglia, S. Bonner-Weir // The Lancet Diabetes & Endocrinology. – 2020. – Т. 8. – № 3. – С. 249-256.
458. Wolverson D. Fracture risk associated with common medications used in treating type 2 diabetes mellitus / D. Wolverson, M.M. Blair // American journal of health-system pharmacy: AJHP: official journal of the American Society of Health-System Pharmacists. – 2017. – Т. 74. – № 15. – С. 1143-1151.
459. Xu J.J. Predictive Toxicology in Drug Safety [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.cambridge.org/core/books/predictive-toxicology-in-drug-safety/1875D8CDD7EC3081E5A0AE01AF34CBB8> (дата обращения: 23.01.2022).
460. Zhang Y.P. Around the block / Y.P. Zhang // Bioentrepreneur. – 2010. – P. 1-3.