

## ОБЗОРЫ

УДК 577.1.

©Коллектив авторов

### МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВАЛИДАЦИИ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ-МИШЕНЕЙ ДЛЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

А.С.Иванов, А.В.Веселовский, А.И.Арчаков

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН  
Россия, 119121, Москва, Погодинская ул. 10;  
эл. почта: alexei.ivanov@ibmc.msk.ru, факс: (095) 245-0857

Обзор посвящен описанию основных существующих и разрабатываемых технологий для экспериментальной валидации потенциальных белков-мишеней, предсказанных *in silico* методами сравнительной геномики и биоинформатики. Так как эта проблема на настоящий момент до конца не решена, то в обзоре приведено описание широкого круга методов, пригодных для валидации потенциальных мишеней.

В обзоре рассмотрены: (1) применение протеомных технологий (контроль экспрессии потенциальных белков-мишеней и их вариабельности, анализ белок-белковых взаимодействий), (2) геномные технологии в экспериментальной валидации мишеней (инактивация целевого гена, подавление транскрипции, разрушение целевой мРНК, подавление трансляции); (3) методы прямой инактивации целевого белка (моноклональные антитела, фотоинактивация белков, одноцепочечные и внутриклеточные антитела, аптамеры), (4) высокопроизводительные технологии, (5) валидация мишеней *in vivo*.

**Ключевые слова:** валидация мишеней, белок-мишень, геномика, протеомика, интерференция РНК, антисенс-РНК, аптамеры, лазерная инактивация, модели *in vivo*

**ВВЕДЕНИЕ.** По оценкам ведущих фармацевтических компаний, процесс создания принципиально нового лекарства (от НИР до серийного производства) в настоящее время занимает не менее 12-15 лет, а общая стоимость такого проекта может достигать 800 миллионов долларов [1, 2]. Ускорить процесс и частично сократить огромные затраты можно только на первоначальных этапах НИР, связанных с нахождением новых биологически активных веществ - прототипов будущего лекарства. Последующие этапы проекта, связанные с доклиническими и клиническими испытаниями, в значительной степени регламентированы государственными законами и правилами, что фактически исключает возможность сокращения сроков и материальных затрат.

В последние 10-15 лет при создании новых лекарств наряду с экспериментальными подходами активно стали использовать новейшие биоинформационные технологии [3-6]. Замена части реальных экспериментов на

## ВАЛИДАЦИЯ БЕЛКОВ-МИШЕНЕЙ ДЛЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВ

виртуальные, моделируемые на компьютере, нацелена в первую очередь на ускорение и оптимизацию процесса нахождения веществ-прототипов новых лекарств [7]. Одним из самых современных направлений является создание структур-прототипов на основе моделирования взаимодействия низкомолекулярного лиганда с белком-мишенью (компьютерное конструирование лекарств на основе структуры макромолекулы-мишени). На текущий момент число известных белков-мишеней, на которые действуют существующие лекарства, составляет несколько сотен [8-10]. Считается, что применение современных биоинформационных подходов сможет увеличить число потенциальных мишеней до нескольких тысяч, что приведет к созданию лекарств нового поколения [11]. Это стало возможно благодаря быстрому росту числа полностью расшифрованных геномов различных организмов, которое превысило уже сотню [12].

В последнее время активно обсуждаются проекты полной интеграции различных подходов в единую платформу "От гена до прототипа лекарства", представляющую собой научно-исследовательский конвейер, оптимизирующий весь первый этап создания лекарства - начиная с поиска новой макромолекулы-мишени и кончая получением высокоэффективного вещества-прототипа будущего лекарства (рис. 1). Некоторые блоки платформы являются чисто виртуальными, использующими современные биоинформационные технологии, в то время как другие блоки представляют собой различные экспериментальные методы, без которых невозможна реализация всей платформы. Необходимо особо подчеркнуть, что компьютерные технологии позволяют значительно сократить материальные затраты и время выполнения исследований, но не могут полностью заменить реальные эксперименты.

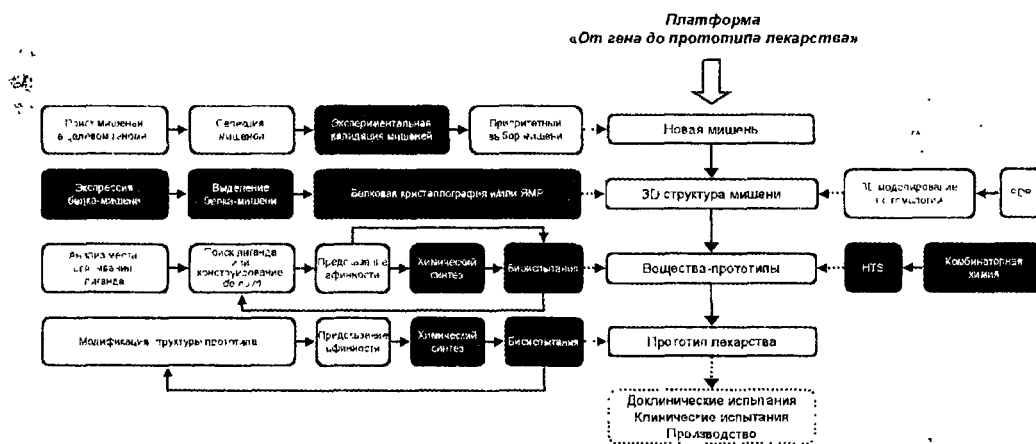


Рисунок 1.

Основные этапы платформы "От гена до прототипа лекарства" и их реализация *in silico* и *in vitro*.

Блоки реальных экспериментов (*in vitro*) и виртуальных экспериментов (*in silico*) обозначены черным и белым цветом, соответственно. PDB - белковая база данных (Protein Data Base, [136]); HTS - высокоэффективный скрининг (High-Throughput Screening)

Самым "узким" и, в тоже время, самым важным моментом в реализации платформы "От генома до прототипа лекарства", несомненно, является экспериментальная валидация потенциальных белков-мишеней [13, 14], найденных с помощью сравнительного анализа геномных данных [15-18]. Без экспериментальной валидации потенциальных мишеней не может быть осуществлен окончательный выбор мишени, определяющий все последующие этапы проекта (см. рис. 1). Так как реализация всего проекта связана со значительными временными и материальными затратами, то цена ошибки в выборе наиболее перспективного белка-мишени очень велика, и данный этап,

несомненно, играет ключевую роль. В случае выбора нескольких белков-мишеней проект неизбежно разделится на несколько независимых проектов с увеличением общих затрат пропорционально числу выбранных мишеней.

Не требующий больших затрат первичный поиск новых мишеней путем сравнительного анализа геномных данных может дать список потенциальных белков-мишеней, состоящий из нескольких сотен белков. Последующая селекция потенциальных мишеней на основе дополнительной информации из аннотированных баз данных и/или вычисленной с помощью биоинформационных методов (предсказание функции белка, метаболической роли, белок-белковых взаимодействий) может сократить их число до нескольких десятков.

Необходимо отметить, что полученный таким образом список потенциальных белков-мишеней является чисто гипотетическим, так как представляет собой результат компьютерных предсказаний, сделанных с огромным числом допущений и упрощений. Поэтому предсказанные потенциальные белки-мишени должны быть проверены в реальных экспериментах по валидации мишеней. Основной целью данного этапа является максимальное сокращение списка потенциальных мишеней (до нескольких белков, а в идеале - до одного). Кроме того, экспериментальная валидация может дать дополнительную информацию для оценки приоритетности выбора мишени для успешной реализации проекта. Окончательный выбор мишени в любом случае должен делать супервизор проекта, понимая всю ответственность и цену возможной ошибки.

Данный обзор посвящен описанию существующих и разрабатываемых технологий для экспериментальной валидации потенциальных белков-мишеней, предсказанных теоретически методами сравнительной геномики и биоинформатики. Отметим, что проблема валидации мишеней находится только в начальной стадии своего решения и существующие подходы выглядят крайне разнопланово.

Для первоначальной валидации потенциальных белков-мишеней должны быть использованы методы протеомики. Они позволяют проконтролировать экспрессию целевого белка, а также исследовать белок-белковые взаимодействия. Дальнейшая валидация потенциальных мишеней может быть осуществлена с помощью различных подходов, в основе которых лежит одна общая идея - проверить функциональную важность потенциальной мишени путем ее инактивации тем или иным способом (рис. 2). В быстро растущих клетках это может быть достигнуто с помощью геномных методов блокирования экспрессии белка на различных стадиях

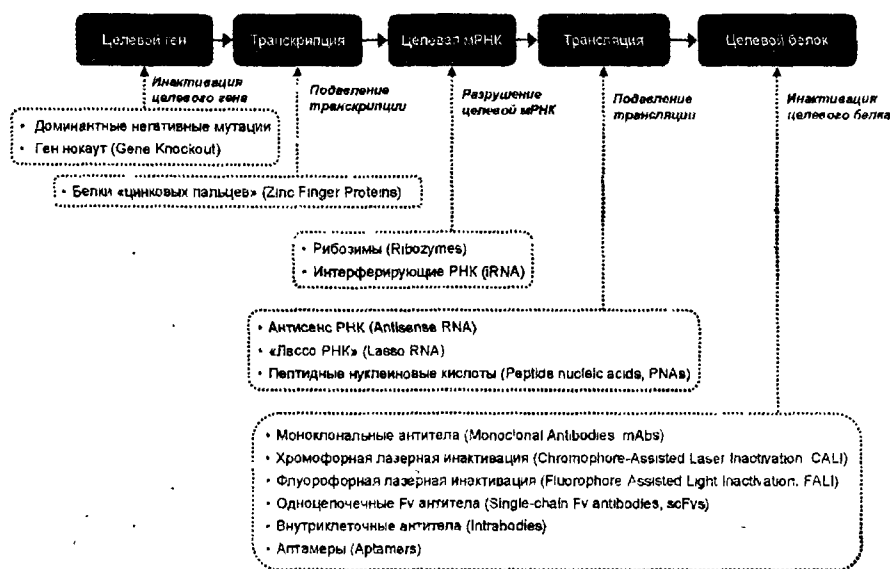


Рисунок 2.

Экспериментальные подходы в функциональной валидации потенциального белка-мишени.

от гена до продукта. В тоже время, в объектах, где потенциальные белки-мишени существуют длительное время и обновляются крайне медленно, более перспективными являются методы прямой инактивации самих белков.

### **1. Протеомные технологии в экспериментальной валидации потенциальных белков-мишеней**

Протеомные методы используются в качестве предварительной валидации потенциальных мишеней с целью удаления из списка тех белков, которые не отвечают самым общим критериям, предъявляемым к мишеням (экспрессия целевого белка, отсутствие вариативности экспрессии, мутационной изменчивости и т.д.) [19-23].

#### *1.1. Контроль экспрессии потенциальных белков-мишеней*

Прежде всего исследователи должны убедиться, что потенциальные белки-мишени, предсказанные методами биоинформатики на основе анализа геномных данных, реально экспрессируются и присутствуют в клетках целевого организма. Для этого используется уже ставшая стандартной схема протеомного анализа, представляющая собой интеграцию экспериментальных и биоинформационных подходов (рис. 3)

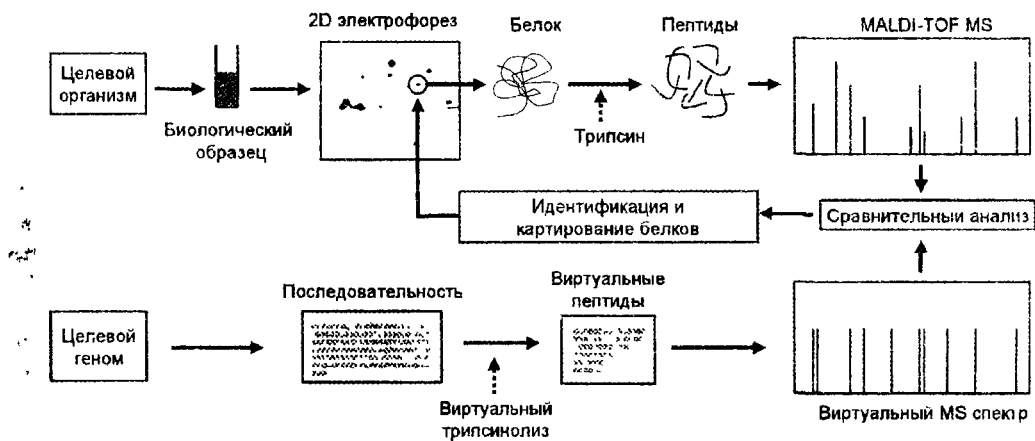


Рисунок 3.

Схема стандартного протеомного анализа и картирования белков целевого организма

В ряде случаев, в зависимости от цели проекта, необходим протеомный анализ большого числа образцов. Например, если конечной целью проекта является создание антимикробного средства с широким спектром действия (действующего на определенную группу или несколько групп микроорганизмов), то необходим контроль экспрессии потенциальных белков-мишеней у всех представителей выбранных групп микроорганизмов.

#### *1.2. Контроль возможной вариативности потенциальных белков-мишеней*

Помимо проверки самого факта экспрессии потенциального белка-мишени, исследователи должны убедиться в отсутствии индивидуальной вариативности экспрессии данного белка (стабильность координат пятна белка на белковой карте, полученной с помощью двухмерного электрофореза) и отсутствие мутаций (масс-спектрометрический анализ). Для этой цели необходимо выполнить сравнительный анализ протеомных карт нескольких целевых организмов. Обнаруженная вариативность экспрессии целевого белка может быть расценена как неблагоприятный фактор для выбора данной мишени.

В случае создания противомикробного средства широкого спектра действия (пример, приведенный в п. 1.1.) - должны быть получены протеомные карты различных штаммов всех целевых микроорганизмов и выполнен их сравнительный анализ. При обнаружении вариативности экспрессии целевого

белка, такая потенциальная мишень может быть исключена из списка, так как существует вероятность проявления в будущем мутационной лекарственной резистентности.

### 1.3. Анализ белок-белковых взаимодействий

В последнее время активно обсуждается вопрос о перспективности создании лекарств нового поколения, действующих не на одиночные белки-мишени, а на молекулярные ансамбли, путём модуляции их функции [24]. В основе работы таких ансамблей лежат процессы молекулярного узнавания и белок-белковых взаимодействий. В частности, активно разрабатываются подходы к созданию ингибиторов димеризации белков [25, 26].

Быстро развивающиеся протеомные методы анализа белок-белковых взаимодействий позволяют получить определенную функциональную аннотацию белков [27-29]. На основе этой дополнительной информации исследователи могут произвести отбор потенциальных белков-мишеней, работающих в составе надмолекулярных комплексов [30].

## 2. Геномные технологии в экспериментальной валидации потенциальных белков-мишеней

Дальнейшая валидация потенциальных мишеней, успешно прошедших проверку протеомными методами, может быть осуществлена с помощью различных геномных методов [14, 30-32]. Большинство из этих подходов основано на одной общей идее - выяснить функциональную важность потенциального белка-мишени путем блокирования тем или иным способом его экспрессии на различных этапах пути "от гена до белка" (рис. 2). Геномные методы блокирования экспрессии белка наиболее предпочтительны для быстро растущих клеток.

Ниже дается краткий обзор различных подходов на примере валидации потенциальных мишеней для создания новых антимикробных средств.

### 2.1. Инактивация целевого гена

#### 2.1.1. Доминантные негативные мутации

Этот подход основан на создании таких мутаций, которые нарушают функцию экспрессируемого мутантного белка и одновременно такой белок ингибирует функцию белка дикого типа [33]. Доминантные отрицательные мутанты уже были успешно использованы для понимания молекулярных механизмов функционирования некоторых семейств белков (например, рецепторы факторов роста и ряда гормонов). Этот метод может быть использован для изучения различных типов белков, но наиболее эффективен он для белков, которые функционируют в виде мультимерных комплексов.

#### 2.1.2. Нокаут гена (Gene Knockout)

Нокаут гена (или просто нокаут) - это метод, позволяющий генетически сконструировать организм-мутант, который несет один или несколько генов, функция которых была полностью элиминирована ("null allele" или "silent allele" - молчащий (нулевой) аллель, потерявший способность экспрессироваться в результате мутаций). Нокауты, главным образом, применяются для изучения секвенированного гена с неизвестной или не полностью известной функцией [32, 34]. Исследователи делают выводы о функции гена на основе наблюдаемых различий между нормальным организмом и нокаутом.

### 2.2. Подавление транскрипции

#### 2.2.1. Белки "цинковые пальцы" (Zinc-Finger Proteins)

Белки типа "цинковые пальцы" (БЦП) принадлежат к группе факторов транскрипции и составляют одно из самых больших индивидуальных семейств (>1000 последовательностей) [35]. БЦП имеют характерный структурный элемент ("цинковый палец"), состоящий из короткого двухтяжевого антипараллельного  $\beta$ -листа и  $\alpha$ -спирали. Две пары консервативных остатков гистидина и цистеина в  $\alpha$ -спирали и во втором  $\beta$ -тяже удерживают координатными связями один ион цинка. Эти белки содержат по несколько "пальцев", которые могут встраиваться с высокой селективностью в большую бороздку  $\alpha$ -спирали ДНК и охватывать молекулу по спирали (рис. 4). Избирательность БЦП можно изменять путем

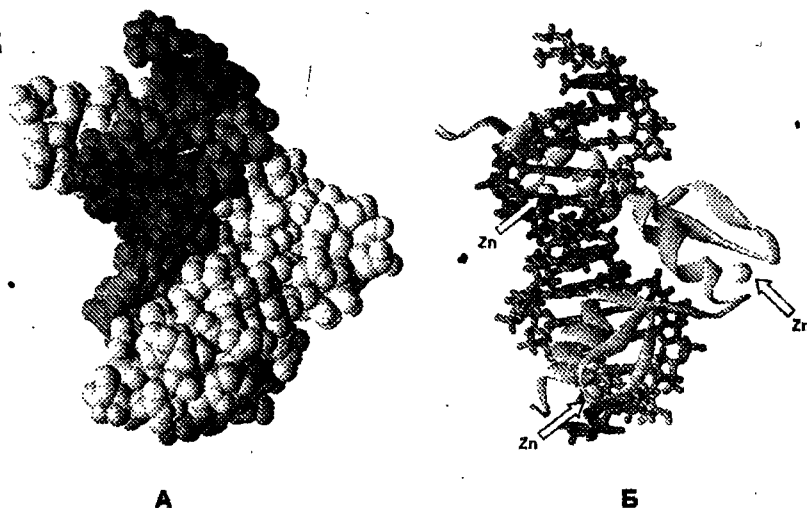


Рисунок 4.

Пример структуры комплекса ДНК с белком "цинковых пальцев". Координаты комплекса синтетического фрагмента ДНК и селективного к нему сконструированного белка "цинковых пальцев" [137] взяты из PDB (индекс 1MEY). А - общий вид комплекса (белок "цинковых пальцев" и двойная спираль ДНК обозначены светлым и темным цветом, соответственно); Б - схематическое представление комплекса (видно, что белок содержит три "цинковых пальца"). Стрелками показаны атомы цинка.

вариации числа "пальцев" в белке и с помощью мутаций в самих "пальцах" (позиции аминокислотных остатков 1, 2, 3 и 6 относительно начала  $\alpha$ -спирали) [36-38]. С помощью методов генной инженерии конструируются различные варианты БЦП, которые как факторы транскрипции могут регулировать работу любых целевых генов. Все перечисленные особенности позволяют использовать БЦП для экспериментальной валидации потенциальных белков-мишеней путем блокирования транскрипции их генов.

### 2.3. Разрушение целевой мРНК

#### 2.3.1. Рибозимы

Рибозимы - это молекулы РНК (олигонуклеотиды), обладающие каталитической активностью (без каких-либо белков). Природные рибозимы катализируют реакции, которые могут быть как внутримолекулярные (автокатализ), например, авто-сплайсинг или само-расщепление, так и межмолекулярные, в которых в качестве субстрата выступают другие РНК или ДНК [39]. Большое число каталитических (рибозимных) мотивов было найдено как в природных РНК, так и путем селекции *in vitro* [40]. Примеры некоторых рибозимных мотивов приведены на рисунке 5. На основе самого маленького из найденных в природе рибозимных мотивов, так называемого "головка молотка" (hammerhead), конструируются и синтезируются искусственные рибозимы. Они довольно часто используются в экспериментах в качестве высокоактивных агентов, разрушающих мРНК [41]. Такие искусственные рибозимы представляют собой очень удобный инструмент для селективного ингибирования целевых мРНК [42]. В настоящее время широко обсуждается возможность применения данного подхода для экспериментальной валидации потенциальных мишеней [43, 44].

#### 2.3.2. Интерферирующие РНК

Открытие явления интерференции РНК является поистине революционным за последние десять лет [45, 46]. Этот феномен обусловлен действием так называемых интерферирующих РНК (иРНК) и выражается в остановке экспрессии целевого гена. В настоящее время в научной литературе нет полной унификации названия и обозначения интерферирующих РНК - siRNA, iRNA, RNAi и т.д.

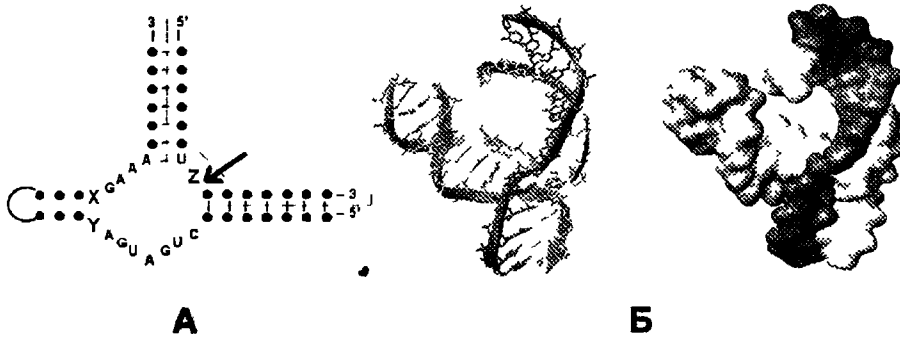


Рисунок 5

Пример структуры комплекса рибозима с ДНК. Координаты комплекса рибозимного РНК-мотива "головка молотка" (hammerhead RNA) и синтетического фрагмента ДНК взяты из PDB (индекс 1НМН). А - схематическое представление комплекса (где X = С или Т, Y = А или Г, Z = А, Т или С), стрелкой показано место "разрезания" цепи ДНК. Б - трехмерная структура комплекса рибозима и ДНК (светлая и темная молекулы, соответственно).

Интерферирующие РНК представляют собой относительно короткие (порядка 20 оснований) двухцепочечные РНК [47], в которых основания противоположных цепей соединены по тем же самым законам как в цепях ДНК. Кроме того, концы каждой из цепей иРНК всегда содержат два непарных нуклеотида. Принцип действия иРНК показан на рис 6.

Когда иРНК появляется внутри клетки, она связывается со сложным белковым комплексом RISC (RNA-Induced Silencing Complex), в состав которого входят два фермента - хеликаза и нуклеаза. Далее хеликаза раскручивает и разъединяет цепи двойной спирали иРНК. Та цепь иРНК, которая остается связанной с нуклеазой, специфически взаимодействует с комплементарным участком целевой мРНК, и нуклеаза разрезает последнюю. Образовавшиеся части мРНК далее разрушаются под действием других клеточных РНКаз. Таким образом, основной функцией иРНК является эффективное и специфическое блокирование экспрессии целевого гена (target gene knockdown) путем разрушения целевой мРНК. Технологии с использованием иРНК находят широкое применение в экспериментальной валидации мишеней в разнообразных типах клеточных культур [48, 49]. Используются как химически синтезированные иРНК, так и экспрессионные векторы, кодирующие иРНК. Данный подход оказался рентабельным для использования в высокопроизводительных системах (High-Throughput Systems, HTS) [50-52].

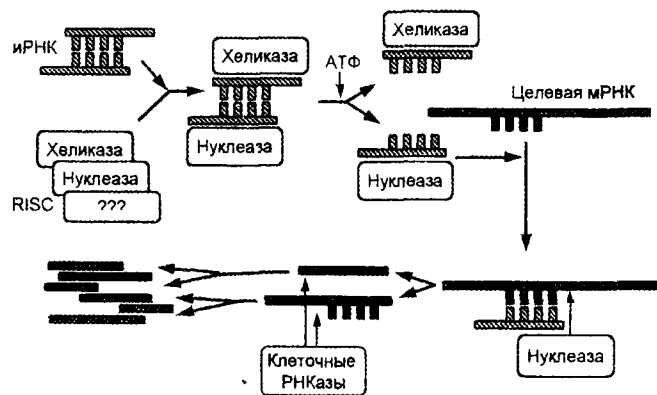


Рисунок 6

Схема действия иРНК. Объяснения - в тексте.

## 2.4 Подавление трансляции

### 2.4.1 Антисенс-РНК

Последовательность мРНК, несущую информацию для синтеза целевого белка, часто называют "сенсом". Соответственно антисенсом называется "кусочек" РНК (олигонуклеотид порядка 20 оснований) комплементарный по своей последовательности целевому участку сенса. Два этих типа РНК (сенс и антисенс) специфически взаимодействуют друг с другом с образованием дуплекс-комплекса по типу двухцепочечной ДНК (рис. 7А). После образования данного комплекса экспрессия целевого белка ингибируется на стадии трансляции, так как рибосома не может получить доступ к нуклеотидам мРНК [53-54]. Действие антисенса является временным, так как в клетках дуплекс-РНК довольно быстро разрушаются рибонуклеазами. Практика использования антисенсов показывает, что они проявляют ингибирующую активность в отношении целевого гена на 40-95%. Проблема доставки антисенса внутрь клетки как правило решается с помощью рекомбинантных ДНК путем введения синтетических генов, кодирующих антисенс-РНК. Технологии антисенс-РНК широко используются в экспериментальной валидации потенциальных белков-мишеней путем временного блокирования функции целевых генов [55-62].

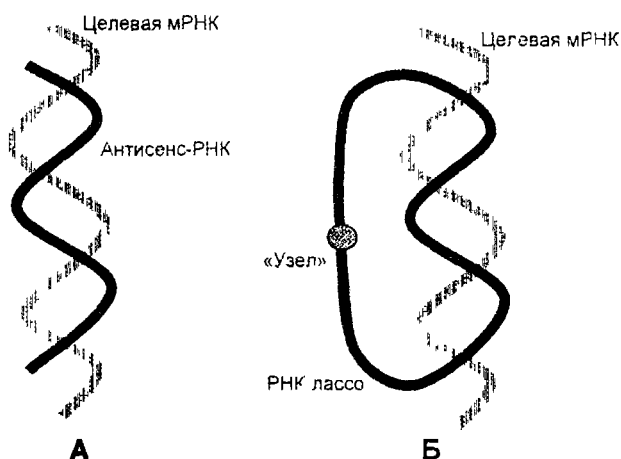


Рисунок 7

Схема взаимодействия антисенс-РНК (А) и РНК-лассо (Б) с целевой мРНК

В настоящее время для ускорения работы с антисенс-РНК используют специальные библиотеки, содержащие тысячи вариантов антисенс-олигонуклеотидов, и методы высокоэффективного скрининга (HTS) [63].

### 2.4.2 РНК-лассо

Фирма "SomaGenic" разработала технологию "РНК-лассо" (RNA Lassos), предназначенную для валидации новых мишеней [64]. Данная технология базируется на принципе антисенс-РНК. Также как и обычные антисенсы РНК-лассо связывается с целевой мРНК с высокой специфичностью (в случае 20-нуклеотидного узнающего элемента наблюдаются только одиночные ошибки), его прочность связывания значительно выше, и образованный комплекс не разрушается при действии рибосомальных хеликаз во время трансляции. Это обусловлено тем, что концы РНК-лассо могут взаимодействовать друг с другом, образуя "узел" и замыкая всю молекулу в кольцевую структуру (рис. 7Б). По сравнению с большинством других РНК, РНК-лассо имеют значительно более высокую стабильность, из-за своей кольцевой структуры и более плотного фолда. Комплексы РНК-лассо с мишенью (мРНК) в условиях *in vitro* термостабильны до 95°C. В тех случаях, когда обычные антисенсы были не эффективны, РНК-лассо показали эффективность до 98% в блокировании трансляции с целевых сайтов.



РНК-лассо может быть доставлено в клетки в виде образца ДНК, который проходит транскрипцию *in situ*. В ряде экспериментов было показано, что РНК-лассо без каких-либо химических модификаций в комплексе с катионными липидами остаются стабильными в различных биологических жидкостях и не подвергаются действию нуклеаз *in vivo*. Так РНК-лассо, введенные мышам в комплексе с катионными липидами и позже выделенные из макрофагов, оставались интактными через 24 часа после инъекции [64]. Эти свойства делают технологию РНК-лассо предпочтительным выбором для ингибирования экспрессии генов в живых клетках и организмах для валидации потенциальных белков-мишеней

#### 2.4.3. Пептидные нуклеиновые кислоты

Данный подход базируется на использовании искусственных аналогов олигонуклеотидов, построенных на основе полиамидной цепи (подобно пептидам) с прикрепленными нуклеиновыми основаниями [65-68], и представляет собой некоторую альтернативу антисенс-технологиям. Такие аналоги олигонуклеотидов были названы пептидными нуклеиновыми кислотами (ПНК) (Peptide nucleic acids, PNAs). ПНК могут связываться с ДНК и РНК с высокой эффективностью, подобно обычным антисенсам, и образовывать крайне стабильные ПНК/ДНК и ПНК/РНК дуплексы. Подобные комплексы не токсичны и не подвержены действию деградирующих ферментов [69, 70]. Некоторые ПНК, например, гомопиримидин-ПНК или ПНК с высоким соотношением пиримидин/пурин, могут образовывать высокостабильные комплексы с ДНК или РНК в виде тройных спиралей [71]. Теоретически, ПНК могут стать реальной заменой антисенс-РНК технологии в экспериментальной валидации потенциальных мишеней [72]. Основным препятствием является дорогостоящий химический синтез ПНК, однако уже есть первые примеры успешного использования ПНК. Так, например, осуществлялось ингибирование работы целевых генов с помощью ПНК в экспериментах *in vivo* на рыбе-зебре *Danio rerio* [73].

### 3. Инактивация целевого белка

Методы прямой инактивации целевого белка наиболее перспективны в тех случаях, когда потенциальные белки-мишени функционируют длительное время, и их обновление происходит крайне медленно.

#### 3.1. Моноклональные антитела

Использование природных антител является одним из старейших методов целевого воздействия на белки. Хорошо известно, что антитела могут взаимодействовать с целевыми белками с очень высокой специфичностью [74]. К сожалению, только около 0,5% целевых белков теряют при действии антител свою функциональную активность [47, 75], что делает невозможным использование только одних антител для валидации потенциальных белков-мишеней. Поэтому активно разрабатываются новые технологии, базирующиеся на комбинации моноклональных антител, обеспечивающих избирательное взаимодействие, и различных нейтрализующих агентов. В качестве примера можно привести подход, основанный на использовании антител, сопряженных с хромофорными группами для необратимой инактивации целевого белка при поглощении лазерного излучения [47].

##### 3.1.1. Хромофор-опосредованная лазерная инактивация

Данный подход в научной литературе получил обозначение CALI (Chromophore-Assisted Laser Inactivation). Он базируется на использовании химически сшитого комплекса моноклонального антитела, способного специфически связываться с целевым белком, и хромофора (обычно для этих целей используется краситель малахитовый зеленый). Этот комплекс может взаимодействовать с целевым белком и инактивировать его с помощью фотохимической реакции при лазерном облучении. В зависимости от типа хромофора средний радиус повреждения мишени колеблется от 15 до 40 Å [76]. Этого вполне достаточно для того, чтобы инактивировать целевой белок или даже

одну субъединицу внутри мультимерного белкового комплекса, но не повреждать соседние белки. В технологии CALI могут быть успешно применены более 90% всех антител [47]. Первоначально CALI была применена для исследования функции одиночных белков клеточных поверхностей путем их инактивации непосредственно на поверхности живых клеток [77]. В ряде работ CALI пытаются использовать для анализа функции белков как *in vivo*, так и *in vitro* [78].

### 3.1.2. Флуорофор-опосредованная световая инактивация

Аналогом CALI стала недавно разработанная новая технология, названная FALI (Fluorophore-Assisted Light Inactivation) [79]. Она также базируется на использовании меченных моноклональных антител для световой инактивации целевых белков. В методе FALI может быть использован как когерентный (лазерный), так и рассеянный свет, поглощаемый флуоресцеин-мечеными антителами. Радиус зоны повреждения составляет примерно 40 Å. Преимуществом метода FALI является возможность одновременного освещения большого числа многолучных планшетов и, таким образом, создается пригодность для высокопроизводительных технологий скрининга (HTS) [80].

### 3.2. Одноцепочечные антитела

Классические антитела (иммуноглобулины) состоят из двух идентичных "легких" цепей (L) и двух идентичных "тяжелых" цепей (H) (рис. 8А). Легкие цепи состоят из одного консервативного и одного вариабельного доменов ( $V_L$ ), тяжелые цепи - из трех консервативных и одного вариабельного доменов ( $V_H$ ). Тяжелые цепи ковалентно соединены друг с другом в "петлевой" области, и, кроме того, легкие цепи ковалентно соединены с тяжелыми. Вариабельные H и L домены формируют антиген-связывающую область молекулы иммуноглобулина, обозначаемую Fv. Одноцепочечные Fv антитела (single chain Fv antibodies, scFvs) представляют собой относительно небольшие одноцепочечные полипептиды (около 30 кДа, т.е. примерно в 6 раз меньше природных антител), сконструированные из двух участков Fab фрагмента обычных антител [81, 82] (рис. 8Б). Тяжелый ( $V_H$ ) и легкий ( $V_L$ ) вариабельные участки соединены гибким, достаточно длинным линкером (обычно из остатков глицина) для объединения доменов. Наиболее популярный путь получения scFvs - это фаговые библиотеки (phage display libraries) [83] или гибридные технологии [84]. Основным преимуществом scFvs по сравнению с обычными антителами является их гомогенность, небольшие размеры и отсутствие Fc доменов, что увеличивает их проникновение через клеточные мембраны и снижает иммуногенность. Кроме того, scFvs неспособны связываться с Fc рецепторами, находящимися на поверхности обычных клеток. Таким образом, scFvs являются серьезной альтернативой обычным моноклональным антителам и могут быть использованы

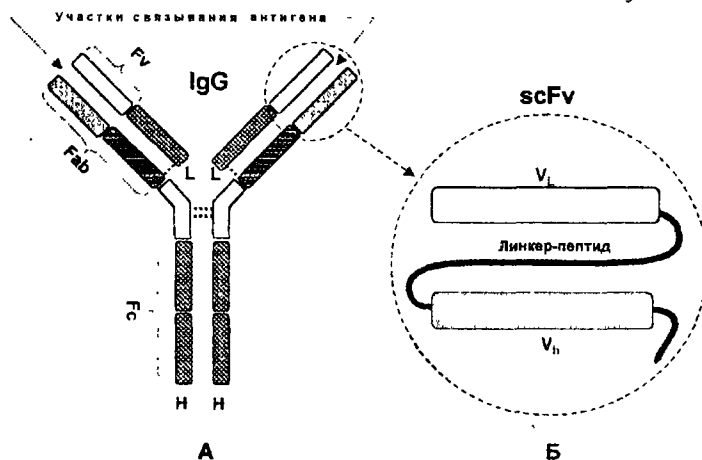


Рисунок 8.

Структура иммуноглобулина (IgG) и одноцепочечного Fv антитела (scFvs).

в соответствующих подходах по экспериментальной валидации потенциальных мишеней, где применяются антитела

### 3.3. Внутриклеточные антитела (*intrabodies*)

Последнее достижение в конструировании искусственных антител - это кодирование в генах антиген-связывающих доменов и их экспрессия внутри клетки в виде внутриклеточных антител. Они представляют собой те же одноцепочечные антитела scFv (см. 3.2) [85-88]. Данные антитела могут ингибировать функционирование целевого белка, блокировать белок-белковые взаимодействия или действовать на отдельные домены в белковых комплексах. Все эти свойства делают внутриклеточные антитела очень перспективным инструментом для экспериментальной валидации потенциальных мишеней как в клеточных культурах, так и *in vivo* [89].

### 3.4. Аптамеры

Аптамерами называют синтетические РНК или ДНК олигонуклеотиды (порядка 5 - 25 кДа), которые подобно антителам способны связываться с высокой специфичностью с разнообразными целевыми белками [90, 91]. Обычно они имеют аффинность в наномолярном диапазоне и очень высокую специфичность [92]. В отличие от антител, которые обычно получают из организмов экспериментальных животных, аптамеры получают с помощью методов селекции *in vitro*. Кроме того, они могут селективно связываться с любыми мишенями, в том числе и неиммунногенными, против которых обычные антитела не могут быть получены [93]. Аптамеры могут быть синтезированы *in vitro* в виде случайной комбинаторной библиотеки (до  $10^{15}$  различных молекул), быстро изолированы и размножены с помощью ПЦР. Уникальным преимуществом аптамеров является быстрая и автоматическая генерация сложных лигандов к любым целевым молекулам. Было показано, что аптамеры неиммуногены и нетоксичны. Относительно высокая химическая стабильность и высокий ингибирующий потенциал делает их мультифункциональным инструментом для экспериментальной валидации мишеней [91]. Аптамеры могут быть использованы для модулирования функции эндогенных клеточных белков в их природном окружении. Они имитируют эффект низкомолекулярных лекарственных соединений по связыванию и инактивации белка-мишени (рис. 9). Для валидации потенциальных мишеней на базе моделей заболеваний был разработан ряд подходов с использованием аптамеров. В настоящее время аптамеры и иРНК используются совместно, так как эти две технологии хорошо дополняют друг друга. иРНК снижают количество целевого белка за счет снижения его экспрессии путем понижения концентрации целевой мРНК, в то время как аптамеры инактивируют стабильные белки с низкой скоростью биологического обновления.

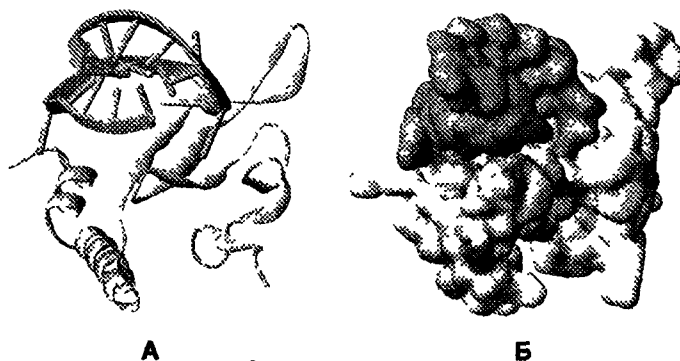


Рисунок 9

Пример комплекса РНК аптамера (серый цвет) с белком капсида бактериофага MS2 (белый цвет)

Структура комплекса взята из PDB (индекс 5MSF) [138]. А - схематическое представление комплекса, Б - представление в виде молекулярной поверхности, доступной для растворителя

Аптамеры также удобны в качестве структурной основы для нахождения (конструирования) прототипов новых лекарств, что объединяет этапы валидации потенциальной мишени и последующего компьютерного конструирования прототипа лекарства [91, 94].

#### **4. Высокопроизводительные технологии**

В последнее десятилетие многие фармацевтические компании уделяют большое внимание разработке новых высокопроизводительных технологий для поиска и валидации новых мишеней, основанных на применении автоматизированных мультипараллельных процессов и анализов [51, 95]. Такие роботизированные системы способны выполнять тысячи процедур в день. Многие геномные, протеомные и другие методы были адаптированы для высокопроизводительной валидации новых потенциальных мишеней, полученных на основе анализа геномной информации. Подобные подходы часто основаны на тактике "потери функции" целевым белком [96]. Наиболее популярны методы протеомного анализа [97], трансгенных нокаутов [98], методы с использованием siRNA [52], антисенс-технологии [58, 63], аптамеры [91, 94], CAL1 и FAL1 [78-80]. В последнее время в фармацевтической индустрии происходит настоящая революция в высокопроизводительном скрининге и валидации мишеней с использованием новейших технологий ДНК микрополей (microarrays), ДНК чипов и микрожидкостных устройств [99-103].

#### **5. Валидация мишеней *in vivo***

Среди подходов, используемых в валидации потенциальных белков-мишеней, можно выделить группу методов *in vivo*.

Последние геномные исследования показали, что в геномах небольших многоклеточных организмов (нематода, плодовая мушка и аквариумная рыбка-зебра) присутствует большое количество генов, близких к генам человека, которые ассоциируются с болезнями человека. Это позволяет использовать различные модели на животных (от беспозвоночных до "гуманизированных" мышей) для валидации потенциальных мишеней *in vivo* с прицелом на различные типы заболеваний человека [104-111]. Широко применяются подходы с использованием трансгенных и нокаут мышей [112-115], аквариумной рыбки-зебры (zebrafish, *Danio rerio*) [116-123], круглых червей [124] (нематод, в том числе широко известной *Caenorhabditis elegans* [125-128]), плодовой мушки (*Drosophila melanogaster*) [129-131] и некоторых паразитарных организмов [132].

Фирмой Cubist Pharmaceuticals была разработана целая платформа для валидации потенциальных антиинфекционных мишеней *in vivo* под названием VITA (Validation In vivo of Targets and Assays for antiinfectives) [133, 134]. В отличие от традиционных подходов валидации мишеней, основанных на блокировании гена или его экспрессии, данная технология совмещает валидацию *in vivo* потенциальных мишеней на моделях инфекционных заболеваний на животных (мыши), разработку тест-систем и выполнение скрининга новых базовых структур лекарств. Данный подход применим для широкого числа различных мишеней, включая белки, которые невозможно было проверить с помощью традиционных подходов.

Так как валидация потенциальных мишеней *in vivo* связана с выполнением больших объемов сложной экспериментальной работы, то в последнее время данные подходы все чаще реализуются с помощью высокопроизводительных технологий [50, 135].

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Из данного обзора разнообразных методов и подходов в экспериментальной валидации потенциальных мишеней ясно следует, что на сегодняшний день нет согласованного мнения о преимуществах той или иной технологии. Ряд фармацевтических компаний используют модели *in vivo* на низших организмах как часть своих программ поиска и проверки новых мишеней. Однако многие исследователи утверждают, что к данным, полученным такими методами, следует относиться крайне осторожно. Наиболее перспективны с их

точки зрения комбинированные подходы с использованием нескольких технологий, однако в выборе последних часто превалирует не анализ пригодности методов и логика эксперимента, а индивидуальные предпочтения и навык исследователей (желание использовать не то, что лучше, а то, что знакомо). Таким образом, пока не найден консенсус в применении той или иной технологии для валидации потенциальных мишеней. По-видимому, выбор способа валидации будет диктоваться типом белка-мишени и ее локализацией. Поэтому, скорее всего развитие этой области приведет к созданию группы методов, оптимизированных для валидации различных мишеней.

Кроме того, нет единого терминологического определения, что такое валидация мишеней. Разные исследователи понимают под этим термином разные вещи. Ряд исследователей и менеджеров фирм утверждает, что мишень не может считаться проверенной ("валидированной"), пока не будет создано эффективный прототип лекарства, действующий на нее, и что термин "валидация мишени" в принципе не верен для действительно новых мишеней [135].

С нашей точки зрения основной проблемой валидации мишеней, несомненно, является получение информации в объеме, достаточном для окончательного выбора конкретной мишени, что определит все последующие этапы проекта "От генома до прототипа лекарства". Таким образом, термин "валидация мишени" должен означать получение достаточной информации о функции мишени и предполагаемых терапевтических эффектах при ее модуляции, позволяющей сделать выбор в пользу данной мишени.

Так как реализация всего проекта по созданию нового лекарства связана со значительными временными и материальными затратами, то выбор белка-мишени несомненно играет ключевую роль в его реализации. Поэтому все потенциальные мишени, успешно прошедшие все этапы экспериментальной валидации, должны пройти последний этап анализа - приоритезацию мишеней, т.е. ранжирование списка мишеней по критерию приоритета выбора мишени с точки зрения вероятности успеха в выполнении всего проекта. При этом должны учитываться не только объективные научные данные (результаты биоинформационного анализа и экспериментальной валидации), но и технологические и экономические аспекты. Например, мишень с известной трехмерной структурой будет иметь значительно более высокий приоритет над белком с неизвестной структурой, так как в первом случае из проекта могут быть частично или полностью исключены этапы экспрессии, кристаллизации и анализа структуры белка-мишени. В свою очередь, белок с неизвестной трехмерной структурой, но имеющий близкий гомолог в белковой базе PDB [136], будет иметь больший приоритет над белком, у которого нет такого гомолога. Это обусловлено тем, что на основе гомологии белков можно построить компьютерную модель пространственной структуры мишени, а также воспользоваться существующим опытом и технологическими приемами экспрессии, кристаллизации и анализа структуры белка-гомолога. Окончательный выбор мишени из приоритетного списка должен делать супервизор проекта, оценивая все аспекты реализации проекта и сознавая всю ответственность и цену возможной ошибки.

Благодарности. Данная работа была выполнена при частичной поддержке РФФИ (грант 04-04-49085) и ИНТАС (Network project 2 001-0596).

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Lohse M.J. (1998) Trends Pharmacol. Sci, **19**, 198-200
- 2 Borchardt J.K. The Alchemist 6 December 2001, (<http://www.chemweb.com/alchem/articles/1005928853806.html>)
- 3 Loew G.H., Villar H.O., Alkorta I. (1993) Pharm. Res. **10**, 475-486
- 4 Арчаков А.И., Иванов А.С. (1996) Вестник РАМН, №1, 60-63

- 5 Ooms F. (2000) *Curr. Med. Chem.*, **7**, 141-158
- 6 Joseph-McCarthy D. (1999) *Pharmacol. Ther.*, **84**, 179-191.
- 7 Veselovsky A.V., Ivanov A.S. (2003) *Current Drug Targets - Infectious Disorders*, **3**, 33-40.
- 8 Searls D.B. (2000) *Drug Discov. Today*, **4**, 135-143
- 9 NOXXON Pharma AG, Annual Report 2000,  
([http://217.160.75.236/noxxon/downloads/annualreports/noxxon\\_annualreport\\_2000.pdf](http://217.160.75.236/noxxon/downloads/annualreports/noxxon_annualreport_2000.pdf))
- 10 Sakharkar K.R., Sakharkar M.K., Chow V.T. (2004) *In Silico Biol.*, **4**, 0028.
- 11 Allen M.J., Carey A.H. (2004) *Drug Discovery Today: TARGETS*, **3**, 183-190.
- 12 Completely Sequenced Genomes (<http://www.nslj-genetics.org/seq/>)
- 13 Boguslavsky J. (2002) *Drug Discovery & Development*, **5**, 41-48.
- 14 Williams M. (2003) *Curr. Opin. Pharmacol.*, **3**, 571-577.
- 15 Дубанов А.В., Иванов А.С., Арчаков А.И. (2001) *Вопр. мед. химии*, **47**, 353-367.
- 16 Дубанов А.В., Иванов А.С., Арчаков А.И. (2003) *Аллергия, астма и клиническая иммунология*, **7**, 38-42.
- 17 Galperin, M.Y., Koonin, E.V. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **10**, 571-578.
- 18 Zheng X.S., Chan T.F., Zhou H.H. (2004) *Chem. Biol.*, **11**, 609-618.
- 19 Lau A.T., He Q.Y., Chiu J.F. (2003) *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, **35**, 965-975
- 20 Walgren J.L., Thompson D.C. (2004) *Toxicol. Lett.*, **149**, 377-385
- 21 Cooper R.A., Carucci D.J. (2004) *Curr. Drug Targets Infect. Disord.*, **4**, 41-51
- 22 Flory M.R., Aebersold R. (2003) *Prog. Cell. Cycle Res.*, **5**, 167-171.
- 23 Lopez M.F. (1998) *Am. Clin. Lab*, **17**, 16-18.
- 24 Archakov A.I., Govorun V.M., Dubanov A.V., Ivanov Y.D., Veselovsky A.V., Lewi P., Janssen P. (2003) *Proteomics*, **3**, 380-391.
- 25 Veselovsky A.V., Ivanov Yu.D., Ivanov A.S., Archakov A.I., Lewi P., Janssen P. (2002) *J. Mol. Recognit.*, **15**, 405-422
- 26 Jones S., Thornton J.M. (1995) *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **63**, 31-65.
- 27 Wilkinson K.D. (2004) *Methods Mol. Biol.*, **261**, 15-32.
- 28 Nedelkov D., Nelson R.W. (2003) *J. Mol. Recognit.*, **16**, 9-14.
- 29 Strosberg A.D. (2002) *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **4**, 594-600.
- 30 Pillutla R.C., Goldstein N.I., Blume A.J., Fisher P.B. (2002) *Expert Opin. Ther. Targets*, **6**, 517-531.
- 31 Butcher S.P. (2003) *Neurochem. Res.*, **28**, 367-371.
- 32 Cowman A.F., Crabb B.S. (2003) *Trends Parasitol.*, **19**, 538-543.
- 33 Sheppard D. (1994) *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **11**, 1-6.
- 34 Homanics G.E., Quinlan J.J., Mihalek R., Firestone L.L. (1998) *Toxicol. Lett.*, **100-101**, 301-307.
- 35 Luscombe N.M., Austin S.E., Berman H.M., Thornton J.M. (2000) *Genome Biology*, **1**, reviews001.1-001.10.
- 36 Jacobs G.H. (1992) *EMBO J.*, **11**, 4507-4517.
- 37 Pavletich N.P., Pabo C.O. (1991) *Science*, **252**, 809-817.
- 38 Suzuki M., Gerstein M.B., Yagi N. (1994) *Nucleic Acids Res.*, **22**, 3397-3405.
- 39 Cech T.R. (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2**, 605-609.
- 40 Breaker R.R. (1997) *Chem. Rev.*, **97**, 371-390.
- 41 Usman N., Beigelman L., McSwiggen J.A. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6**, 527-533
- 42 Uhlenbeck O.C. (1987) *Nature*, **328**, 596-600.
- 43 Jarvis T.C., Bouhana K.S., Lesch M.E., Brown S.A., Parry T.J., Schrier D.J., Hunt S.W., Pavco P.A., Flory C.M. (2000) *J. Immunol.*, **165**, 493-498.
- 44 Goodchild J. (2002) *Expert Opin. Ther. Targets*, **6**, 235-247.
- 45 Lehner B., Fraser A.G., Sanderson C.M. (2004) *Brief Funct. Genomic Proteomic*, **3**, 68-83.
- 46 Jain K.K. (2004) *Drug Discov. Today*, **9**, 307-309.

- 47 Henning S.W., Beste G. (2002) *Curr. Drug Discov*, N5, 17-21.
- 48 Elbashir S.M., Harborth J., Weber K., Tuschl T. (2002) *Methods*, **26**, 199-213.
- 49 Klein I.I. (2000) *Drug Discov. Today*, **5**, 37-38
- 50 Maeda I., Kohara Y., Yamamoto M., Sugimoto A. (2001) *Curr. Biol.*, **11**, 171-176.
- 51 Ilag L.L., Ng J.H., Beste G., Henning S.W. (2002) *Drug Discov. Today*, **7**, S136-S142.
- 52 Xin H., Bernal A., Amato F.A., Pinhasov A., Kauffman J., Brennenman D.E., Derian C.K., Andrade-Gordon P., Plata-Salaman C.R., Ilyin S.E. (2004) *J. Biomol. Screen.*, **9**, 286-293.
- 53 Baker B.F., Monia B.P. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1489**, 3-18.
- 54 Inouye M. (1988) *Gene*, **72**, 25-34.
- 55 Ravichandran L.V., Dean N.M., Marcusson E.G. (2004) *Oligonucleotides*, **14**, 49-64
- 56 Ji Y., Yin D., Fox B., Holmes D.J., Payne D., Rosenberg M. (2004) *FEMS Microbiol. Lett.*, **231**, 177-184.
- 57 Lavery K.S., King T.H. (2003) *Curr. Opin. Drug Discov. Devel*, **6**, 561-569.
- 58 Taylor M.F. (2001) *Expert Opin. Ther. Targets*, **5**, 297-301.
- 59 Dean N.M. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**, 622-625.
- 60 Koller E., Gaarde W.A., Monia B.P. (2000) *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 142-148.
- 61 Bennett C.F., Cowser L.M. (1999) *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **1**, 359-371.
- 62 Ho S.P., Hartig P.R. (1999) *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **1**, 336-343.
- 63 Taylor M.F., Wiederholt K., Sverdrup F. (1999) *Drug Discov. Today*, **4**, 562-567.
- 64 RNA Lassos (<http://www.somagenics.com/platform.html>).
- 65 Pellestor F., Paulasova P. (2004) *Int. J. Mol. Med.*, **13**, 521-525
- 66 Gambari R. (2001) *Curr. Pharm. Des.*, **7**, 1839-1862.
- 67 Demidov V.V. (2002) *Drug Discov. Today*, **7**, 153-155.
- 68 Ganesh K.N., Nielsen P.E. (2000) *Curr. Org. Chem.*, **4**, 916-928.
- 69 Winters T.A. (2000) *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **2**, 670-681
- 70 Nielsen P.E. (2000) *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **2**, 282-287.
- 71 Demidov V.V., Frank-Kamenetskii M.D. (2001) *Methods*, **23**, 108-122.
- 72 Ray A., Norden B. (2000) *FASEB J.*, **14**, 1041-1060.
- 73 Urtishak K.A., Choob M., Tian X., Sternheim N., Talbot W.S., Wickstrom E., Farber S.A. (2003) *Dev. Dyn.*, **228**, 405-413.
- 74 Banker D.D. (2001) *Indian J. Med. Sci.*, **55**, 651-654.
- 75 Peet N.P. (2003) *Drug Discov. Today: TARGETS*, **2**, 125-127.
- 76 Liao J.C., Rouder J., Jay D.G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2659-2663.
- 77 Jay D.G. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5454-5458.
- 78 Niewohner J., Rubenwolf S., Meyer E., Rudert F. (2001) *American Genomic/Proteomic Technology*, July/August, AG/PT 33.
- 79 Eustace B.K., Jay D.G. (2003) *Methods Enzymol.*, **360**, 649-660
- 80 Beck S., Sakurai T., Eustace B.K., Beste G., Schier R., Rudert F., Jay D.G. (2002) *Proteomics*, **2**, 247-255.
- 81 Bradbury A. (2003) *Drug Discov. Today*, **8**, 737-739.
- 82 Chowdhury P.S., Vasmatzis G. (2003) *Methods Mol Biol.*, **207**, 237-254
- 83 van Wyngaardt W., Malatji T., Mashau C., Fehrson J., Jordaan F., Miltiadou D., du Plessis D.H. (2004) *BMC Biotechnology*, **4**, 6
- 84 Toleikis L., Broders O., Dubel S. (2004) *Methods Mol. Med.*, **94**, 447-458.
- 85 Tanaka T., Lobato M.N., Rabbitts T.H. (2003) *J. Mol. Biol.*, **331**, 1109-1120
- 86 Donini M., Morea V., Desiderio A., Pashkoulov D., Villani M.E., Tramontano A., Benvenuto E. (2003) *J. Mol. Biol.*, **330**, 323-332.
- 87 Cohen P.A. (2002) *Methods Mol. Biol.*, **178**, 367-378.
- 88 Marasco W.A. (1997) *Gene Ther.*, **4**, 11-15.
- 89 Mundt K.E. (2001) *Eur. Pharmaceutical Contractor*, Winter 2001 issue, Samedan Ltd. Tech. ed., 1/10/02, 1-5.

- 90 Rimmele M. (2003) *Chembiochem.*, **4**, 963-971
- 91 Burgstaller P., Girod A., Blind M. (2002) *Drug Discov Today*, **7**, 1221-1228.
- 92 Toulme J.J., Di Primo C., Boucard D. (2004) *FEBS Lett.*, **567**, 55-62.
- 93 Ulrich H., Martins A.H., Pesquero J.B. (2004) *Cytometry*, **59A**, 220-231.
- 94 Burgstaller P., Jenne A., Blind M. (2002) *Curr Opin Drug Discov. Devel*, **5**, 690-700
- 95 Kubinyi H. (2002) *Drug Discov Today*, **7**, 707-709.
- 96 Hardy L.W., Peet N.P. (2004) *Drug Discov Today*, **9**, 117-126.
- 97 Flook P.K., Yan L., Szalma S. (2003) *Drug Discovery Today: TARGETS*, **2**, 217-223.
- 98 Harris S. (2001) *Drug Discov Today*, **6**, 628-636.
- 99 Simbaldi R. (2004) *Drug Discov World*, **5**, 37-43.
- 100 Sundberg S.A., Chow A., Nikiforov T., Wada H.G. (2000) *Drug Discov. Today*, **5**, 92-103
- 101 Huels C., Muelhner S., Meyer H.E., Cahill D.J. (2002) *Drug Discov. Today*, **7**, S119-S124.
- 102 Barsky I., Perov A., Tokalov S., Chudinov A., Kreindlin E., Sharonov A., Kotova E., Mirzabekov A. (2002) *J. Biomol Screen.*, **7**, 247-257.
- 103 Rubina A.Y., Dementieva E.I., Stomakhin A.A., Darii E.L., Pan'kov S.V., Barsky I.E., Ivanov S.M., Kononova E.V., Mirzabekov A.D. (2003) *Biotechniques*, **34**, 1008-1022
- 104 Matthews D., Kopczynski J. (2001) *Drug Discov. Today*, **6**, 141-149.
- 105 Feany M.B. (2000) *J. Neuropathol Exp. Neurol.*, **59**, 847-856.
- 106 Feany M.B., Bender W.W. (2000) *Nature*, **404**(6776), 394-398.
- 107 O'Kune C.J. (2003) *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **14**, 3-10.
- 108 Amatruda J.F., Shepard J.L., Stern H.M., Zou L.I. (2002) *Cancer Cell*, **1**, 229-231
- 109 Shin J.T., Fishman M.C. (2002) *Ann Rev Genomics Hum. Genet.*, **3**, 311-340.
- 110 Berman J., Hsu K., Look A.T. (2003) *Br. J. Haematol.*, **123**, 568-576.
- 111 Tomasiewicz H.G., Flaherty D.B., Soria J.P., Wood J.G. (2002) *J. Neurosci. Res.*, **70**, 734-745.
- 112 Tornell J., Snaith M. (2002) *Drug Discov. Today*, **7**, 461-470.
- 113 Abuin A., Holt K.H., Platt K.A., Sands A.T., Zambrowicz B.P. (2002) *Trends Biotechnol.*, **20**, 36-42.
- 114 Russ A., Stumm G., Augustin M., Sedlmeir R., Wattler S., Nehls M. (2002) *Drug Discov. Today*, **7**, 1175-1183
- 115 Zambrowicz B.P., Sands A.T. (2004) *Drug Discov. Today: TARGETS*, **3**, 198-207.
- 116 Rubinstein A.L. (2003) *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, **6**, 218-223.
- 117 Sumanas S., Lin S. (2004) *Drug Discov. Today: TARGETS*, **3**, 89-96
- 118 Haffter P., Granato M., Brand M., Mullins M.C., Hammerschmidt M., Kane D.A., Odenthal J., van Eeden F.J., Jiang Y.J., Heisenberg C.P., Kelsh R.N., Furutani-Seiki M., Vogelsang E., Beuchle D., Schach U., Fabian C., Nusslein-Volhard C. (1996) *Development*, **123**, 1-36.
- 119 Haffter P., Nusslein-Volhard C. (1996) *Int. J. Dev. Biol.*, **40**, 221-227.
- 120 Wargelius A., Ellingsen S., Fjose A. (1999) *Biochem. Biophys Res Commun*, **263**, 156-61
- 121 Li Y.X., Farrell M.J., Liu R., Mohanty N., Kirby M.L. (2000) *Dev. Biol.*, **217**, 394-405.
- 122 Zhao Z., Cao Y., Li M., Meng A. (2001) *Dev. Biol.*, **229**, 215-223
- 123 Dodd A., Chambers S.P., Love D.R. (2004) *FEBS Lett.*, **561**, 89-93.
- 124 Sommer R.J. (2000) *Curr. Biol.*, **10**, R879-881
- 125 Sternberg P.W., Han M. (1998) *Trends Genet.*, **14**, 466-472.
- 126 Lee J., Nam S., Hwang S.B., Hong M., Kwon J.Y., Joeng K.S., Im S.H., Shim J., Park M.C. (2004) *J Biochem. Mol. Biol.*, **37**, 107-113.



- 127 Jorgensen E.M., Mango S.E. (2002) *Nat. Rev. Genet.*, **3**, 356-69.
- 128 Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. (1998) *Nature*, **391**, 806-811.
- 129 Wassarman D.A., Therrien M., Rubin G.M. (1995) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **5**, 44-50.
- 130 Adams M.D., Sekelsky J.J. (2002) *Nat. Rev. Genet.*, **3**, 189-198.
- 131 St Johnston D. (2002) *Nat. Rev. Genet.*, **3**, 176-188.
- 132 Jackson L.K., Phillips M.A. (2002) *Curr. Top. Med. Chem.*, **2**, 425-438.
- 133 VITA (Validation In Vivo of Targets and Assays for Antiinfectives) technology. (<http://www.cubist.com/ar2000text/discovery.html>)
- 134 Chopra I. (2000) *Microbiol. Today*, **27**, 4-6.
- 135 Doan T.N., Eilertson C.D., Rubinstein A.L. (2004) *Drug Discov. Today: TARGETS*, **3**, 191-197
- 136 Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**, 235-242 (<http://www.rcsb.org/pdb>)
- 137 Kim C.A., Berg J.M. (1996) *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 940-945
- 138 Convery M.A., Rowsell S., Stonehouse N.J., Ellington A.D., Hirao I., Murray J.B., Peabody D.S., Phillips S.E., Stockley P.G. (1998) *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 133-139

Поступила 15.11.2004

## METHODS OF EXPERIMENTAL VALIDATION OF POTENTIAL TARGET PROTEINS FOR CREATION OF NEW DRUGS

A.S.Ivanov, A.V.Veselovsky, A.I.Archakov

V.N.Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry of RAMS  
Pogodinskaya str. 10, Moscow, 119121 Russia; fax. 007-095-245-0857;  
e-mail: alexei.ivanov@ibmc.msk.ru

Review is devoted to the description of the main existing and developing technologies for experimental validation of potential targets predicted in silico by comparative genomics and bioinformatics methods. Since this problem has not been solved yet, the description of a wide set of methods, suitable for the validation of potential targets, is given.

The following questions have been considered: (1) applications of proteomic technologies (control of potential targets expression and their variability, analysis of protein-protein interactions), (2) use of genomics technologies in experimental validation of targets (inactivation of the target genes, suppression of transcription, inactivation of the target mRNA, suppression of translation); (3) methods of direct inactivation of target proteins (monoclonal antibodies, light-inactivation, one-chain antibodies, intrabodies, aptamers); (4) high-throughput technologies; (5) targets validations in vivo.

**Key words:** targets validation, target protein, genomics, proteomics, RNA interfering, anti-sense-RNA, aptamers, laser inactivation, in vivo models