

УДК 616-092

Фенотипическое профилирование клеток в разработке лекарственных препаратов

Кузнецова Л.В.¹, Шабунина Э.А.², Буданова О.П.³, Гусева М.Н.⁴, Малышев И.Ю.^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации
127006, Москва, ул. Долгоруковская, д. 4

² Общество с ограниченной ответственностью «Медицинский центр Елены Малышевой»
105082, Москва, Переведеновский пер., д. 8

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»
125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Государственный университет управления»
125993, Москва, Рязанский проспект, д. 99

На фоне наблюдающегося кризиса фарминдустрии, когда прибыль от новых лекарств больше не оправдывает огромные инвестиции, которые вкладываются в исследования и разработку, поиск надежных моделей заболеваний является одной из основных задач. В обзорной лекции рассматривается фенотипическая разработка лекарственных препаратов и важный элемент разработки – патологический фенотип (модель), пригодный для высокопроизводительного скрининга. В частности, одним из способов решения проблемы физиологически релевантного клеточного фенотипа является фенотипическое профилирование, направленное на то, чтобы зафиксировать широкий спектр (до полутора тысяч) фенотипических характеристик модельной клетки, некоторые или даже все из которых ранее могли не иметь никакой подтвержденной значимости для конкретного заболевания или потенциального лечения, и выявить – с использованием искусственного интеллекта (ИИ) – скрытые, неочевидные, практические полезные профили/«fingerprints» клеток, связанные с заболеваниями и различными воздействиями. Частным случаем фенотипического профилирования является морфологическое профилирование, основанное на анализе изображений клеток, окрашенных флуоресцентными красителями, с использованием разных продуктов ИИ, аналогичных методам распознавания лиц и идентификации личности. Данные морфологического профилирования широко используются как для разработки лекарственных препаратов, так и для фундаментальных исследований.

Ключевые слова: фенотипическое профилирование; молекулярная мишень; патологический фенотип; морфологическое профилирование.

Для цитирования: Кузнецова Л.В., Шабунина Э.А., Буданова О.П., Гусева М.Н., Малышев И.Ю. Фенотипическое профилирование клеток в разработке лекарственных препаратов. *Патогенез.* 2024; 22(4): 78-86.

DOI: 10.25557/2310-0435.2024.04.78-86

Для корреспонденции: Малышев Игорь Юрьевич, e-mail: iymalyshev1@gmail.com

Финансирование: Государственное задание «Разработка аналитической платформы фенотипического профилирования макрофагов человека с использованием технологии «Cell Painting» на 2024-2026 г.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила: 05.12.2024.

Phenotypic profiling of cells in drug discovery

Kuznetsova L.V.¹, Shabunina E.A.², Budanova O.P.³, Guseva M.N.⁴, Malyshev I.Yu.^{1,3}

¹ Russian University of Medicine
Dolgorukovskaya Str. 4, Moscow 127006, Russian Federation

² Elena Malysheva Medical Center
Perevedenovskiy Pereulok 8, Moscow 8105082, Russian Federation

³ Institute of General Pathology and Pathophysiology
Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

⁴ State University of Management
Ryazanskiy Prospekt 99, Moscow 125993, Russian Federation

In the context of the current crisis in the pharmaceutical industry, when the profit from new drugs no longer justifies the huge investments that are made in research and development, finding reliable disease models is one of the main tasks. The review considers phenotypic drug development and an important element of development - a pathological phenotype (model) suitable for high-throughput screening. In particular, one of the ways to solve the problem of physiologically relevant cell phenotype is phenotypic profiling aimed at recording a wide range (up to one and a half thousand) of phenotypic characteristics of a model cell, some or even all of which may not have previously had any confirmed significance for a particular disease or potential treatment, and identifying - using AI - hidden, non-obvious, practically useful profiles/«fingerprints» of cells associated with diseases and various impacts, and also a special case of phenotypic profiling - morphological profiling based on the analysis of images of cells stained with fluorescent dyes, using machine learning methods (AI, deep learning of neural networks, reinforcement learning), similar to face recognition and personal identification methods. Morphological profiling data are widely used both for drug development and for fundamental research.

Key words: phenotypic profiling; molecular target; pathological phenotype; morphological profiling.

For citation: Kuznetsova L.V., Shabunina E.A., Budanova O.P., Guseva M.N., Malyshev I.Yu. [Phenotypic profiling of cells in drug development]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2024; 22(4): 78-86. (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2024.04.78-86

For correspondence: Malyshev Igor Yuryevich, e-mail: iymalyshev1@gmail.com

Funding: State assignment «Development of an analytical platform for phenotypic profiling of human macrophages using Cell Painting technology» for 2024-2026.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Received: 05.12.2024.

Терминология и сокращения

Муковисцидоз – аутосомно-рецессивное заболевание, вызванное нарушением структуры гена трансмембранного регулятора проводимости муковисцидоза (CFTR).

Ивакафтор – стимулятор белка CFTR.

Лумакафтор – корректор белка CFTR.

Спинальная мышечная атрофия (СМА) – наследственное нервно-мышечное заболевание.

SEP-363856 (Sunovion Pharmaceuticals) – первый препарат при лечении шизофрении.

КАF156 относится к новому классу противомаларийных препаратов (имидазолпиперазинов).

Неаннотированные соединения – это соединения, для которых не существует аннотаций или описаний.

Метод siRNA (малая интерферирующая РНК) – это метод глушения генов, нацеленный на конкретные гены.

Кавернозная мальформация ССМ2 отличается от ССМ1 по клиническому течению заболевания. Мутации в ССМ1 связывают с более тяжёлым течением болезни по сравнению с ССМ2. Это объясняется тем, что ССМ2 кодирует белок под названием малькавернин, и у лиц с мутациями этого гена больше шансов протекать бессимптомно и иметь меньше поражений.

Для того, чтобы понять актуальность темы данной обзорной лекции «Фенотипическое профилирование клеток в разработке лекарственных препаратов», надо вспомнить, что выведение на рынок нового лекарства требует от 8 до 12 лет, огромных инвестиций – до \$ 2–3 млрд, и сопряжено с большим риском неудач – до 90%. Интересно понять, как так получилось и где фарминдустрия совершила ошибку.

Исторически, новые лекарства открывались путем наблюдения за действием препарата-кандидата на проявление болезни человека или, другими словами, патологический фенотип заболевания. Фенотип заболевания – это совокупность внешних и внутренних проявлений болезни, которые могут включать симптомы, физические характеристики и функциональные изменения в организме. Он отражает как генетические, так и внешние факторы, например, образ жизни и воздействие окружающей среды влияют на проявление болезни у конкретного человека. Поиск лекарств на основе действия соединений-кандидатов на патологический фенотип называли фенотип-ориентиро-

ванным. Первыми лекарствами были отвары и экстракты трав, которые легко готовить и, не зная механизма действия, просто наблюдать за их эффектами на патологический фенотип. И тот препарат, который переводил патологический фенотип в нормальный, дальше производился как лекарство.

Прорыв в молекулярной биологии и расшифровка генома человека в конце 20-го века сделали возможным определять строение генов и молекулярную структуру потенциальных лекарственных мишеней. Молекулярная мишень заболевания – это биологическая молекула, например, белок, РНК, ДНК, которая играет ключевую роль в развитии или прогрессировании болезни, и на которую направлено терапевтическое действие лекарства. Основная цель взаимодействия лекарственного вещества с молекулярной мишенью заключается в изменении активности или функции этой молекулы, что может подавить или остановить развитие заболевания. Поиск лекарств на основе мишени называли мишень-ориентированным, и на какое-то время он стал доминирующим, а тестирование соединений на людях и животных, значительно снизилось.

Однако очень быстро выяснилось, что стоимость мишень-ориентированных разработок сильно возросла, а количество одобренных регуляторов лекарств уменьшилось, что привело к образованию существенного разрыва между пониманием молекулярных механизмов заболевания и изобретением новых лекарств: про гены, РНК и белки при той или иной болезни известно многое, а лекарство найти очень сложно. Возникла необходимость устранения этого разрыва, что парадоксальным образом привело к возрождению интереса к давно списанному фенотипическому подходу.

Что же явилось непосредственным толчком к очередному изменению парадигмы разработки лекарств? Еще в 1988 году, на самой заре основанной на мишени разработки, Джордж Хитчингс в своей Нобелевской лекции провидчески отметил, что «ранние фенотипические исследования привели к разработке полезных лекарств для широкого спектра заболеваний и подтвердили веру в то, что фенотипический подход к открытию лекарств более плодотворен, чем основанный на мишени» [1].

В 2011 году в *Nature Reviews Drug Discovery* было опубликовано исследование под названием «Как были открыты новые лекарства?», авторы которого проанализировали стратегии разработки новых препаратов, одобренных FDA в период с 1999 по 2008 год [2] Этот анализ показал, что большинство низкомолекулярных *first-in-*

class, т.е. *первых в своем классе* препаратов, было обнаружено фенотипически, тогда как большинство *последователей* было обнаружено с помощью разработки на основании мишени. В частности, 34% (17 малых молекул) были открыты с использованием разработки на основании мишени, тогда как фенотипические стратегии позволили обнаружить 56% (28 малых молекул), а оставшиеся 10% (5 малых молекул) были синтетическими версиями природных веществ. На основании полученных данных был сделан вывод о том, что одного знания мишени недостаточно для успешной разработки *первых в своем классе* лекарств. Для успешной разработки абсолютно необходимо не только знание предполагаемой мишени, но и того, как воздействия на мишень превращаются в терапевтически полезный фенотип. Этот вопрос решается эмпирически, т.е. в ходе фенотипического скрининга. В 2014 году все в той же Nature Reviews Drug Discovery вышло еще одно исследование, авторы которого проанализировали разработку *first-in-class* лекарств, одобренных FDA с 1999 по 2013 год [3]. Основным выводом этого исследования гласил, что необходима комбинированная стратегия, использующая и разработку на основе мишени, и фенотипический подход. Диаграмма на **рис. 1** иллюстрирует современную комбинированную версию основных этапов ранней фазы разработки лекарственных препаратов.

В фенотип-ориентированной части сначала получают лиды, а затем проводят *деконволюцию мишени*, чтобы определить молекулы-мишени, вызывающие наблюдаемые фенотипические (терапевтические) эффекты. Лиды — это молекулы с искомой активностью. Деконволюция мишени — это технология определения мишени по известной структуре лида. Деконволюция мишени имеет огромное значение не только в плане выявления молекулярных механизмов заболевания, но и в том плане, что знание мишени открывает возможность применения *основанных на структуре* методов разработки и оптимизации, включая виртуальные, которые применяются в случае известной структуры мишени. В части разработки, основанной на мишени, полученную в ходе деконволюции мишень используют для дальнейшего поиска соединений-лидов обычным методом скрининга. Это безусловно повышает качество разработки лекарства.

Растущая популярность фенотип-ориентированных подходов были бы невозможны в отсутствие заметных успехов в получении таких лекарств, как ивакафтор и лумакафтор при муковисцидозе, ридиплам и бранаплам при спинальной мышечной атрофии, SEP-363856 при шизофрении, KAF156 при малярии и крисаборол при атопическом дерматите [5].

Таким образом, разработка на основе мишени сфокусирована на молекулярной мишени заболевания (гене, РНК, белке), и отправной точкой является связанная с болезнью активность мишени. Фенотипическая разработка определяется как независимая от мишени

стратегия; отправной точкой является связанный с болезнью фенотип модельного организма/системы.

Главная уязвимость разработки на основе мишени — это неуверенность в том, что связывание молекулярной мишени с лекарственным средством приведет к желаемому клиническому результату, т.е., что мишень выбрана правильно, а фенотипической разработки — в том, что регистрируемый фенотипический признак является клинически значимым, т.е., в том, что патологический фенотип, пригодный для высокопроизводительного скрининга, выбран правильно [6].

В отличие от прошлых лет, когда в качестве моделей фенотипической разработки выступали люди и экспериментальные животные, основными моделями современной фенотипической разработки являются клетки. Ключевой характеристикой «хорошей» модели является физиологическая релевантность — насколько полно фенотип модельной клетки воспроизводит фенотип заболевания и конечный эффект тестируемых соединений [7]. Отсутствие надежных релевантных клеточных фенотипов, пригодных к высокопроизводительному скринингу для большинства сложных и недостаточно изученных патологий, таких как, прогрессирующие нейродегенеративные заболевания [8], является одной из основных причин кризиса фарминдустрии, когда прибыль от новых лекарств не оправдывает огромные инвестиции, которые вкладываются в исследования и разработку [9].

В настоящий момент главная надежда на преодоление кризиса фарминдустрии и решение проблемы патологического фенотипа возлагается на искусственный интеллект (ИИ) [10] и *фенотипическое профилирование* [11]. Фенотипическое профилирование направлено на то, чтобы (1) зафиксировать широкий спектр (до полутора тысяч) фенотипических признаков модельной клетки, некоторые или даже все из которых ранее *могли не иметь никакой подтвержденной значимости* для конкретного заболевания или потенциального лечения, и (2) выявить — с использованием ИИ — скрытые, неочевидные, практические полезные профили/«fingerprints» клеток, связанные с заболеваниями и различными воздействиями. Принципиальным отличием фенотипического профилирования от традиционного фенотипического скрининга (в ходе которого определяется весьма незначительное количество известных в настоящий момент признаков) является возможность регистрации «глобального ответа» клетки на те или иные воздействия *относительно не искаженным образом*, что снимает ограничения, обусловленные неполнотой современных представлений о внутриклеточных процессах.

На **рис. 2** изображены тепловые карты, представляющие агрегированные фенотипические профили одиночных клеток. Матрицы фенотипических признаков показывают данные, такие как *экспрессия генов или клеточная морфология*, для двух популяций клеток в различных состояниях. Эти данные были сведены в медианные про-

фили, которые соответствуют двум воздействиям и демонстрируют весьма существенные отличия. В качестве воздействий могут рассматриваться болезненное и здоровое состояние клеток.

В случае плохо охарактеризованных заболеваний многомерные фенотипические профили могут рассматриваться как *суррогатный фенотип заболевания* и использоваться в качестве конечного сигнала фенотипического скрининга. В этом случае вместо химического соединения агентом, влияющим на конечный сигнал фенотипического скрининга, является само заболевание, а скрининг направлен на поиск молекул, возвращающих систему из болезненного состояния в здоровое.

Частным случаем фенотипического профилирования является *морфологическое профилирование*, основанное на анализе изображений клеток, окрашенных флуоресцентными красителями, методами машинного обучения (глубокого обучения нейронных сетей, обучения с подкреплением), аналогичных методам распознавания лиц и идентификации личности [13].

Эта технология морфологического профилирования называется Cell Painting [13]. Первая версия технологии была опубликована в 2013 году. Термин «Cell Painting» впервые появился в публикации 2016 года, в которой подробно описывается процесс [14]. Технология Cell Painting создает целостное «изображение» клетки, отражающее ее фенотипическое состояние и клеточные реакции на различные воздействия. Метод включает окрашивание клеток комбинацией флуоресцентных красителей, каждый из которых красит определенные клеточные компоненты или органеллы, такие как ядра, эндоплазматический ретикулум, нуклеоли и цитоплазматическая РНК, F-актин, аппарат Гольджи и плазматическая мембрана и митохондрии.

Метод Cell Painting был разработан как *легкий и недорогой для внедрения в любых скрининговых лабораториях*, поскольку использует *только красители, а не антитела*, которые могут быть более дорогостоящими и требуют множества трудоемких этапов. На **рис. 3** можно увидеть схематическое представление теста Cell Painting:

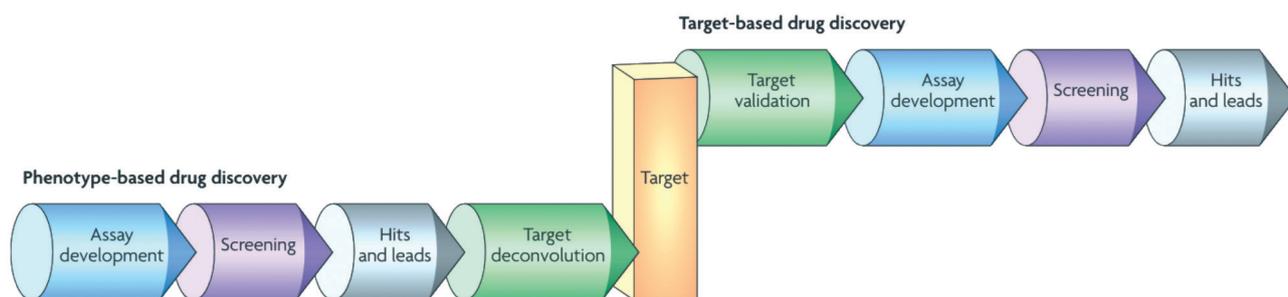


Рис. 1. Основные этапы ранней разработки лекарственных препаратов (взято из источника [4]).

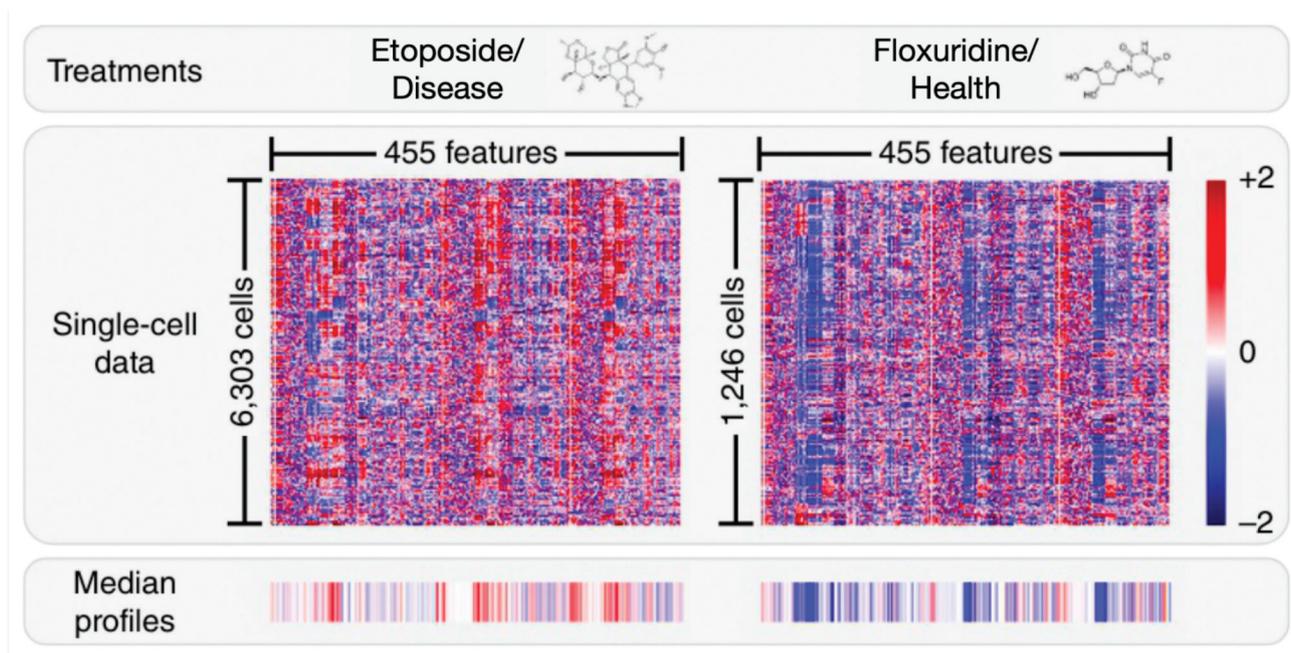


Рис. 2. Фенотипическое профилирование (взято из источника [12]).

клетки – это могут быть клетки различных линий или первичные клетки – инкубируются и подвергаются какому-либо воздействию, затем окрашиваются набором из шести флуоресцентных красителей. Далее получают изображения с помощью *автоматизированной микроскопии*, за которой следует анализ данных.

На **рис. 4** из публикации [15] показаны клетки, окрашенные по технологии Cell Painting. Верхнее фото – это изображение клеток, полученное с использованием системы многопараметрического скрининга клеток Operetta от компании Revvity (бывшая PerkinElmer) путем наложения изображений по всем регистрируемым каналам. Нижний ряд – это изображения клеток по отдельным каналам, регистрирующим свечение отдельных красок, которые связываются к тем или иным структурам клетки.

Обычно используются 96/384 луночные планшеты, в каждой лунке снимается от 3 до 9 полей зрения, каждое из которых содержит сотни клеток. В результате

получается огромный объем данных, для анализа которого требуются специальные инструменты.

Чаще всего применяется анализ изображений с помощью автоматизированных конвейеров (пайплайнов) CellProfiler'a, которые могут извлекать морфологические признаки индивидуальных клеток и преобразовывать их (нормализация) по отношению к эталонным и контрольным соединениям (**рис. 5**) [13]. Это дает многомерный набор данных для каждой клетки и позволяет получить более тысячи морфологических признаков, таких как измерения размера, формы, текстуры, интенсивности и многих других. Далее признаки агрегируют сначала на уровне лунки, затем на уровне воздействия и, в конце концов, получают морфологические профили, пригодные для дальнейшего анализа.

Данные морфологического профилирования активно используются как для разработки лекарственных препаратов, так и для фундаментальных исследований (**рис. 6**).

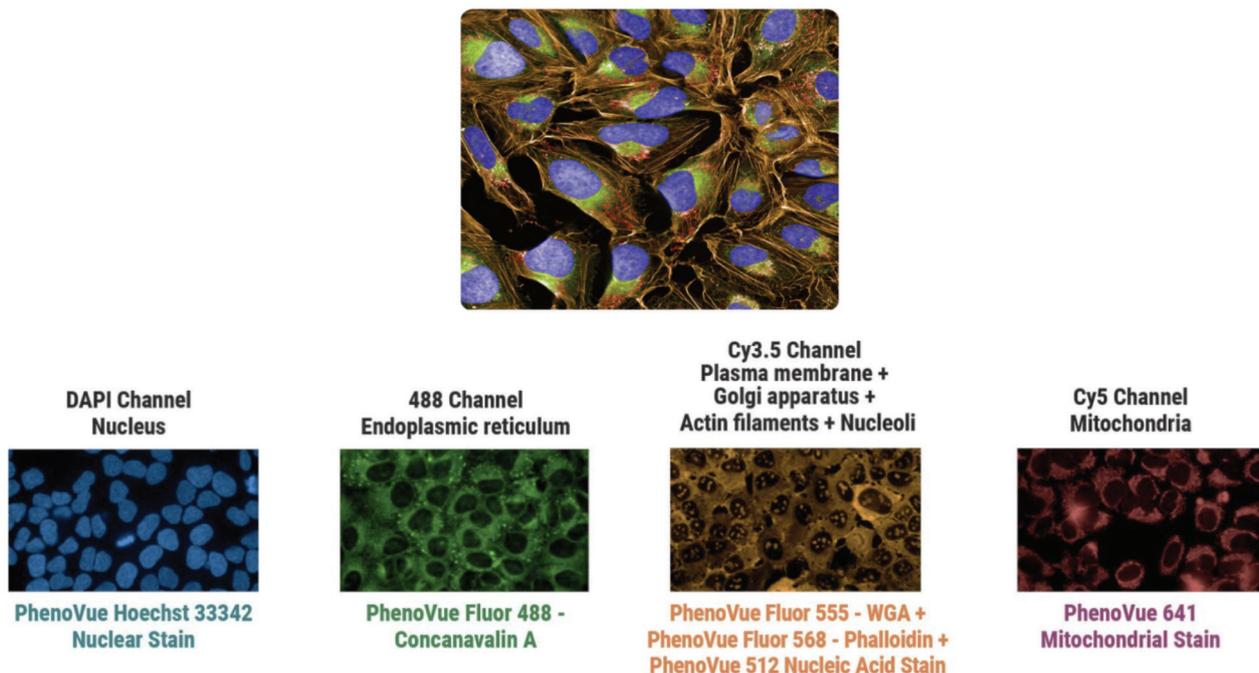


Рис. 3. Технология Cell Painting (взято из источника [13]).

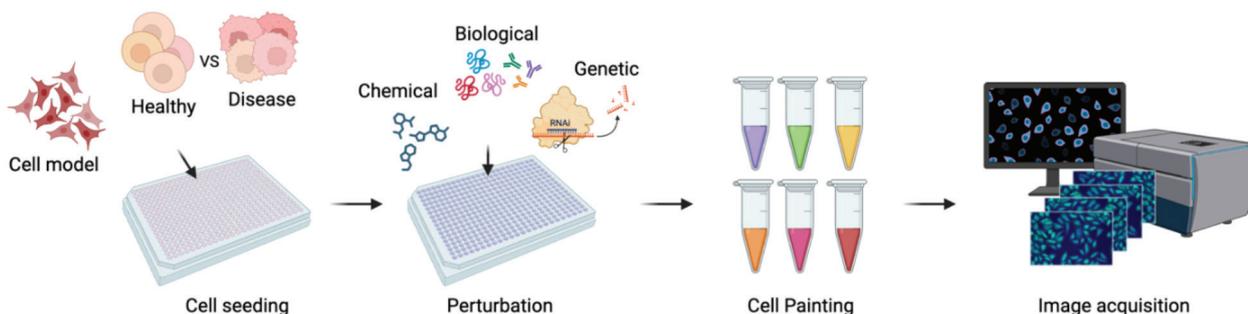


Рис. 4. Окрашивание клеток по методу Cell Painting (взято из источника [15]).

В частности, морфологическое профилирование позволяет (1) сгруппировать большую коллекцию *не аннотированных* соединений в кластеры, содержащие молекулы с одинаковым механизмом действия; (2) предсказать механизм действия *неаннотированных* химических соединений путем сравнения их профилей с набором профилей эталонных соединений; (3) идентифицировать соединения *с нужной биологической активностью* (в случае поиска и разработки лекарственных соединений) и т.д. Этот анализ может быть выполнен с использованием большого арсенала методов, включая машинное и глубокое обучение.

Главный вопрос, который возникает после знакомства с технологией Cell Painting — есть ли доказательства, что вещества с различными известными механизмами действия действительно приводят к ожидаемым изменениям морфологии клеток и эти изменения можно задокументировать методом Cell Painting? Ответ на этот вопрос положительный.

Более того, существует целая система валидации платформы Cell Painting, представляющая собой набор контролей, которые должны обязательно выполняться не только при запуске платформы, но и регулярно при рутинных скринингах (рис. 7) [15].

Одним из элементов системы валидации является набор из 6 референсных веществ (по числу красителей) с известным механизмом действия и, соответственно, известным эффектом на морфологию клеток, и не просто на морфологию клеток, а прицельно на морфоло-

гию каждой из 6 окрашиваемых компонент. Ниже некоторые из этих веществ:

Фенбендазол связывается с альфа-цепью тубулина, ингибируя полимеризацию микротрубочек и вызывая разрушение митотического веретена, что в конечном итоге приводит к митотической катастрофе. Этот эффект визуализируется в виде гигантских многоядерных клеток;

Тетрандрин является мощным ингибитором Р-гликопротеина, обеспечивающего многофакторную устойчивость к лекарствам, а также увеличивает количество эндоплазматического ретикулума;

Цитохалазин D связывается с G-актином и вызывает деполимеризацию актиновых филаментов и увеличение свечения.

При разработке лекарственных препаратов смысловая постановка задачи состоит в том, чтобы в той или иной библиотеке веществ, найти молекулы с нужной биологической активностью, а именно, активностью, которая преобразует болезненный фенотип в здоровый.

В заключение, невероятно красивый пример использования морфологического профилирования для поиска новых лекарств для лечения редкого заболевания церебральной кавернозной мальформации (ССМ) (рис. 8) [16].

Это заболевание, при котором в головном и спинном мозге образуются скопления аномальных кровеносных сосудов, что может приводить к неврологическим симптомам, таким как судороги, головные боли, а в тяжелых случаях — к геморрагическому инсульту.

Поскольку большинство пациентов с заболеванием ССМ имеет мутации [17], которые, как предполага-

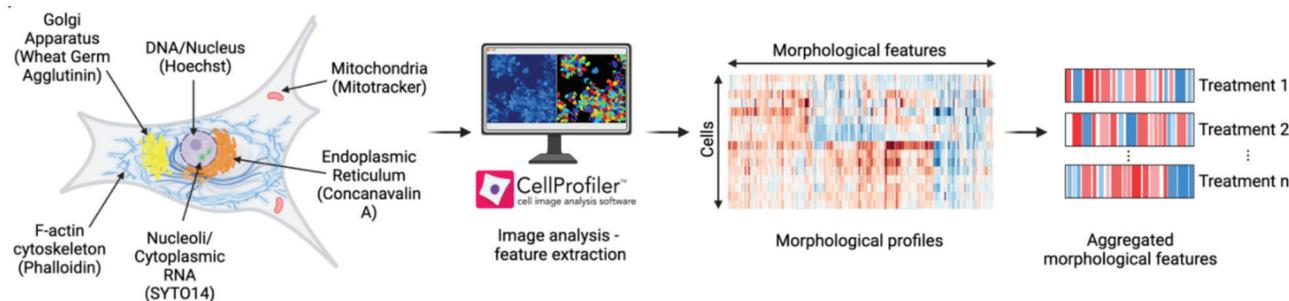


Рис. 5. Извлечение морфологических признаков (взято из источника [13]).

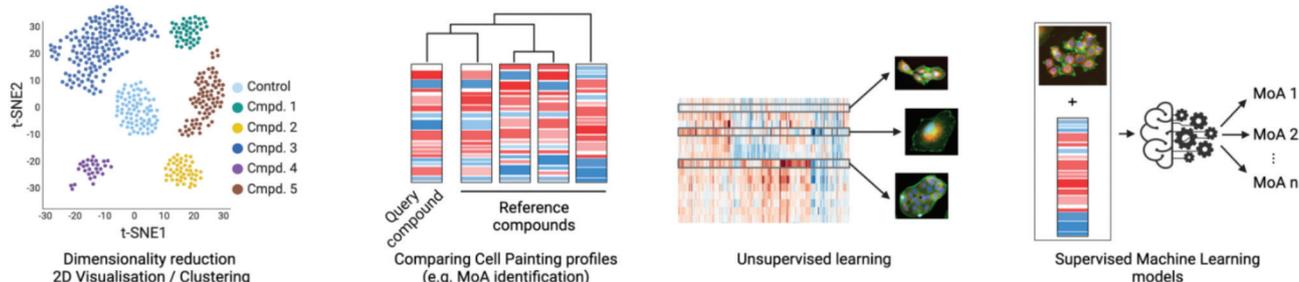


Рис. 6. Практическое значение морфологического профилирования (взято из источника [14]).

ются, приводят к потере функции или количества белка ССМ, исследователи смоделировали заболевание на человеческих эндотелиальных клетках дермальных микрососудов (HMVEC-D), у которых методом siRNA [18] провели нокдаун ССМ2.

Эндотелиальные клетки с дефицитом ССМ2 имеют ярко выраженный *морфологический фенотип*, который характеризуется увеличенным образованием F-актина (зеленое окрашивание на **рис. 8**). Это связано с тем, что белки ССМ (ССМ1, ССМ2 и ССМ3) обычно помогают регулировать динамику цитоскелета, поддерживая баланс в полимеризации актина. При нокдауне генов ССМ сигнальные пути, контролирующие актин, могут становиться гиперактивными, вызывая чрезмерное образование стрессовых волокон и аномальные структуры F-актина.

Был проведен скрининг 2 100 известных препаратов, чтобы выявить те, которые могли бы преобразовать структурный фенотип, связанный с потерей ССМ2, в здоровый. Полученные изображения были проанализированы количественно с использованием программ CellProfiler и CellProfiler Analyst. Кроме этого, сделали качественную оценку, которую провели два независимых эксперта – для сравнения.

Двое экспертов, проводивших качественный анализ, выделили 38 соединений, которые, по их мнению, способствовали восстановлению морфологического фенотипа при добавлении к клеткам, обработанным siССМ2. Одновременно, была использована система CellProfiler для приоритизации соединений и тоже выбрали 38 лучших соединений с тем, чтобы обеспечить прямое чис-

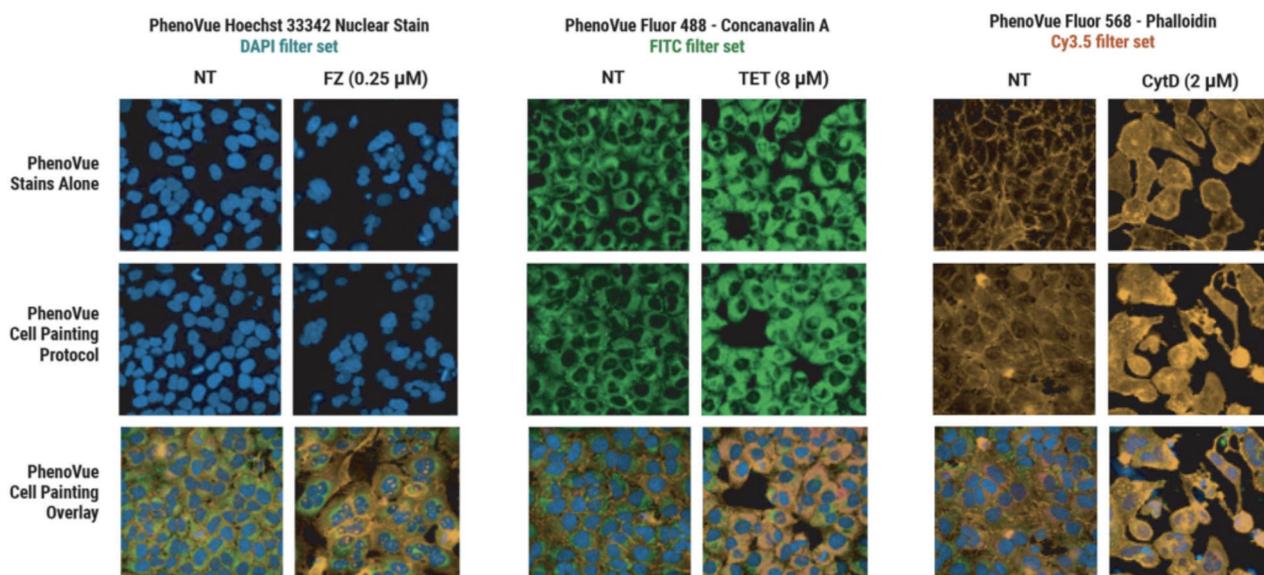


Рис. 7. Валидация платформы Cell Painting (взято из источника [15]).

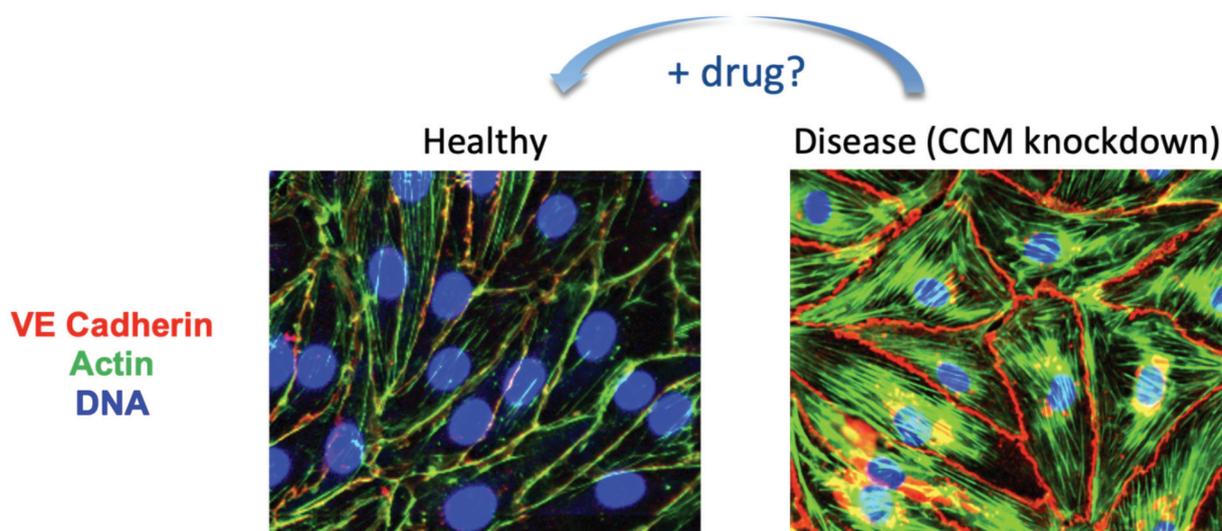


Рис. 8. Идентификация хитов методом Cell Painting (взято из источника [16]).

ленное сравнение результатов качественного анализа (38 соединений) и автоматизированного анализа. Интересно, что между соединениями, выбранными при качественном анализе, и соединениями, выбранными с помощью автоматизированного компьютерного скрининга, не было пересечений.

Для подтверждения результатов и определения приоритетности дальнейшего анализа был разработан *вторичный ортогональный скрининг*, основанный на оценке целостности эндотелиальной слоя по изменению сопротивления, возникающего при прохождении электрического тока между электродами, на которых выращивается монослой клеток. Метод использовали для одновременного скрининга двух наборов из 38 соединений, определенных в первичном скрининге с помощью ручного и автоматизированного анализа изображений.

Из 38 соединений, отобранных при ручном анализе, только одно соединение (симвастатин) продемонстрировало восстановление стабильности монослоя в клетках, обработанных siCCM2. Однако из 38 соединений, выявленных с помощью автоматизированного анализа с использованием машинного обучения CellProfiler, семь показали полное или частичное восстановление функционального фенотипа. Эти семь соединений, выбранных на основе автоматизированного анализа и подтвержденных вторичным скринингом, включают вещества, относящиеся к классам, ранее связанным с заболеванием ССМ, а также соединения, ранее не ассоциировавшиеся с этим заболеванием.

Заключение

Морфологическое профилирование с использованием ИИ, выводит разработку лекарств на качественно новый уровень. Внедрение ИИ в область биомедицинских исследований и разработки соответствует передовым мировым направлениям развития биомедицинских исследований и фармацевтической индустрии.

Список литературы

1. Hitchings G.H. *Banquet speech* Режим доступа: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1988/hitchings/speech/> Дата обращения: 01.12.2024
2. Swinney D.C., Anthony J. How were new medicines discovered? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2011; 10(7): 507–519. DOI: 10.1038/nrd3480
3. Eder J., Sedrani R., Wiesmann C. The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2014; 13(8): 577–587. DOI: 10.1038/nrd4336
4. Terstappen G.C., Schlüpen C., Raggiachi R., Gaviraghi G. Target deconvolution strategies in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007; 6(11): 891–903. DOI: 10.1038/nrd2410
5. Vincent F., Nueda A., Lee J., Schenone M., Prunotto M., Mercola M. Phenotypic drug discovery: recent successes, lessons learned and new directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2022; 21(12): 899–914. DOI: 10.1038/s41573-022-00472-w. Erratum in: *Nat. Rev. Drug Discov.* 2022; 21(7): 541. DOI: 10.1038/s41573-022-00503-6
6. Park H., Ha J., Park S.B. Label-free target identification in drug discovery via phenotypic screening. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2019; 50: 66–72. DOI: 10.1016/j.cbpa.2019.02.006
7. Vincent F., Loria P., Pregel M., Stanton R., Kitching L., Nocka K., Doyonnas R., Steppan C., Gilbert A., Schroeter T., Peakman M.C.

- Developing predictive assays: the phenotypic screening "rule of 3". *Sci. Transl. Med.* 2015; 7(293): 293ps15. DOI: 10.1126/scitranslmed.aab1201
8. Schiff L., Migliori B., Chen Y., Carter D., Bonilla C., Hall J., Fan M., Tam E., Ahadi S., Fischbacher B., Geraschenko A., Hunter C.J., Venugopalan S., DesMarreau S., Narayanaswamy A., Jacob S., Armstrong Z., Ferrarotto P., Williams B., Buckley-Herd G., Hazard J., Goldberg J., Coram M., Otto R., Baltz E.A., Andres-Martin L., Pritchard O., Duren-Lubanski A., Daigavane A., Reggio K.; NYSCF Global Stem Cell Array® Team; Nelson P.C., Frumkin M., Solomon S.L., Bauer L., Aiyar R.S., Schwarzbach E., Noggle S.A., Monsma F.J. Jr., Paull D., Berndt M., Yang S.J., Johannesson B. Integrating deep learning and unbiased automated high-content screening to identify complex disease signatures in human fibroblasts. *Nat. Commun.* 2022; 13(1): 1590. DOI: 10.1038/s41467-022-28423-4
 9. Кузнецова Л.В., Буданова О.П., Бахтина Л.Ю., Лобанов Е.В., Мальшев И.Ю. Наночастицы GO повышают эффективность фагоцитоза макрофагами в нормальной и опухолевой среде. *Патогенез.* 2023; 21(1): 22–7. DOI: 10.25557/2310-0435.2023.01.22-27
 10. Artificial Intelligence for Drug Discovery, Landscape Overview Q1 2022. Режим доступа: <https://www.deep-pharma.tech/ai-for-drug-discovery-q1-2022> Дата обращения: 01.12.2024
 11. Chandrasekaran S.N., Ceulemans H., Boyd J.D., Carpenter A.E. Image-based profiling for drug discovery: due for a machine-learning upgrade? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021; 20(2): 145–159. DOI: 10.1038/s41573-020-00117-w
 12. Caicedo J.C., Cooper S., Heigwer F., Warchal S., Qiu P., Molnar C., Vasilevich A.S., Barry J.D., Bansal H.S., Kraus O., Wawer M., Paavolainen L., Herrmann M.D., Rohban M., Hung J., Hennig H., Concannon J., Smith I., Clemons P.A., Singh S., Rees P., Horvath P., Lington R.G., Carpenter A.E. Data-analysis strategies for image-based cell profiling. *Nat. Methods.* 2017; 14(9): 849–863. DOI: 10.1038/nmeth.4397
 13. Seal S., Trapotsi M.A., Spjuth O., Singh S., Carreras-Puigvert J., Greene N., Bender A., Carpenter A.E. A Decade in a Systematic Review: The Evolution and Impact of Cell Painting. *bioRxiv* [Preprint]. 2024: 2024.05.04.592531. DOI: 10.1101/2024.05.04.592531
 14. Bray M.A., Singh S., Han H., Davis C.T., Borgeson B., Hartland C., Kost-Alimova M., Gustafsdottir S.M., Gibson C.C., Carpenter A.E. Cell Painting, a high-content image-based assay for morphological profiling using multiplexed fluorescent dyes. *Nat. Protoc.* 2016; 11(9): 1757–1774. DOI: 10.1038/nprot.2016.105
 15. *PhenoVue Cell Painting Kit*. Режим доступа: <https://resources.revvity.com/pdfs/prs-cell-painting-kit-10x-hca.pdf>. Дата обращения: 01.12.2024
 16. Gibson C.C., Zhu W., Davis C.T., Bowman-Kirigin J.A., Chan A.C., Ling J., Walker A.E., Goitre L., Delle Monache S., Retta S.F., Shiu Y.T., Grossmann A.H., Thomas K.R., Donato A.J., Lesniewski L.A., Whitehead K.J., Li D.Y. Strategy for identifying repurposed drugs for the treatment of cerebral cavernous malformation. *Circulation.* 2015; 131(3): 289–299. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.010403
 17. Белоусова О.Б., Булыгина Е.С., Окишев Д.Н., Прохорчук Е.Б., Цыганкова С.В., Пронин И.Н., Шишкина Л.В., Рыжова М.В., Скрябин К.Г., Коновалов А.Н. Анализ мутаций генов у больных с наследственными кавернозными мальформациями ЦНС. *Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова.* 2017; 117(6): 66–72. DOI: 10.17116/jnevro201711716166-72
 18. Ali Zaidi S.S., Fatima F., Ali Zaidi S.A., Zhou D., Deng W., Liu S. Engineering siRNA therapeutics: challenges and strategies. *J. Nanobiotechnology.* 2023; 21(1): 381. DOI: 10.1186/s12951-023-02147-z

References

1. Hitchings G.H. *Banquet speech* Available at: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1988/hitchings/speech/> Retrieved: 01.12.2024
2. Swinney D.C., Anthony J. How were new medicines discovered? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2011; 10(7): 507–519. DOI: 10.1038/nrd3480
3. Eder J., Sedrani R., Wiesmann C. The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2014; 13(8): 577–587. DOI: 10.1038/nrd4336
4. Terstappen G.C., Schlüpen C., Raggiachi R., Gaviraghi G. Target deconvolution strategies in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007; 6(11): 891–903. DOI: 10.1038/nrd2410
5. Vincent F., Nueda A., Lee J., Schenone M., Prunotto M., Mercola M. Phenotypic drug discovery: recent successes, lessons learned

- and new directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2022; 21(12): 899–914. DOI: 10.1038/s41573-022-00472-w. Erratum in: *Nat. Rev. Drug Discov.* 2022; 21(7): 541. DOI: 10.1038/s41573-022-00503-6
6. Park H., Ha J., Park S.B. Label-free target identification in drug discovery via phenotypic screening. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2019; 50: 66–72. DOI: 10.1016/j.cbpa.2019.02.006
 7. Vincent F., Loria P., Pregel M., Stanton R., Kitching L., Nocka K., Doyonnas R., Steppan C., Gilbert A., Schroeter T., Peakman M.C. Developing predictive assays: the phenotypic screening "rule of 3". *Sci. Transl. Med.* 2015; 7(293): 293ps15. DOI: 10.1126/scitranslmed.aab1201
 8. Schiff L., Migliori B., Chen Y., Carter D., Bonilla C., Hall J., Fan M., Tam E., Ahadi S., Fischbacher B., Geraschenko A., Hunter C.J., Venugopalan S., DesMarteau S., Narayanaswamy A., Jacob S., Armstrong Z., Ferrarotto P., Williams B., Buckley-Herd G., Hazard J., Goldberg J., Coram M., Otto R., Baltz E.A., Andres-Martin L., Pritchard O., Duren-Lubanski A., Daigavane A., Reggio K.; NYSCF Global Stem Cell Array® Team; Nelson P.C., Frumkin M., Solomon S.L., Bauer L., Aiyar R.S., Schwarzbach E., Noggle S.A., Monsma F.J. Jr., Paull D., Berndt M., Yang S.J., Johannesson B. Integrating deep learning and unbiased automated high-content screening to identify complex disease signatures in human fibroblasts. *Nat. Commun.* 2022; 13(1): 1590. DOI: 10.1038/s41467-022-28423-4
 9. Kuznetsova L.V., Budanova O.P., Bakhtina L.Yu., Lobanov E.V., Malyshev I.Yu. [GO nanoparticles increase the efficiency of phagocytosis by macrophages in normal and tumor environments] *Pathogenesis [Pathogenesis]*. 2023; 21(1): 22–27. DOI: 10.25557/2310-0435.2023.01.22-2 (in Russian)
 10. Artificial Intelligence for Drug Discovery, Landscape Overview Q1 2022. Available at: <https://www.deep-pharma.tech/ai-for-drug-discovery-q1-2022> Retrieved: 01.12.2024
 11. Chandrasekaran S.N., Ceulemans H., Boyd J.D., Carpenter A.E. Image-based profiling for drug discovery: due for a machine-learning upgrade? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021; 20(2): 145–159. DOI: 10.1038/s41573-020-00117-w
 12. Caicedo J.C., Cooper S., Heigwer F., Warchal S., Qiu P., Molnar C., Vasilevich A.S., Barry J.D., Bansal H.S., Kraus O., Wawer M., Paavolainen L., Herrmann M.D., Rohban M., Hung J., Hennig H., Concannon J., Smith I., Clemons P.A., Singh S., Rees P., Horvath P., Lington R.G., Carpenter A.E. Data-analysis strategies for image-based cell profiling. *Nat. Methods.* 2017; 14(9): 849–863. DOI: 10.1038/nmeth.4397
 13. Seal S., Trapotsi M.A., Spjuth O., Singh S., Carreras-Puigvert J., Greene N., Bender A., Carpenter A.E. A Decade in a Systematic Review: The Evolution and Impact of Cell Painting. *bioRxiv* [Preprint]. 2024: 2024.05.04.592531. DOI: 10.1101/2024.05.04.592531
 14. Bray M.A., Singh S., Han H., Davis C.T., Borgeson B., Hartland C., Kost-Alimova M., Gustafsdottir S.M., Gibson C.C., Carpenter A.E. Cell Painting, a high-content image-based assay for morphological profiling using multiplexed fluorescent dyes. *Nat. Protoc.* 2016; 11(9): 1757–1774. DOI: 10.1038/nprot.2016.105
 15. *PhenoVue Cell Painting Kit*. Available at: <https://resources.revvy.com/pdfs/prs-cell-painting-kit-10x-hca.pdf>. Retrieved: 01.12.2024
 16. Gibson C.C., Zhu W., Davis C.T., Bowman-Kirigin J.A., Chan A.C., Ling J., Walker A.E., Goitre L., Delle Monache S., Retta S.F., Shiu Y.T., Grossmann A.H., Thomas K.R., Donato A.J., Lesniewski L.A., Whitehead K.J., Li D.Y. Strategy for identifying repurposed drugs for the treatment of cerebral cavernous malformation. *Circulation.* 2015; 131(3): 289–299. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.010403
 17. Belousova O.B., Bulygina E.S., Okishev D.N., Prokhorchuk E.B., Tsygankova S.V., Pronin I.N., Shishkina L.V., Ryzhova M.V., Skryabin K.G., Konovalov A.N. [Gene mutations in patients with hereditary cavernous malformations]. *Zhurnal neurologii i psichiatrii imeni S.S. Korsakova [S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry]*. 2017; 117(6): 66–72. DOI: 10.17116/jnevro20171176166-72 (in Russian)
 18. Ali Zaidi S.S., Fatima F., Ali Zaidi S.A., Zhou D., Deng W., Liu S. Engineering siRNA therapeutics: challenges and strategies. *J. Nanobiotechnol.* 2023; 21(1): 381. DOI: 10.1186/s12951-023-02147-z

Сведения об авторах:

Кузнецова Лариса Вячеславовна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных биотехнологий Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации; <https://orcid.org/0000-0002-3030-2064>

Шабунина Элина Алексеевна — врач, руководитель клиники косметологии и эстетической медицины Общества с ограниченной ответственностью «Медицинский центр Елены Малышевой»

Буданова Ольга Петровна — старший научный сотрудник лаборатории регуляторных механизмов стресса и адаптации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0002-6650-5082>

Гусева Мария Николаевна — доктор экономических наук, профессор, профессор кафедры управления проектом Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Государственный университет управления»; <https://orcid.org/0000-0002-5576-6164>

Малышев Игорь Юрьевич — доктор медицинских наук, директор научно-образовательного института фундаментальной медицины имени В.И. Покровского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации; заведующий лабораторией регуляторных механизмов стресса и адаптации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <http://orcid.org/0000-0002-2381-961>