



БИОМИКА / BIOMICS

<http://biomics.ru>



НАПРАВЛЕННЫЙ ПОИСК НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ И АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ ИХ ДЕЙСТВИЯ

Иваненков Я.А.

Учреждение Российской академии наук Институт физиологически активных веществ РАН,
Россия, Московская область, г. Черноголовка, smart_people@inbox.ru

Одной из основных проблем при разработке новых лекарственных соединений является выяснение точного механизма их действия, по которому достигается желаемый терапевтический эффект. На сегодняшний день существует ряд технологий, позволяющих строить обоснованные предположения о механизме действия отдельно взятого физиологически активного вещества, а также об их возможных индуцированных побочных и токсических эффектах. Среди таких технологий отдельное место занимают аффинная хроматография, белковые микрочипы, фаговый мониторинг и Y3N-системы. Именно с применением этих методов осуществляется большая часть исследований в этой области. В настоящем обзоре описаны перечисленные выше технологии и приводятся примеры их использования.

Ключевые слова: биологический скрининг, комбинаторный синтез, биомиметики, рецепторные системы, терапевтические агенты, аффинность, низкомолекулярные лиганды, белковые микрочипы, фаговый мониторинг, Y3N-системы

Введение

На сегодняшний день в силу целого ряда объективных причин не существует идеального лекарственного препарата, представляющего из себя низкомолекулярное органическое вещество синтетического происхождения. Нежелательные побочные эффекты, ограниченный период действия, большие дозировки, привыкание – лишь некоторые лимитирующие факторы, препятствующие его созданию. Более половины всех современных лекарств являются аналогами уже существующих и обладают несколько улучшенными фармакокинетическими характеристиками, селективностью, пониженной токсичностью. Принципиально новые терапевтические агенты появляются не чаще, чем один раз в 5-10 лет. Болезней не становится меньше, ежегодно появляются все новые – более опасные; а требования, предъявляемые к наукоемким технологиям и исследованиям в области медицинской и биологической химии постоянно ужесточаются. Традиционные методы биологических испытаний позволяют тестировать 10-100 соединений в день на одной биомиметики, что является малоэффективным в свете увеличения и ускорения синтеза органических

соединений методами комбинаторной химии и практически не способствует изучению сложных механизмов их действия. Именно эти обстоятельства в значительной степени определяют современные тенденции развития мировой фармацевтической индустрии.

Количество факторов, определяющих физиологическую активность соединений столь велико и многообразно, что попытка учесть их в полном объеме является в настоящее время задачей практически не решаемой. В то же время существуют различные подходы, позволяющие построить модельные схемы направленного поиска биологически активных веществ и на этой основе – поиск новых эффективных лекарственных препаратов [Hüser, 2006, Rang, 2006, Turner, 2007, Mukund et al., 2007].

Значительные темпы роста фармацевтической индустрии в последнее десятилетие главным образом обусловлены внедрением в эту область передовых аналитических, синтетических и компьютерно-вычислительных технологий биологического скрининга (БС) [Balakin, 2009], комбинаторного синтеза (КС) [Bannwarth, Hinzen, 2006] и виртуального скрининга (ВС) [Hüser, 2006]. Их комплексное

применение является на сегодняшний день одним из главных факторов, определяющих успешную деятельность и развитие любой фармацевтической компании, работающей на ранних стадиях разработки новых лекарственных препаратов. Очевидно, что поиск актуальных биомишеней, установление механизма действия каждого терапевтического агента и минимизация побочных эффектов являются одними из наиболее важных этапов в этом сложном процессе.

На сегодняшний день существует несколько подходов, позволяющих решать многие из поставленных задач, среди которых огромный интерес представляют технологии тестирования небольшого количества образцов на целой панели биологических мишеней, как правило, принадлежащих к одному типу, например, киназные ферменты [Davies, 2000]. Данный подход позволяет установить одну или несколько биомишеней, по отношению к которым тестируемое вещество проявило соответствующую степень активности. Следует отметить, что несомненный интерес представляют как высокоселективные агенты, так и соединения, обладающие широким спектром воздействия. В обоих случаях такая информация является основополагающей для установления сложного механизма действия потенциального лекарственного препарата, определения количественного соотношения структура-активность (QSAR) и закономерностей, позволяющих рационально проводить дальнейшие биологические испытания.

Белковые рецепторные системы

Первоочередной задачей исследователя является изыскание возможности построить такую

структуру, которая была бы способна к взаимодействию с теми участками биологической системы, которые отвечают за те или иные физиологические эффекты. С этой точки зрения, белковые рецепторные системы представляют наибольший интерес. Вообще говоря, сколько-нибудь точную характеристику того, что следует называть рецептором, дать достаточно затруднительно. С нашей точки зрения, наиболее точная формулировка рецепторной системы принадлежит П.В. Сергееву и Н.Л. Шимановскому [1987].

По их мнению, «рецепторы – это генетически детерминированные мобильные и лабильные, главным образом, белковые структуры, функции которых заключаются в «указании» химического сигнала и последующей его трансформации в адекватный ответ клетки». Очень важна проблема локализации рецепторов, то есть, вопрос, где расположены биологические структуры, подверженные действию природных модуляторов и их синтетических аналогов. Основными белковыми рецепторными системами являются мембранно-связанные комплексы и активные центры ферментов. Очевидно, что для детального изучения механизма действия лигандов различного происхождения на белковые рецепторные системы (табл. 1), отвечающие за выполнение интересующих нас клеточных функций, требуется наличие индивидуального белка(ов), соответствующих технологий и методик для однозначного определения фармакодинамических характеристик тестируемого лиганда. Существуют и другие современные подходы, не требующие непосредственного наличия исследуемого белка(ов), о которых будет сказано ниже.

Таблица 1.

Примеры белковых рецепторных систем

Рецепторы	Характеристики	Класс лиганда	Примеры
Метаботропные	Связанные с G-белками	Антагонисты и агонисты	Серотониновые, адренорецепторы, тахикининовые и хемокиновые
Ионотропные	Образующие ионный канал	Блокаторы и активаторы	Кальциевые, калиевые и натриевые каналы
Рецепторы, сопряженные с ферментами	Регулирующие активность фермента	Ингибиторы и активаторы	Ферменты класса киназ и протеаз
Нуклеарные (ядерные) рецепторы	Регулирующие транскрипцию ДНК	Антагонисты и агонисты	Эстрогеновые, андрогеновые, прогестинные, глюко- и минералокортикоидные, витамина D и ретиноевой кислоты
Орфан- рецепторы	Рецепторы с неустановленными функциями, для которых неизвестны природные лиганды	Антагонисты, агонисты	Некоторые типы метаботропных, интерлейкининовых и ядерных рецепторов

Основные принципы субстрат-рецепторного взаимодействия?

Очевидно, что для осуществления субстрат-рецепторного взаимодействия необходимо выполнение целого ряда условий, таких как: наличие определенных функциональных групп, способных к образованию устойчивых связей различных типов, стерическое соответствие и конформационная подвижность, участие молекул воды и т.д. Наиболее значимую роль в этом процессе играют нековалентные связи с энергией порядка 5 ккал/моль: координационные, ионные, ион-дипольные, водородные, Ван-дер-Ваальса и комплексы с переносом заряда (рис. 1-а) [Зефирова, 2002]. На рисунке 1-б приведен пример образования комплекса низкомолекулярного органического лиганда с активным центром белковой рецепторной системы. Большинство аминокислотных остатков участвуют в формировании перекрестных водородных связей. Фенилаланин и тирозин образуют так называемый гидрофобный карман, в котором удерживается бензильный фрагмент, а молекула воды позволяет осуществить не прямое взаимодействие тирозина с кислородом гидроксильной группы. Таким образом, реализация сравнительно большого количества

разнотипных связей и определенная пространственная конфигурация активного сайта белковой молекулы и рассматриваемого соединения приводят в конечном итоге к образованию достаточно прочного субстрат-рецепторного комплекса. Заметим, что в большинстве случаев формирование подобных комплексов происходит по принципу «вынужденного соответствия», которое влечет за собой определенные конформационные и вращательные деформации самого субстрата и необратимые изменения в третичной структуре активного сайта, а иногда и белковой макромолекулы в целом. Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия возникают только в том случае, когда энергия колебания отдельных атомов способствует образованию временных диполей и как следствие осуществляется межатомное притяжение между лекарственным соединением и соответствующей рецепторной системой. Заметим, что значение энергии такого связывания обратно пропорционально седьмой степени геометрического расстояния между сферами взаимодействия, таким образом, Ван-дер-Ваальсовы связи в значительно большей степени способствуют именно «закреплению» лиганда в активном центре биомолекулы в определенной конформации, далеко не всегда с минимальным значением внутренней энергии.

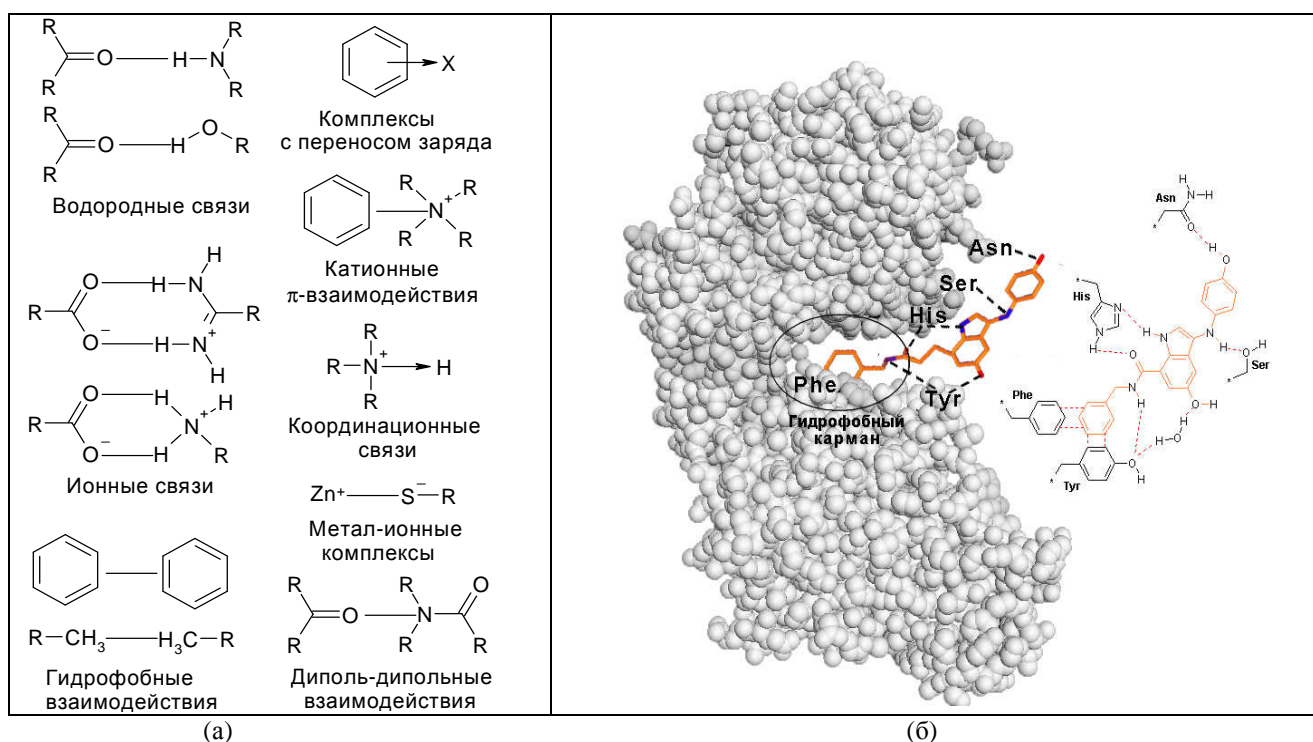


Рис. 1. (а) Примеры молекулярных связей в системе лиганд-рецептор; (б) взаимодействие лекарственного соединения с активным центром рецепторной системы.

В своих работах Turner [2007] показал, что именно нековалентные связи существенным образом влияют на формирование устойчивого комплекса лиганд-рецептор, образование которого в общем случае описывается законом действия масс. Однако в некоторых случаях осуществляется и ковалентное взаимодействие с энергией связи более 50 ккал/моль. Например, пеницилины, будучи необратимыми ингибиторами бактериальной мембран-связанной транспептидазы, оказывают существенный эффект именно за счет раскрытия β -лактамного кольца и образования прочного комплекса с ферментом. В общем случае аффильность связывания описывается свободной энергией Гиббса: $\Delta G = -RT \ln K_b = \Delta H - T\Delta S$, а экспериментальное значение константы связывания, как правило, принадлежит диапазону $10^{-2} - 10^{-12}$, что соответствует $\Delta G = -10 - 70$ кДж/моль.

Как правило, все терапевтические агенты делятся на две большие группы: агонисты и антагонисты. Агонисты представляют собой физиологически активные вещества (ФАВ), которые при взаимодействии с рецептором, вызывают соответствующий физиологический или фармакологический ответ, характерный для данной рецепторной системы. В свою очередь, антагонисты обладают противоположной активностью, т.е. блокируют рецепторные функции. Терапевтические воздействия лекарственных препаратов, принадлежащих к любой из этих групп, характеризуется двумя основными параметрами: аффильностью и эффективностью. Аффильность отражает количественную меру связывания низкомолекулярного лиганда с рецептором, а эффективность характеризует его способность вызывать соответствующий биологический эффект. Существует несколько подходов, описывающих действие агонистов и антагонистов, среди которых можно отметить теорию Ариенса Стефенсона (1937 г.) [Hüser, 2006], из которой следует, что каждый лиганд обладает так называемой «внутренней активностью», определяющей тип его воздействия, теорию Пейтона (1961 г.) [Balakin, 2009], предполагающую определенную зависимость между скоростью связывания лекарственного соединения и степенью биологического ответа и теорию Карлина (1967 г.) [Bannwarth, Hinzen, 2006], согласно которой агонисты и антагонисты взаимодействуют с различными конформационными структурами рецепторной системы, реализуя определенное равновесное состояние, например, в случае регуляции активности ионных каналов. Если в процессе связывания не удастся достичь максимальной активации рецептора вне зависимости от концентрации активного соединения, к агонистам и антагонистам добавляют термин «частичные». Заметим, что в силу целого ряда

причин, создание агонистов представляет более трудоемкую задачу по сравнению с дизайном лекарственных соединений, обладающих антагонистическим воздействием. По отношению к ферментам принято выделять две основные группы ФАВ: ингибиторы и активаторы (табл. 1). Наиболее распространенными являются ингибиторы ферментативной активности, общая стратегия создания которых зависит от типа предполагаемого ингибитора и наличия информации о третичной структуре исследуемого фермента, т.е. пространственное распределение его аминокислотных остатков. Данные такого рода могут быть получены несколькими путями, среди которых можно отметить: молекулярный дизайн нового лекарственного соединения с использованием уже известных активных агентов, основанный на теории подобия структуры и активности, создание ингибиторов с использованием данных кристаллографического анализа и достаточно молодое, но очень перспективное направление, связанное с применением хомогенного подхода, предполагающего тесную взаимосвязь между нуклеотидной последовательностью, кодирующей соответствующий белок, и природой низкомолекулярного лиганда.

Рассмотрим основные механизмы действия лекарственных соединений на примере взаимодействия «ингибитор - белковый фермент». Одним из самых распространенных вариантов является конкурентное ингибирование (рис. 2-а), суть которого заключается в создании химической структуры, способной эффективно конкурировать с природным субстратом в процессе связывания с активным центром фермента, т.о. осуществляется его временная блокировка. Заметим, что определение «временная» использовано не случайно, т.к. конкурентное ингибирование представляет собой обратимый процесс, константа равновесия которого зависит от аффильности используемого лиганда. Как правило, при создании конкурентных ингибиторов отталкиваются от структуры известного субстрата, т.к. данные, характеризующие пространственную организацию фермента, зачастую не доступны. В таком случае используют принцип «фармакофорной гипотезы». Другими словами, необходимо синтезировать химическое соединение, похожее на природный субстрат. В свою очередь, фармакофор представляет собой совокупность стерических и электронных особенностей, необходимых для осуществления оптимальных супрамолекулярных взаимодействий с определенной биологической мишенью, и, как следствие - стимуляции или блокирования соответствующего биологического ответа.

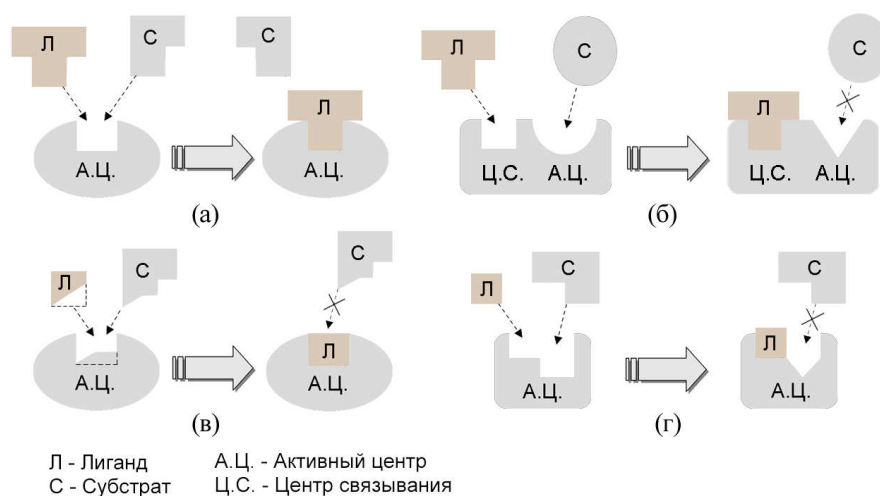


Рис. 2. Основные механизмы действия лекарственных соединений, регулирующих ферментативную активность. (а) – конкурентное ингибирование; (б) - аллостерическое ингибирование; (в) - деформации межзатомных связей лиганда ; (г) – трансформация активного сайта фермента

На рис. 2-б приведен пример реализации аллостерического ингибирования. В данном случае лиганд взаимодействует не с активным сайтом фермента, а с областью, находящейся в непосредственной близости от него, которая образует специфический центр связывания. Существенно, что ингибирование осуществляется только в том случае, когда в результате такого связывания происходят определенные изменения в третичной структуре активного центра энзима, что в свою очередь препятствует субстрат-рецепторному взаимодействию. Аллостерический механизм используется гораздо реже, по сравнению с конкурентным ингибированием, т.к. в данном случае необходимо располагать информацией о пространственной структуре белковой макромолекулы и расположении необходимых аминокислотных остатков. Однако описанный выше подход имеет как минимум одно существенное преимущество – эффективность связывания не зависит от концентрации субстрата, что, в свою очередь, позволяет в значительной степени уменьшить дозировку лекарственного препарата и повысить эффективность его действия. Как упоминалось выше, многие низкомолекулярные органические лиганды взаимодействуют с белковым ферментом по принципу вынужденного соответствия, который заключается в реализации необходимых конформационных изменений, способствующих эффективному связыванию. В данном случае ингибитор подходит к активному центру фермента не идеально, поэтому максимальное взаимодействие достигается только в том случае, когда происходят некоторые изменения в трехмерной структуре активного сайта фермента и осуществляются определенные деформации

соответствующих межзатомных связей лиганда, например, их вращение или удлинение (рис. 2-в). Кроме того, существенным изменениям могут подвергаться и валентные углы. Из этого следует, что конформация с минимальным значением внутренней энергии далеко не всегда совпадает с активной конформацией используемого лекарственного соединения. Четвертая группа ингибиторов относится к так называемым суицидным. Из названия следует, что в данном случае происходит необратимое связывание активного агента с белковым ферментом и значительное подавление его функций. Механизм действия заключается в формировании относительно прочных ковалентных связей с определенными аминокислотными остатками, как правило, входящими в состав активного сайта фермента, в результате происходит его вынужденная трансформация, препятствующая образованию субстрат-рецепторного комплекса (рис. 2-г). Основным недостатком суицидных агентов является необратимость их действия, однако существует большое количество лекарств, обладающих псевдообратимым характером воздействия, при котором образовавшиеся ковалентные связи могут быть легко разрушены при помощи определенных химических веществ с сохранением трехмерной конфигурации фермента и его функций. В заключении стоит упомянуть об ингибиторах комбинированного действия. Например, довольно часто реализуется суицидное подавление ферментативной активности по механизму вынужденного соответствия. Наглядным примером в данном случае является 5-фторурацил, широко применяемый для лекарственной терапии некоторых типов опухолей, рост и развитие которых во многих

случаях связаны с действием белкового фермента тимидинатсинтетазы. С его помощью происходит замещение атома водорода в положении 5 урацила на метиленовую группу. Ключевой стадией реакции является присоединение фермента по лабильной двойной связи пиримидинового гетероцикла, в результате чего происходит активация атома углерода в положении 5, по которому осуществляется

метилование с последующим элиминированием атома водорода. Замена водорода на фтор приводит к образованию устойчивого комплекса, который способствует существенному подавлению ферментативной активности и, как следствие, препятствует развитию злокачественной опухоли.

Таблица 2.

Примеры типичных «якорных» систем.

«Якорный» белок	Размер (kDa)	Лиганд	Элюент
Полигистидин (6xHis)	~1	Me ²⁺ хелатный комплекс (Me ²⁺ = Ni, Co, Zn)	Имидазол/низкое значение pH
Глутатион S-трансфераза (GST)	26	Глутатион (GSH)	Избыток GSH
Мальтоз-зависимый белок (MBP)	40	Амилоза	Мальтоза
Стафилококковый белок-A (SPA) – иммуноглобулин-зависимый рецептор, расположенный на поверхности <i>Staphylococcus aureus</i> .	31	hIgG - иммуноглобулин	Низкое значение pH
Стрептококковый белок-G (SPG):			
1. Альбумин-зависимый (ABP)	5-25	Альбумин (HSA)	Низкое значение pH
2. Иммуноглобулин-зависимый (SPG _Z)	7	hIgG - иммуноглобулин	Низкое значение pH
FLAG-белок (-ATLAAAAL-) «AAAAL» - энтерокиназный домен	1	mAb M ₁ /M ₂ -антитело	EDTA(FLAG-белок)/низкое значение pH
Субъединица транскарбоксилазного комплекса <i>Propionibacterium shermanii</i>	13	Стрептавидин/авидин	Биотин

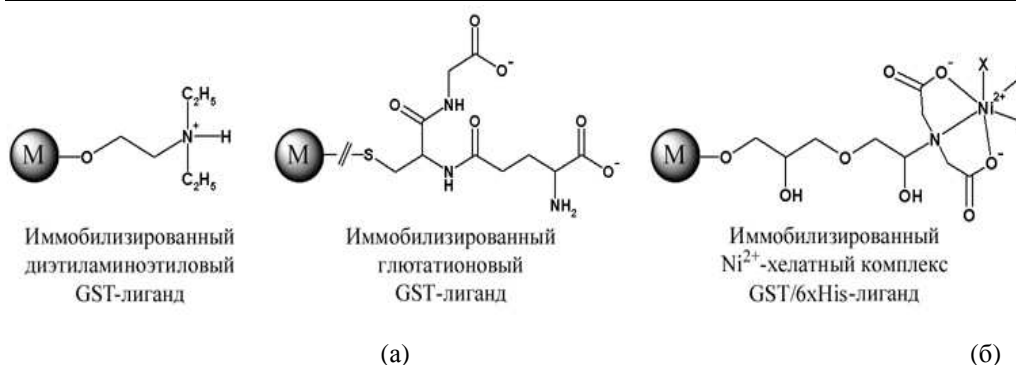
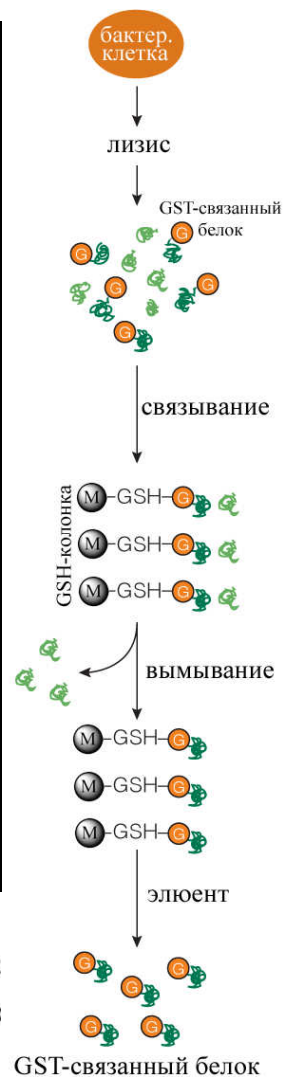


Рис. 3. (а) Примеры GST и GST/6xHis-лигандов; (б) основные этапы выделения GST-связанных белков

Выделение рекомбинантных белков

Среди множества способов выделения и очистки рекомбинантных белков, полученных при помощи бактериофагов, паразитирующих на бактериальной клетке, отдельно опишем лишь те, которые наиболее адаптированы под технологию ВПС. Как правило, экспрессионные вектора, помимо гена, отвечающего за производство целевого белка, содержат в своей структуре дополнительные фрагменты, кодирующие «якорные» макромолекулы (как правило белки, табл. 2), среди которых особо следует отметить: полигистидин (6xHis) [Braun et al., 2002], глутатион S-трансферазу (GST) [Singh et al., 2011], мальтозозависимый белок (MBP) [Lebediker, Danieli, 2011] или комбинированные варианты, например GST-6xHis (рис. 3). Они входят в состав рекомбинантного белка и способствуют его выделению, дальнейшей очистке, повышают растворимость, оказывают стабилизирующий эффект, а в некоторых случаях увеличивают целевую экспрессию. На первой стадии происходит высвобождение всех трансляционных белков, накопившихся в бактериальной клетке. Как правило, для этой цели используется один из трех вариантов разрушения плазматической мембраны: применение ультразвука, техника быстрого замораживания/размораживания и метод «нацеленных ударов», с применением мелкодисперсного циркония. Любой из этих вариантов способствует эффективному лизису и не приводит к разрушению белковых макромолекул, экспрессированных в бактериальной клетке. Применение метода аффинной хроматографии с иммобилизованным лигандом позволяет эффективно выделять рекомбинантные белки.

Современные технологии и методы анализа механизма действия низкомолекулярных лигандов

Установление актуальных биологических мишеней, по отношению к которым

низкомолекулярное органическое вещество (потенциальный лекарственный препарат) проявляет определенную степень активности, и изучение, как правило, сложного механизма действия каждого активного соединения, является на сегодняшний день приоритетным направлением в развитии мировой фармацевтической индустрии, в частности, в области научных исследований и разработок, относящихся к ранним стадиям в технологии создания новых лекарственных препаратов. На сегодняшний день существует несколько хорошо зарекомендовавших себя подходов, позволяющих эффективно решать поставленные комплексные задачи, с применением как относительно простых методов анализа, так и высокотехнологичных роботизированных систем.

Аффинная хроматография с использованием иммобилизованного тестируемого соединения

Метод аффинной хроматографии (affinity chromatography) разработан еще в середине XX века. Огромный вклад в его дальнейшее развитие внесли работы Аксена (1967) и Олсона (1978). На сегодняшний день существует более тысячи научных публикаций описывающих применение аффинной хроматографии с целью анализа различных биологических объектов [Nilsson et al., 1997], некоторые примеры которых приведены в таблице 3. Область ее применения чрезвычайно разнообразна: очистка белковых фракций, выделение индивидуальных белков и транскрипционных факторов, хелатных комплексов и рибонуклеозидов, исследования в области рекомбинации ДНК и т.д. Современная модификация этого метода заключается в использовании иммобилизованного низкомолекулярного органического соединения (потенциального лекарственного препарата). Основной принцип функционирования (на примере взаимодействия белок-лиганд) достаточно прост и схематически представлен на рис. 4.

Таблица 3.

Примеры использования метода аффинной хроматографии

Выделяемая субстанция	Лиганд
Белок	Субстрат, ингибитор, кофактор
Антитело	Антиген, вирус, клетка
Лектин	Полисахарид, гликопротеин, клетка, рецептор
Нуклеиновая кислота	Комплементарная последовательность оснований, гистон, полимераза, нуклеин-связывающиеся белки
Гормон	Рецептор, транспортный белок

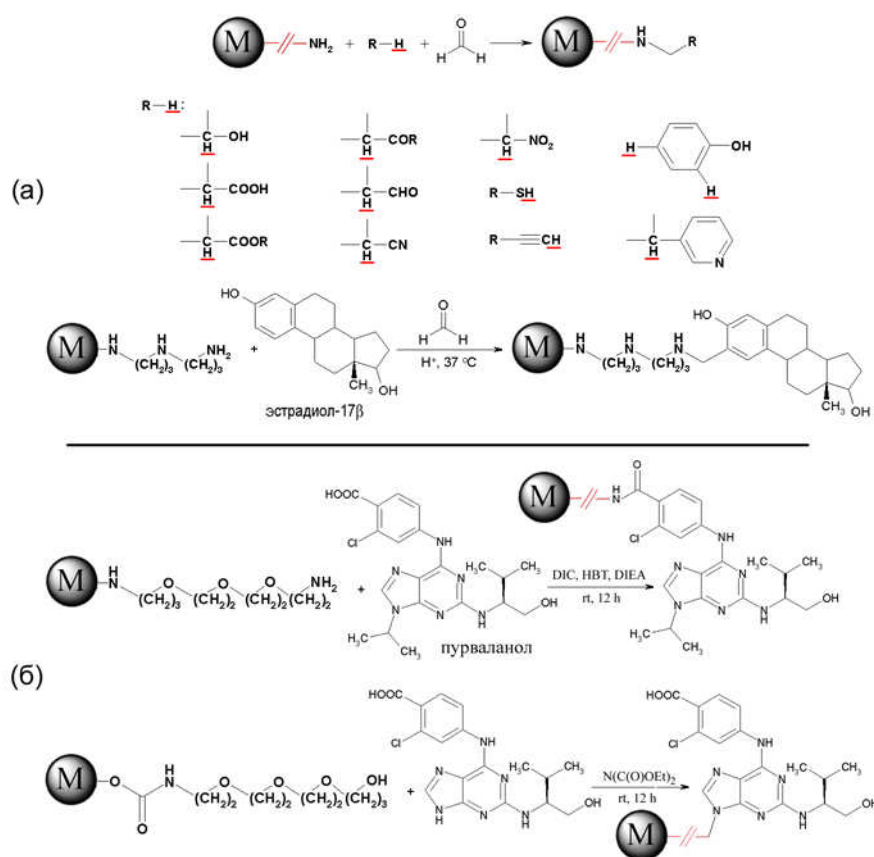


Рис. 5. (а) Использование реакции Манниха для иммобилизации низкомолекулярных лигандов
(б) возможные варианты иммобилизации пурваланола.

В данном случае, активационная аминогруппа вступает в реакцию с формальдегидом и тестируемой молекулой, содержащей в своей структуре «подвижный» водород, т.о. удастся получить разнообразные комплексы линкер - лиганд, один из которых приведен на рис. 5-а. Во многих случаях тестируемое соединение содержит в своей структуре несколько лабильных функциональных групп и атомов, которые могут быть использованы для образования различных комплексов линкер-лиганд (рис 5-б), что позволяет рассматривать не один вариант иммобилизации и существенным образом снижает вероятность инактивации структурных мотивов, играющих первостепенную роль в связывании с активным сайтом белковой молекулы.

Метод аффинной хроматографии зарекомендовал себя, как высоконадежный и практичный метод определения биологической мишени, по отношению к которой анализируемое соединение проявляет соответствующую степень биологической активности. Однако колоссальная динамика развития современного фармацевтического

рынка и требования, предъявляемые к научным исследованиям в области создания новых лекарственных препаратов, диктуют свои условия, с которыми нельзя не считаться. Именно поэтому появляются передовые уникальные роботизированные технологии, позволяющие значительно ускорить процесс поиска новых биомишеней и существенно облегчают изучение сложных механизмов действия активных соединений.

Технология ВПС

Появление высокопроизводительного биологического скрининга произвело эффект революции в сфере биологических испытаний, производительность экспериментов по сравнению с традиционными методами возросла сразу на несколько порядков. Классический вариант ВПС заключается в высокоэффективном тестировании огромного количества низкомолекулярных органических соединений с целью установления степени их активности по отношению к конкретной биологической мишени, например, белковому

ферменту, клетке, опухолевой культуре и т.д. Использование новейших роботизированных технологических систем дает возможность анализировать более 100 тыс. индивидуальных образцов в день на одной биомишени, что обычно позволяет выявить 10-100 активных соединений, так называемых «хитов». С технической точки зрения процедура ВПС включает в себя следующие стадии: 1) автоматическая подготовка микроплаты с образцами соединений; 2) доставка и дозировка необходимых реагентов; 3) некоторый, обычно очень короткий, период инкубации с поддержанием определенной температуры, рН и т.д.; 4) детекция, или автоматическая регистрация сигнала; 5) компьютерная обработка данных с выводом конечного результата. Современные рабочие системы ВПС способны работать с 96-, 384- или 1536-луночными микроплатами в полностью автоматическом режиме, а эффективность работы обеспечивается многоканальным компьютерным управлением и автоматизированными системами дозировки. Регистрацию сигналов, возникающих в процессе специфических взаимодействий между испытуемыми соединениями и биологическими мишенями, выполняет система автоматической детекции, с применением флуоресцентных,

хемилюминесцентных и радиоизотопных меток. В настоящее время уже описаны новые системы детекции, теоретически позволяющие регистрировать наличие в анализируемом образце всего одной флуоресцентной молекулы. Не секрет, что удачная техническая реализация революционных идей в любой области науки неотъемлемо влечет за собой их стремительное развитие, максимализацию возможностей и выявление характерных недостатков. Как и следовало ожидать, технология ВПС не стала исключением.

Белковые микрочипы

Высокая техническая оснащенность рабочих ВПС-станций позволяет решать целый ряд различных задач, включая высокопроизводительный анализ механизмов действия низкомолекулярных органических соединений, с использованием целой панели биологических мишеней. Во всех рассмотренных ниже случаях, такой биомишенью являются белковые макромолекулы, отвечающие за регулирование изучаемых клеточных функций.

Общая схема создания белкового микрочипа, адаптированного под технологию ВПС, приведена на рис. 6.

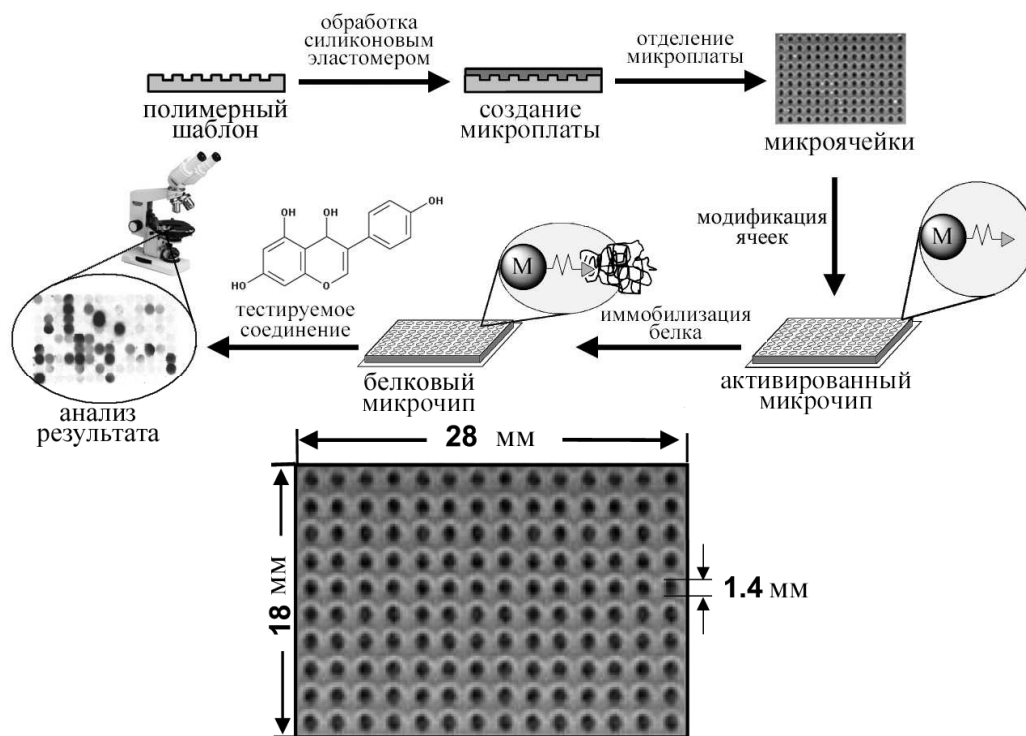


Рис. 6. Схема создания белкового микрочипа

На очищенный полимерный трафарет, например, на основе полиакрилата, наносится соответствующий силиконовый эластомер (широко используется поли(диметилсилоксан) ПДМС), в результате происходит формирование микроплаты с требуемым количеством микроячеек. Модификация ячеек осуществляется с применением различных линкерных систем. Как правило,

тип модификации зависит от природы применяемого эластомера и характера поставленной задачи. В случае применения ПДМС-эластомера рационально использовать кросслинкер на основе 3-глицидоксипропилтриметоксисилана (ГПТС), который достаточно легко может быть присоединен к силиконовой матрице простым химическим путем. Оксирановая

активационная группа ППТС способствует эффективной иммобилизации исследуемых белковых молекул, вплоть до 8×10^9 $\mu\text{g}/\mu\text{m}^2$. Полученный таким образом белковый микрочип может быть использован для различных исследований, например определения степени активности низкомолекулярного органического соединения(ий) по отношению к белковым макромолекулам, занимающим соответствующие микрочастицы в чипе. Способы регистрации сигнала достаточно разнообразны и, главным образом, зависят от характера поставленной задачи, но, как правило, применяются стандартные техники ВПС детекции, перечисленные выше. Представленная методология дает возможность проводить единовременный анализ большого количества биологических объектов с использованием одного или нескольких тестируемых соединений. В настоящее время разрабатываются белковые микрочипы, содержащие в своей структуре сотни тысяч индивидуальных микрочастиц, применение которых позволит проводить колоссальное количество микроэкспериментов., направленных на установление механизма действия тестируемых соединений по отношению к самым разнообразным биологическим мишеням.

Методы определения механизма действия активных соединений, с применением белковых микрочипов

На сегодняшний день существует целый ряд эффективных методик, способствующих быстрому определению и детальному анализу механизма действия низкомолекулярных органических соединений по отношению к исследуемой панели биологических мишеней, с применением белковых микрочипов. Рассмотрим подробнее основные возможности описанной технологии на нескольких показательных примерах.

Метод прямого тестирования, с использованием киназного микрочипа

Киназные ферменты вызывают особый интерес исследователей как в силу центральной роли, которую играют киназные каскады в процессе развития злокачественных опухолей, так и в силу уже продемонстрированной клинической эффективности для целого ряда низкомолекулярных ингибиторов различных типов киназ. В частности, тирозиновые киназы играют важнейшую роль в передаче сигнальной информации в клетках посредством катализа переноса γ -фосфатной группы аденозин-5'-трифосфата (АТФ) на белковый субстрат. Хотя киназы разных типов отличаются размерами, механизмами активации, организацией субъединиц и внутриклеточной локализацией, многие имеют структурно консервативный каталитический сайт связывания АТФ, одновременно являющийся сайтом связывания для большинства открытых к настоящему

времени киназных агентов. Консервативная природа этого сайта представляет собой серьезную проблему при открытии селективных ингибиторов. В то же время, из нее следует то, что связывание различных активных соединений происходит в сходном микроокружении, характеризующемся специфическими стерическими параметрами, липофильностью, числом центров образования водородных связей, величиной и знаком зарядов и т.д. В связи с этим, киназные ферменты входят в состав наиболее актуальных на сегодняшний день биологических мишеней, а изучение механизмов действия низкомолекулярных киназных агентов, безусловно, относится к важнейшим направлениям научных исследований в области разработки новых лекарственных препаратов.

Относительно недавно научная группа из Шотландии разработала белковый микрочип, содержащий несколько десятков индивидуальных киназных ферментов (табл. 4) [Zhu et al., 2000]. В их число входили: тирозиновые (TK), циклин-зависимые (CDK), Rho-зависимые (ROCK), чекпоинт (CHK) и многие другие наиболее значимые классы киназ. В качестве селективных ингибиторов использовались 26 коммерчески доступных низкомолекулярных органических соединений, обладающих нано- и микромолярной активностью, некоторые из них представлены в таблице 4. Многие белковые макромолекулы были получены с использованием генетической инженерии. Рекомбинантные ДНК, несущие ген, однозначно кодирующий требуемый киназный фермент, встраивали в соответствующий вектор, который вводил в бактериальную клетку, наиболее подходящую для экспрессии целевого белка. В качестве векторов использовали различные бактериофаги: λ , M13, T7 и др., а в качестве бактериальных клеток выступали E.Coil, Sf9, Sf21 и др. Все рекомбинантные белки экспрессировались как GST- или 6xHis-связанные протеины. Выделение и очистка белковых смесей осуществлялась с использованием метода аффинной хроматографии на модифицированном геле Agarose с GSH или Ni^{2+} -хелатными линкерными системами. Некоторые киназные ферменты были выделены из эмбриональных почечных клеток 293, тканей скелетной и гладкой мускулатуры некоторых животных. Для проведения качественного и количественного анализа степени активности тестируемых соединений использовали стандартные микроплааты, формата 96-ячеек, совместимые с рабочей ВПС станцией Biomek 2000. Все киназные ферменты были иммобилизованы в соответствующие микрочастицы, с использованием подходящих линкеров и активационных групп. В качестве киназных субстратов выступали небольшие пептидные молекулы, кодируемые мономерными последовательностями соответствующих аминокислот.

Таблица 4.

Экспериментальный процент ингибирования соответствующих киназных ферментов известными активными агентами

Ингибитор	H89 Y 27632		HA Rotlerin KN62		U PD		PD		SB		SB		LY		Rapamycin		Ro 318220 KT 5720	
	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)
Концентрация ингибитора	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)
Киназные ферменты	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)	10 (µM)	20 (µM)
ММК1	10±4	0±0	11±3	0±2	0±1	0±1	44±1	95±1	11±1	1±1	7±1	4±1	0±1	6±3	1±1	6±1	81±1	81±1
МАРК2/ЕРК2	13±1	6±3	6±8	0±17	8±1	8±3	8±3	0±5	15±3	15±6	11±6	10±12	0±13	0±8	10±16	3±2	43±3	43±3
JNK1a1/SAPK1c	3±1	2±1	4±1	51±1	0±4	4±4	4±4	0±2	0±2	0±5	7±1	3±1	0±0	0±5	2±6	5±1	19±0	19±0
SAPK2α/p38	1±1	6±5	7±3	0±5	5±6	25±1	0±3	0±3	15±5	98±1	100±0	14±5	2±3	0±7	7±12	16±8	0±1	0±1
SAPK2β/p38β	3±4	0±3	3±15	0±3	2±1	10±4	0±1	4±2	5±6	90±1	97±0	26±3	2±0	0±6	12±10	3±1	2±0	2±0
SAPK3/p38γ	0±2	0±8	13±2	0±4	5±1	0±2	0±1	2±3	6±8	7±4	13±9	25±5	3±2	0±1	0±1	8±1	5±2	5±2
SAPK4/p38δ	0±3	5±1	0±11	0±1	0±22	0±1	2±3	14±3	7±9	17±10	5±8	8±3	30±2	81±3	5±17	98±0	77±1	77±1
МАРКАР-К1b	84±1	28±13	63±6	21±1	11±18	12±3	14±3	2±6	5±6	7±2	3±1	0±5	26±5	10±3	0±7	0±8	38±3	38±3
МАРКАР-К2	1±12	1±3	10±1	95±2	41±5	0±2	2±6	0±3	14±3	14±2	12±3	1±4	17±7	63±3	0±2	98±1	61±8	61±8
MSK1	97±1	43±2	81±2	62±3	19±10	0±1	0±3	29±4	0±6	0±4	12±11	15±4	32±6	49±2	26±10	4±6	42±8	42±8
PRAK	19±4	0±11	9±19	94±5	64±1	7±3	29±4	0±1	0±4	4±4	34±9	3±5	9±4	0±6	0±0	30±2	61±5	61±5
PKA	98±1	9±2	65±2	83±3	6±9	5±2	0±1	7±4	11±4	11±4	8±0	0±2	9±4	30±1	1±5	97±0	13±1	13±1
PKCα	21±1	2±0	14±1	5±2	5±5	8±2	1±1	15±2	14±4	11±4	13±9	12±9	24±4	19±4	0±5	16±9	93±1	93±1
PDK1	0±3	0±12	8±2	64±2	30±7	1±1	15±2	11±4	18±1	38±1	47±2	4±6	40±2	1±2	9±0	27±0	64±4	64±4
PKBα	83±1	10±0	12±5	73±3	33±8	21±5	11±4	0±14	10±1	17±5	2±1	0±7	28±1	65±0	0±6	79±0	71±2	71±2
SGK	75±1	0±5	8±5	19±0	22±5	9±1	0±14	14±0	0±2	13±1	25±1	0±3	19±7	75±0	0±2	94±0	34±2	34±2
S6K1	100±0	6±3	68±1	2±7	7±5	8±3	0±3	17±3	0±1	34±3	39±6	15±10	47±1	70±1	11±9	95±0	61±3	61±3
GSK3β	0±2	8±9	10±5	87±1	62±4	0±3	0±4	20±3	23±1	34±3	39±2	9±1	0±10	45±2	8±2	8±2	16±1	16±1
ROCK-II	100±0	87±2	93±1	12±7	12±0	6±1	0±4	11±3	3±4	4±2	6±0	0±1	0±0	84±0	0±0	58±0	78±1	78±1
AMPK	81±1	5±0	23±1	2±1	3±0	15±4	0±1	4±1	13±3	3±1	7±1	2±3	82±1	81±3	0±7	0±5	5±7	5±7
CK2	0±2	2±3	0±3	0±6	0±0	0±1	0±15	13±4	0±13	0±13	9±1	0±4	56±10	68±4	0±4	43±2	100±0	100±0
PHK	49±3	19±9	42±1	37±3	0±3	0±1	13±1	1±5	15±8	68±3	63±0	5±4	15±8	17±11	0±2	21±0	54±6	54±6
LCK	24±8	0±0	6±0	30±3	8±1	13±1	1±5	15±8	68±3	63±0	5±1	1±3	10±2	44±1	0±2	58±2	87±1	87±1
CHK1	81±1	1±1	18±6	0±3	0±2	5±1	0±3	1±4	5±2	5±1	5±1	1±3	10±2	44±1	0±2	58±2	87±1	87±1
CAM-KII	-	-	7±1	-	0±0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SRMLCK	-	-	7±1	-	-	-	-	-	-	-	-	0±1	-	-	-	-	-	-

Тестирование панели киназных ферментов

Имя фермента	Синтез	Активность	Содержание	Локализация	Функция	Связь с жирными кислотами	Связь с белками	Связь с липидами	Связь с углеводами	Связь с нуклеиновыми кислотами	Связь с ионами	Связь с другими факторами	Связь с другими факторами
SmMLCK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PKC δ	-	-	44 \pm 3	-	-	-	-	-	-	-	-	96 \pm 1	-
MKK3	5 \pm 1	-	0 \pm 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MKK4	20 \pm 3	-	-	0 \pm 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MKK6	14 \pm 1	-	-	19 \pm 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MKK7	9 \pm 2	-	-	21 \pm 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PI3-kinase	-	-	-	11 \pm 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRK2	-	94 \pm 1	85 \pm 1	-	-	-	-	-	-	-	-	0 \pm 0	87 \pm 0
PKA	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ROCK-I	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ROCK-II	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRK-1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PKC δ	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAM-KI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAM-KII	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAM-KIII	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAM-KIV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MKK1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ERK5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAPK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PDK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAPK2 α /p38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAPK2 β /p38 β 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PI3-kinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mTOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PKC α	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

синим цветом выделены киназы, которые уже являются хорошо известными биомишнями для протестируемых соединений.
 -«жирным» выделены те значения, которые соответствуют проценту ингибирования, превышающему 80% порог, по сравнению с контрольной концентрацией меченого комплекса [γ - 32 P]АТФ-киназный фермент на заключительном этапе инкубационного периода.

Оригинальная расшифровка используемых в таблице аббревиатур: **AMPK**, AMP-activated protein kinase; **SAM-K**, calmodulin-dependent protein kinase; **CHK**, checkpoint kinase; **CK2**, casein kinase 2; **CREB**, cAMP-response element binding protein; **EGF**, epidermal growth factor; **ERK**, extracellular-signal-regulated kinase; **GSK3**, glycogen synthase kinase 3; **HMG**, high-mobility group; **JNK**, c-Jun N-terminal kinase; **LCK**, lymphocyte kinase; **MAPK**, mitogenactivated protein kinase; **MARKAP-K1**, MARK-activated protein kinase-1; **MARKAP-K2**, MARK-activated protein kinase 2; **MKK**, MARK kinase (или **MEK**); **MLCK**, myosin light chain kinase; **MNK**, MARK-integrating kinase; **MSK1**, mitogen- and stress-activated protein kinase 1; **mTOR**, mammalian target of rapamycin; **PDK1**, 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1; **PI3-kinase**, phosphoinositide (phosphatidylinositol) 3-kinase; **PKA**, cAMP-dependent protein kinase; **PKB**, protein kinase B (или **Akt**) ; **PKC**, protein kinase C; **PKG**, cGMP-dependent protein kinase; **PHK**, phosphorylase kinase; **PRAK**, p38-regulated/activated kinase; **PRK**, protein kinase C-related protein kinase; **ROCK**, Rho-dependent protein kinase; **SAPK2a**, stress-activated protein kinase 2a (или p38); **SAPK2b**, stress-activated protein kinase 2b (или p38b2) ; **SAPK3**, stress-activated protein kinase 3 (или p38c); **SAPK4**, stress-activated protein kinase 4 (или p38d); **SGK**, serum-and glucocorticoid-induced kinase; **S6K1**, p70 ribosomal protein S6 kinase; **Sk**, skeletal muscle; **Sm**, smooth muscle.

Таблица 5.

Экспериментальные значения параметра IC₅₀

Ингибитор	Киназный фермент	IC ₅₀
H89	S6K1	80 нМ
H89	MSK1	120 нМ
H89	PKA	135 нМ
H89	ROCK-II	270 нМ
H89	PKB α	2.6 μ M
H89	МАРКАР-K1b	2.8 μ M
Y 27632	ROCK-II	800 нМ
Y 27632	PRK2	600 нМ
Y 27632	MSK1	8.3 μ M
Y 27632	МАРКАР-K1b	19 μ M
Y 27632	PHK	44 μ M
HA1077	ROCK-II	1.9 μ M
HA1077	PRK2	4 μ M
HA1077	MSK1	5 μ M
HA1077	МАРКАР-K1b	15 μ M
Rottlerin	PRAK	1.9 μ M
Rottlerin	МАРКАР-K2	5.4 μ M
KN62	CAM-KII	500 нМ
U0126	MKK1	13 μ M
U0126	PRAK	50 μ M
U0126	SAPK2a/p38	55 μ M
U0126	PKBa	60 μ M
PD 184352	MKK1	300 нМ
SB 202190	SAPK2a/p38	50 нМ
SB 202190	SAPK2b/p38 β 2	100 нМ
Wortmannin	SmMLCK	260 нМ
LY 294002	PI3K	10 μ M
LY 294002	CK2	6.9 μ M
Ro 318220	GSK3 β	38 нМ
Ro 318220	S6K1	15 нМ
Ro 318220	МАРКАР-K1b	3 нМ
Ro 318220	MSK1	8 нМ
Ro 318220	PKC α	33 нМ
KT 5720	PHK	11 нМ
KT 5720	PDK1	300 нМ
KT 5720	PKA	3.3 μ M

жирным шрифтом выделены значения IC₅₀, принадлежащие наномолярному диапазону

Инкубационный период длился в течение 40 минут при температуре 30 °С. Концентрация [γ -³²P]АТФ и ацетата магния, который использовался для инициации ферментативной реакции, составляла 0.1 мМ и 10 мМ соответственно. Заметим, что приведенное значение для меченного [γ -³²P]АТФ в 5-10 раз превышает значение K_m для большинства из исследуемых киназных ферментов и значительно меньше нормальной внутрисклеточной

миллимолярной концентрации. Эксперимент проводился в присутствии соответствующих тестируемых соединений в концентрациях, приведенных в таблице 4. Значения параметра IC₅₀ для некоторых высокоактивных агентов отражены в таблице 5.

По результатам исследования было выявлено несколько высокоселективных соединений, обладающих наномолярной степенью киназной активности. Например, известно, что U0126 эффективно ингибирует МКК1 и широко используется для подавления классических МАРК клеточных каскадов. Этот факт полностью подтвердился результатами проведенного эксперимента. Степень активности U0126 по отношению к МКК1 составила 13 μ M, однако стоит отметить, что полученное значение параметра IC₅₀ в 40 раз превышает требуемый порог концентрации, необходимый для эффективного ингибирования EGF-инициируемой активации ERK2 киназы - физиологического субстрата МКК1 или МАРКАР-K1 киназы - физиологического субстрата ERK2 в 3Т3 клетках (рисунок 7-а). Это наблюдение позволяет сделать вывод о том, что в этих условиях U0126 оказывает существенный эффект исключительно за счет незначительного подавления МКК1-активности, но не блокирует ее полностью. Как видно из концентрационной диаграммы, значение параметра IC₅₀ для исследуемого соединения составляет 70 нМ, что во много раз превышает значение, приведенное в таблице 4. Было установлено, что U0126 селективно ингибирует МКК1 в условиях Raf-каталитического фосфорилирования, не оказывая непосредственного влияния на с-Raf и не блокируя тем самым фосфорилирование миеллина (рис. 7-б). Приведенные наблюдения говорят о том, что эффект, который оказывает U0126 в 3Т3 клетках, может быть объяснен двумя основными факторами: наличием определенного равновесного состояния в процессе фосфорилирования и дефосфорилирования МКК1 киназы при относительно небольшой концентрации U0126 в условиях Raf-катализа и реализацией преимущественно с дефосфорилированной формой МКК1, что влечет за собой определенные конформационные изменения в структуре фермента и "выключает" его из внутриклеточных каскадных процессов передачи сигнала.

Аналогичная ситуация наблюдается и в случае соединения PD184352, которое является высокоселективным ингибитором МКК1 и способствует значительному подавлению ангиогенеза опухолевых клеток. Эксперимент показал, что PD184352 на 95% ингибирует активность МКК1 киназы со значением параметра IC₅₀ = 300 нМ,

намного большим, чем требуемая концентрация для 50% ингибирования EGF-индуцируемой активации ММК1 киназы в 3Т3 клетках. Как и в случае с U0126, это также может объясняться равновесным подавлением Raf-каталитического фосфорилирования ММК1 или связыванием с преимущественно дефосфорилированной формой рассматриваемой киназы.

По результатам эксперимента удалось однозначно подтвердить высокоселективный характер действия SB 202190 и структурно родственного ему SB 203580 на семейство SAPK2 киназ. Средний процент ингибирования в данном случае составил 96,25 %, что почти в два раза превышает значение этого параметра для остальных протестированных киназных ферментов. Кроме того, наномолярный диапазон 50% ингибирования позволяет говорить о высокой активности этого соединения, представляющего несомненный интерес, который, главным образом, обусловлен рядом

факторов, непосредственно связанных с механизмом его действия. Ранее утверждалось, что SB 203580 является селективным ингибитором PDK1 киназы *in vitro*, и тем самым объяснялась его способность блокировать интерлейкин-2-зависимую дифференциацию Т-клеток. Однако в условиях проведенного эксперимента с использованием различных PDK1 субстратов, не удалось обнаружить существенной активности данного соединения по отношению к рассматриваемому классу киназ. Кроме того, было показано, что SB 203580 не подавляет активацию PDK1 киназы, инициируемую iGF-I, пероксидом водорода или тепловым шоком в клетках 3Т3 и HEK-293. Приведенные факты позволяют предположить существование иного механизма действия SB 203580, не исключающего определенного участия SAPK2 киназ в процессе дифференциации Т-клеток.

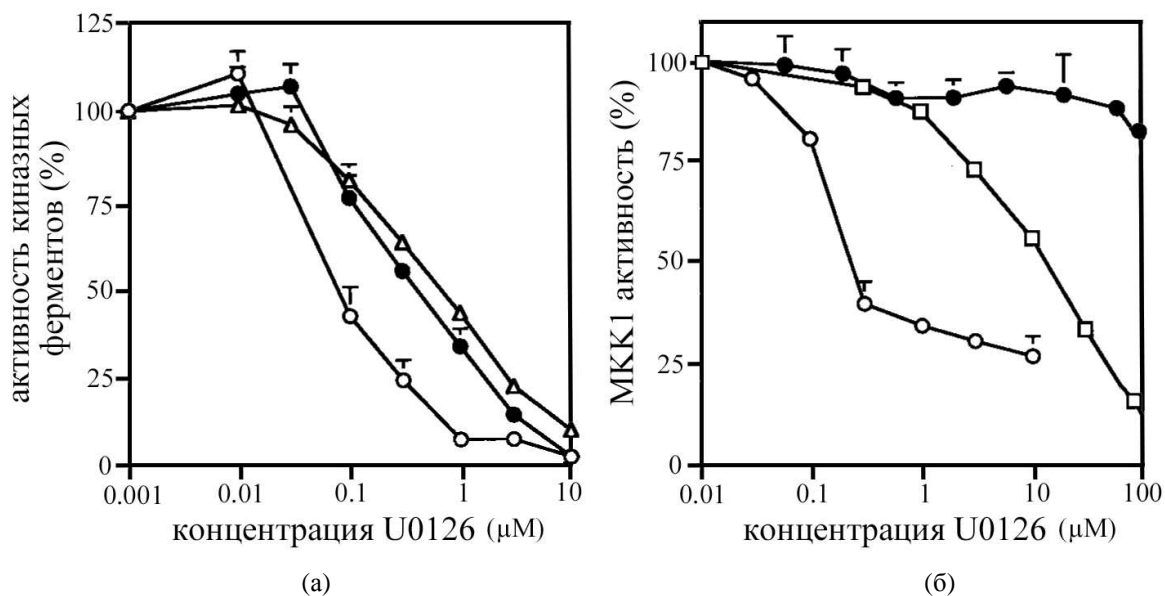


Рис. 7. (а) Концентрационные кривые, отражающие зависимость процента ингибирования ММК1, ERK2 и MAPKAP-K1 киназ от концентрации ингибитора в клетках 3Т3;
(б) Количественный процент ингибирования ММК1 в условиях Raf-катализа *in vitro*

Ярким примером соединений, обладающих неявным механизмом действия, является соединение Y27632, которое относили к числу высокоселективных ингибиторов ROCK-I/II и PRK1 киназ. Действительно, проведенный эксперимент подтвердил эти данные, кроме того, удалось обнаружить еще один класс киназ, по отношению к которому Y27632 проявил высокую наномолярную активность, а именно 600 нМ (PRK2). Заметим, что

PRK1 и PRK2 обладают значительным структурным и генетическим подобием, однако каталитические домены PRK1/2 и ROCK-I/II состоят из абсолютно разных аминокислотных последовательностей и перекрываются всего лишь на 35-38%. Было также обнаружено, что Y27632 ингибирует MSK1, MAPKAP-K1b, RSK2 и RHK киназы со значением IC₅₀, принадлежащим микромолярному диапазону.

По результатам исследования было установлено, что многие протестированные соединения обладают достаточно широким спектром киназной активности. Например, утверждалось, что Н89 относится к числу селективных ингибиторов РКА-киназы. Действительно, по данным эксперимента значение IC_{50} для рассматриваемого соединения по отношению к РКА-киназе составляет 135 нМ. Однако удалось обнаружить и другие восемь типов киназных ферментов, по отношению к которым Н89 проявил наномолярную степень активности (80-270 нМ) (табл. 5). Процент ингибирования в данном случае составил 80-100% (табл. 4). Другой селективный ингибитор РКА-киназы - КТ 5720 также действует на целый ряд киназных энзимов, а степень его активности по отношению к РНК-киназе более чем в 300 раз превышает РКА-активность. Отметим, что Роттлерин (Rottlerin), который по литературным данным оказывает селективное воздействие на РКС δ киназу, в условиях рассматриваемого эксперимента существенной РКС δ -активности не обнаружил, однако удалось определить другие актуальные киназные ферменты MAPKAP-K2 и PRAK, по отношению к которым значение параметра IC_{50} составило соответственно 5,4 μ и 1,9 μ . Не смотря на то, что наибольший интерес в плане создания новых противоопухолевых лекарственных препаратов представляют именно селективные ингибиторы киназных ферментов, соединения, обладающие широким спектром активности не менее значимы. Они часто используются в клеточных исследованиях для «выключения» определенных типов киназ с целью изучения механизмов действия других, непосредственно вовлеченных в каскадные процессы передачи внутриклеточного сигнала.

Наиболее существенным является тот факт, что мишень-специфичный профиль большинства киназных ингибиторов, использованных в приведенной работе, не может быть непосредственно определен, основываясь только на структурном и генетическом подобии исследуемых ферментов. Например, Ro 318220 эффективно ингибирует две изоформы РКС киназы РКС α и РКС β , но практически не оказывает влияния на РКС ϵ , РКС ξ и другие типы семейства AGC, такие, как РКА и PKG. С другой стороны, Ro 318220 эффективно ингибирует GSK3 киназу, которая относится к совершенно другому семейству. Интересная ситуация наблюдается и в случае соединения SB 203580, которое обладает высокой селективностью и наномолярной активностью по отношению к двум

типам киназ SAPK2a/p38 и SAPK2b/p38 β , принадлежащих одному MAPK семейству и обладающих высокой степенью родства. Однако, существенная инертность SB 203580 в случае SAPK3/p38 γ и SAPK4/p38 δ киназ может быть объяснена только следующим фактом. При анализе трехмерных кристаллографических комплексов SAPK2a/p38 с лигандами, обладающими высоким структурным подобием по отношению к SB 203580, удалось выяснить, что для эффективного связывания 4-фторфенильной группы SB 203580 с активным центром фермента необходимо наличие в позиции 106 аминокислотного остатка не превышающего по объему треонин. Приведенному структурному ограничению соответствуют именно SAPK2a/p38 и SAPK2b/p38 β киназы. Отметим, что некоторые другие типы киназ, а именно: Raf и LCK, хоть и имеют в этой позиции треонин или сериновые фрагменты, в значительно меньшей степени ингибируются SB 203580, что подтверждается более высоким значением параметра IC_{50} . Из этого следует, что установленная структурная особенность существенным образом влияет исключительно на селективность рассматриваемого активного соединения и практически не влияет на степень его активности. Очевидно, что обратная ситуация, в которой активные агенты, (в том числе и киназные) имеющие достаточно схожую химическую структуру, обладают совершенно разным профилем биологической активности, составляет не менее актуальную проблему в области изучения механизмов действия лекарственных препаратов.

Анализ киназной активности, с использованием конкурентного связывания

На сегодняшний день известно всего лишь несколько эффективных лекарственных препаратов, таких как: Иматиниб (Гливек), Гефитиниб (Иресса) и Ерлотиниб (Тарсева), селективно подавляющих киназную активность, которые широко применяются для лекарственной терапии некоторых опухолевых заболеваний. Более 30 ингибиторов находятся на преclinical или clinical стадиях испытаний. Отметим, что среди 500 киназных ферментов, однозначно кодируемых человеческим геномом, более 90% имеют в своей структуре активный сайт связывания с АТФ. Именно этот факт в значительной степени определяет приоритетное направление в создании новых киназных агентов.

Таблица 6.

Соединения, протестированные в рассматриваемой работе

Ингибитор	Актуальная биомшень	Фаза биологических испытаний
Стауроспорин	Рап-ингибитор	на стадии исследований
SB202190	p38 α	на стадии исследований
SB203580	p38 α	на стадии исследований
VX-745	p38 α	Фаза 2 (приостановленно)
BIRB-796	p38 α	Фаза 3
SP600125	JNK	на стадии исследований
Иматиниб	ABL, KIT, PDGFR	одобрено
Гефитиниб	EGFR	одобрено
Еротиниб	EGFR	одобрено
CI-1033	EGFR семейство	Фаза 2
GW-2016	EGFR, ERBB2, ERBB4	Фаза 3
EKB-569	EGFR, ERBB2	Фаза 2
ZD-6474	VEGFR2, EGFR	Фаза 2
Ваталаниб/PTK-787	VEGFR2	Фаза 3
SU11248	VEGFR2, PDGFR, FLT3, KIT	Фаза 3
MLN-518	FLT3	Фаза 1
LY-333531	PKC β	Фаза 3
BAY-43-9006	RAF1	Фаза 3
Росковитин/CYC202	CDK2	Фаза 2
Флавопиридол	CDK1, CDK2, CDK4	Фаза 2 (приостановленно)

Сравнительно недавно была опубликована интересная работа, в которой рассматривается новая эффективная методика определения киназной мишень-специфичности и количественной степени активности низкомолекулярных органических соединений, селективно взаимодействующих с АТФ сайтом связывания [Fabian et al., 2005]. В работе были использованы 20 киназных ингибиторов, в число которых вошли уже известные лекарственные препараты, перечисленные выше, и 17 киназных агентов, находящихся на различных стадиях биологических испытаний (табл. 6).

В качестве биологических мишеней использовались 119 индивидуальных киназных ферментов, в том числе 6 мутационных форм ABL-киназы, которые были получены направленным клонированием, с использованием T7 бактериофага, паразитирующего в клетках *E. coli*. Каждый вектор кодировал 415 копий основных капсульных белков, среди которых около 10 являлись киназными ферментами требуемого типа, которые экспрессировались как C-N связанные белки, равномерно распределенные по поверхности бактриофага. Инкубационный период длился в течение 1,5 часов при температуре около 32 °C, с использованием стандартных полистириновых ВПС микроплат, формата 96 ячеек. Лизаты, полученные с применением технологии быстрого замораживания и размораживания, подвергались центрифугированию,

с целью очистки от твердофазных продуктов разрушения бактериальной оболочки. Общий принцип разработанного подхода, с использованием метода конкурентного связывания приведен на рис. 8.

Каждая микрочайка была модифицирована стрептавидин-магнитной матрицей с биотинилированным лигандом. В качестве иммобилизованных лигандов, селективно связывающихся с АТФ сайтом киназных ферментов, использовали соединения, активные по отношению к наибольшему числу исследуемых в работе киназ и обладающие значением $K_d < 1 \mu\text{M}$. Эксперимент проводили с использованием трех основных компонентов: смеси, содержащей среди прочих белковых макромолекул исследуемый тип киназных ферментов, иммобилизованного биотин-модифицированного низкомолекулярного лиганда и тестируемого соединения из таблицы 6. Реакционный период длился в течение 1 часа при температуре 25 °C. Как видно из рис. 8, в отсутствие тестируемого соединения белковые макромолекулы взаимодействовали исключительно с иммобилизованным лигандом, что позволило достаточно точно определить среднее количество связавшихся киназных ферментов. Было установлено, что данный метод детекции не уступает в точности другим, широко используемым методикам, включая кПЦР фаговый мониторинг, и обладает высокой степенью чувствительности, позволяющей

регистрировать сигнал, исходящий от одной белковой молекулы. При наличии свободного тестируемого соединения возможны три сценария: конкурентное связывание с АТФ активным сайтом киназного фермента, аллостерическое взаимодействие с альтернативным сайтом связывания или отсутствие любого взаимодействия. В первых двух случаях тестируемое соединение может образовывать комплекс с сайтом связывания белковой

макромолекулы, устойчивость которого характеризуется значением константы связывания. Таким образом, меньшее количество киназных ферментов будет доступно для взаимодействия с иммобилизованным лигандом. Очевидно, что при отсутствии такого взаимодействия практически все киназы будут образовывать соответствующий комплекс только с иммобилизованным лигандом, а тестируемые соединения подвергнутся элюированию.

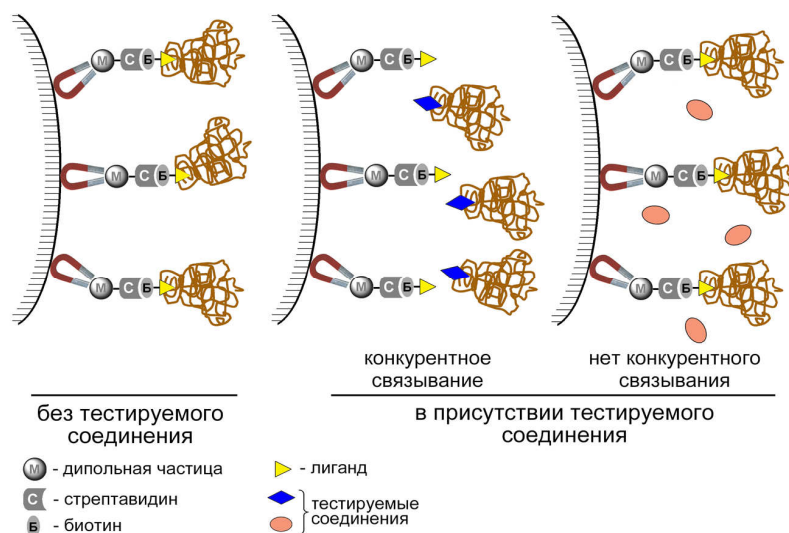


Рис. 8. Общий принцип определения биологической мишени с применением метода конкурентного связывания

Используя описанную методологию для каждого тестируемого соединения из таблицы б удалось определить профиль киназной активности и количественную меру взаимодействия с АТФ активным сайтом фермента или аллостерическим сайтом связывания. Валидация метода проводилась с использованием р38α MAP киназы в качестве биомишени. В качестве тестируемых соединений выступали: SB202190, SB203580, BIRB-796 и VX-745

в количестве 10 μM. По результатам эксперимента было установлено, что все перечисленные агенты обладают высокой константой связывания (K_d) с рассматриваемым классом киназ, которая во много раз превышает пороговое значение, определяемое природой иммобилизованного лиганда; в данном случае использовался биотинилированный SB202190 (рис. 9).

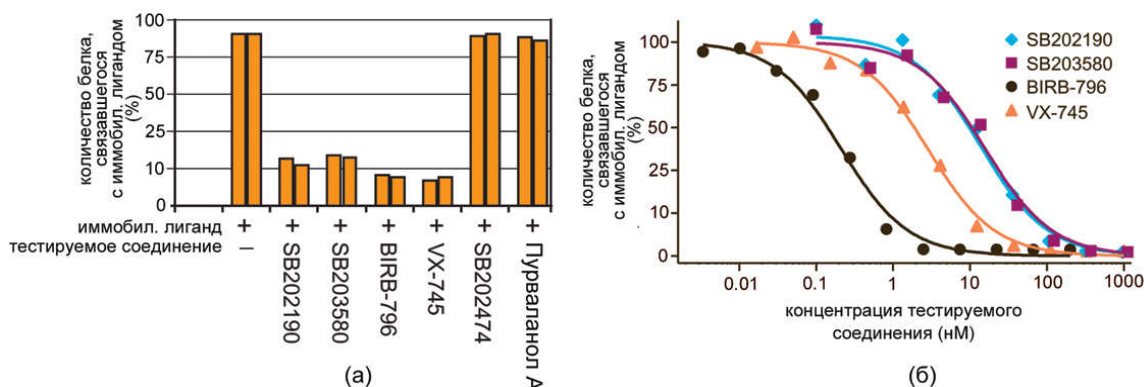


Рис. 9. (а) Диаграмма, отражающая зависимость концентрации комплекса р38α MAP- биотинилированный лиганд от характера конкурентного ингибитора; (б) количественная степень связывания тестируемого соединения с активным центром фермента

Кроме того, удалось показать, что применяемая методика может быть использована для эффективного определения аллостерического характера связывания. Так, известно, что BIRB-796 взаимодействует именно с аллостерическим сайтом связывания р38α MAP киназы, который находится в непосредственной близости от АТФ сайта связывания. Образующийся активный комплекс инициирует определенные конформационные изменения в ближайшем структурном окружении фермента, что в конечном итоге приводит к блокировке АТФ сайта связывания. Пурваланол А и SB202474 использовали в качестве «контрольных» агентов, которые в условиях эксперимента не проявили рассматриваемой активности, что в свою очередь подтверждает корректность предложенной методики, а полученные значения константы связывания для протестированных соединений полностью соответствуют опубликованным.

После удачной экспериментальной валидации разработанного метода все соединения, представленные в таблице 6, были протестированы на панели биомишеней, состоящей из 113 индивидуальных киназных ферментов. В качестве иммобилизованного биотин-модифицированного лиганда применяли Стауроспорин, который эффективно взаимодействует со 104 из 113 исследуемых белковых молекул с константой связывания, лежащей в диапазоне 20 pM - 7 μM. По результатам эксперимента удалось определить несколько групп соединений, которые обладают соответственно низкой, умеренной и высокой степенью селективности по отношению к киназным ферментам. Частичные результаты проведенного исследования представлены на рисунке 10. Например, соединения SU11248 и ЕКВ-569 можно отнести к первой группе, а Ваталаниб и GW-2016 - исключительно к высокоселективным агентам.

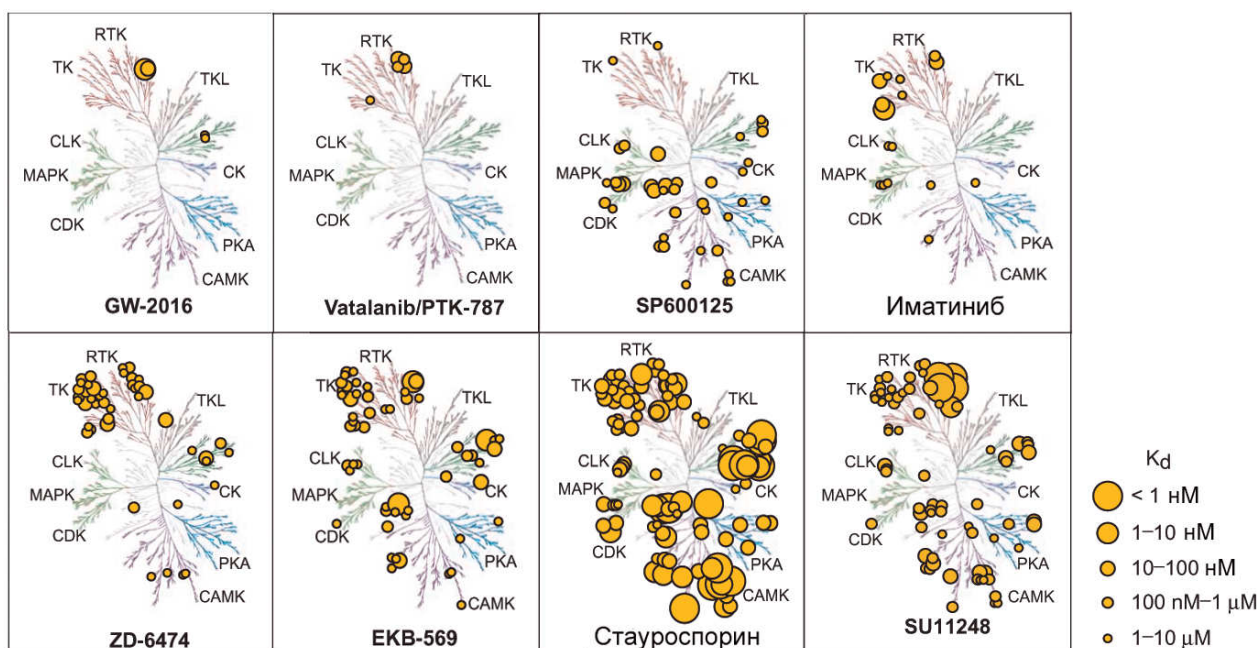


Рис. 10. Качественные и количественные результаты эксперимента, представленные на фоне структурированных киназных диаграмм (www.cellsignal.com). Родственные по своему строению и генотипу классы киназных ферментов занимают близкие области на диаграмме

Использование панели киназных биомишеней заставило пересмотреть существующие данные для некоторых известных активных агентов. Например, ранее считалось, что CI-1033 является высокоселективным ингибитором трех представителей семейства EGFR киназ и не проявляет активности по отношению к остальным семи классам рецепторных тирозинных киназ (RTK),

киназам класса «С» (PKC) и циклин-зависимым киназам (CDK). Однако, по результатам проведенного эксперимента, удалось определить 36 киназных ферментов, с активными центрами которых CI-1033 образует устойчивые комплексы, характеризующиеся достаточно высокой степенью связывания. Интересно, что соединения, принадлежащие к совершенно разным структурным

хемотипам, обладают схожим профилем киназной активности, например, в случае Ваталаниба и GW-2016 или VX-745 и BRIB-796. С другой стороны, соединения с высокой степенью структурного подобия в некоторых случаях способны селективно действовать на определенные киназные классы. Например, соединения BRIB-796 и BAY-43-9006 представляют собой мочевины с ароматическими заместителями, принадлежащими одному структурному ряду. Профиль их киназной активности пересекается более чем на 90% и включает в себя семейства RTK, TK, MAPK и CK киназ. Однако существует значительное количество обратных примеров, некоторые из которых также представлены в описываемой работе. Вообще, киназы, кодируемые родственными генетическими фрагментами и имеющие родственную организацию, далеко не всегда взаимодействуют с похожими низкомолекулярными органическими лигандами. Дело в том, что практически любая белковая

макромолекула представляет собой динамическую, а не статическую систему с высокой степенью конформационной подвижности. Кроме того, существует огромное количество внутриклеточных факторов, существенным образом влияющих на поведение и структурную организацию любого белка. Одним из таких факторов являются многочисленные мутационные процессы, которые в данном случае приводят к созданию резистентных форм киназных ферментов. Например, Иматиниб, который широко используется для терапии злокачественных стромальных опухолей желудочно-кишечного тракта (GIST), в некоторых случаях оказывается малоэффективным. Это непосредственно связано с мутационными процессами, происходящими в генах, кодирующих непосредственно BCR-ABL киназу – основную биомишень Иматиниба, и в ABL семействе в целом. В связи с этим некоторые соединения были протестированы на активность по отношению к 6 мутационным формам ABL1 киназы (рис. 11).

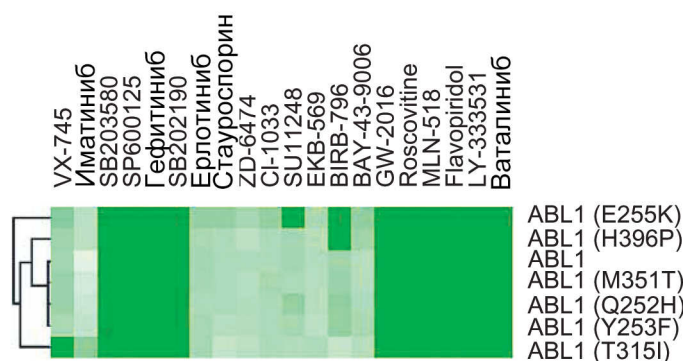


Рис. 11. Результаты тестирования по отношению к мутационным формам ABL1 киназы.

Менее насыщенный цвет на диаграмме соответствует более высокой степени активности. Слева показаны связи, организация которых соответствует мере структурного и генетического подобия между рассматриваемыми типами киназных мутационных форм. Из приведенной диаграммы видно, что Иматиниб проявляет значительно меньшую активность по отношению к самой распространенной мутационной форме ABL1 (T315I), по сравнению с ABL1 киназой.

Подводя некоторый итог, отметим основные преимущества разработанного подхода. В первую очередь необходимо отметить, что данный метод полностью соответствует требованиям высокопроизводительного биологического скрининга. Все основные стадии эксперимента адаптированы под стандартные рабочие ВПС станции. Немаловажным обстоятельством является отсутствие каких-либо химических линкерных систем

и иммобилизованного тестируемого соединения. Кроме того, экспрессионные белки не нуждаются в тщательной очистке и выделении. Нет никакой необходимости использовать радиоизотопные, флуоресцентные и другие метки, включая меченый [γ -³²P]АТФ. Способность регистрировать, наряду с конкурентным связыванием с АТФ активным сайтом, различные аллостерические взаимодействия дают возможность более широко исследовать механизмы действия активных соединений.

В процессе установления механизма действия любого лекарственного соединения одной из неотъемлемых является стадия детекции сигнала, позволяющая качественно и количественно оценить специфику взаимодействия системы «биомишень-лиганд». Наряду с классическими методами детекции, основанными на применении радиоактивных, флуоресцентных и хемилюминесцентных комплексов, активно

развиваются новые подходы, связанные с использованием в качестве детекционных меток индивидуальных ДНК и РНК фрагментов. В частности, технология фагового мониторинга с использованием модифицированных капсульных белков представляет собой уникальную систему детекции сигнала, основанную на моновалентном присоединении тестируемых соединений к белковой макромолекуле, генетически воспроизведенной в бактериальной клетке и непосредственно примыкающей к определенному капсульному белку (рис. 12).

В качестве такой макромолекулы часто используют белок пептидилтрансферазу (ПТБ). Последовательность ДНК, кодирующая ПТБ, встраивается в подходящий вектор с применением методов генетической инженерии. Фрагменты ДНК (ДНК-зонды) интегрируются непосредственно за геном, кодирующим ПТБ и соответствующий капсульный белок, после чего индивидуальные векторы воспроизводятся в бактериальных клетках, например *E. coli*. Таким образом, удается получить клоны, каждый из которых содержит в своей структуре уникальный ДНК-зонд. Химическое присоединение тестируемых молекул к специфическому сайту молекулы ПТБ происходит в условиях ферментативного катализа, с использованием соответствующего комплекса, образованного анализируемым соединением и коферментом. Эта стратегия позволяет достаточно простым путем получить индивидуальные бактериофаги с моновалентно присоединенными к ним лекарственными соединениями, каждое из которых кодируется уникальным фрагментом ДНК. Такой подход позволяет на стадии непосредственного биологического тестирования объединять полученные бактериофаги, несущие сотни образцов химических соединений. Анализ мишень-специфичного профиля может осуществляться несколькими методами, например, с использованием белковых микрочипов или метода аффинной хроматографии. После того как произойдет специфичное связывание, осуществляется многократное усиление и детекция сигнала активных молекул с использованием гибридационного анализа (например, амплификация индивидуальных

ДНК зондов по методу полимеразной цепной реакции). Описанный подход представляет собой комплексную методологию, позволяющую осуществлять эффективное тестирование тысяч индивидуальных лекарственных соединений с целью анализа механизмов их действия. К сожалению, большая часть существующих библиотек клонированных ДНК, кодирующих соответствующие белки, никак не предусматривает возможность их дальнейшей детекции, и, как следствие, не способствуют определению актуальной биомишени и установлению механизмов действия новых лекарственных препаратов. Но время не стоит на месте, и появляются все новые более эффективные экспериментальные методы, позволяющие с высокой точностью и скоростью проводить единовременный комплексный анализ большого количества химических соединений с привлечением сотен биологических мишеней [Takahashi et al., 2003; Frankel et al., 2003]. Одним из таких передовых методов является технология Y3H (yeast three-hybrid) [Becker et al., 2004], которая главным образом основана на применении уже известного и широко используемого подхода Y2H. Ключевым моментом в рассматриваемых методиках является использование так называемых химических индукторов белковой димеризации (ХИБД или англ. CIDs – chemical inducers of dimerization), которые часто используются для изучения различных биологических процессов. Однако ХИБД могут быть эффективно использованы и для определения биологической мишени, например в клетках *E. coli*. Алгоритм функционирования Y3H системы заключается в ковалентном присоединении лекарственного соединения (Л) простым химическим путем к органическому лиганду, специфически взаимодействующему с определенной биологической мишенью (Р) (рис. 13). Заметим, что соответствующие линкерные комплексы устроены таким образом, что лиганд обладает способностью легко проникать в клетки бактерий, тем самым, осуществляя транспортировку анализируемого образца. В качестве таких лигандов часто используют Дексаметасон (DEX), Метотрексан (MTX) или некоторые синтетические гормоны, например, Эстрон.

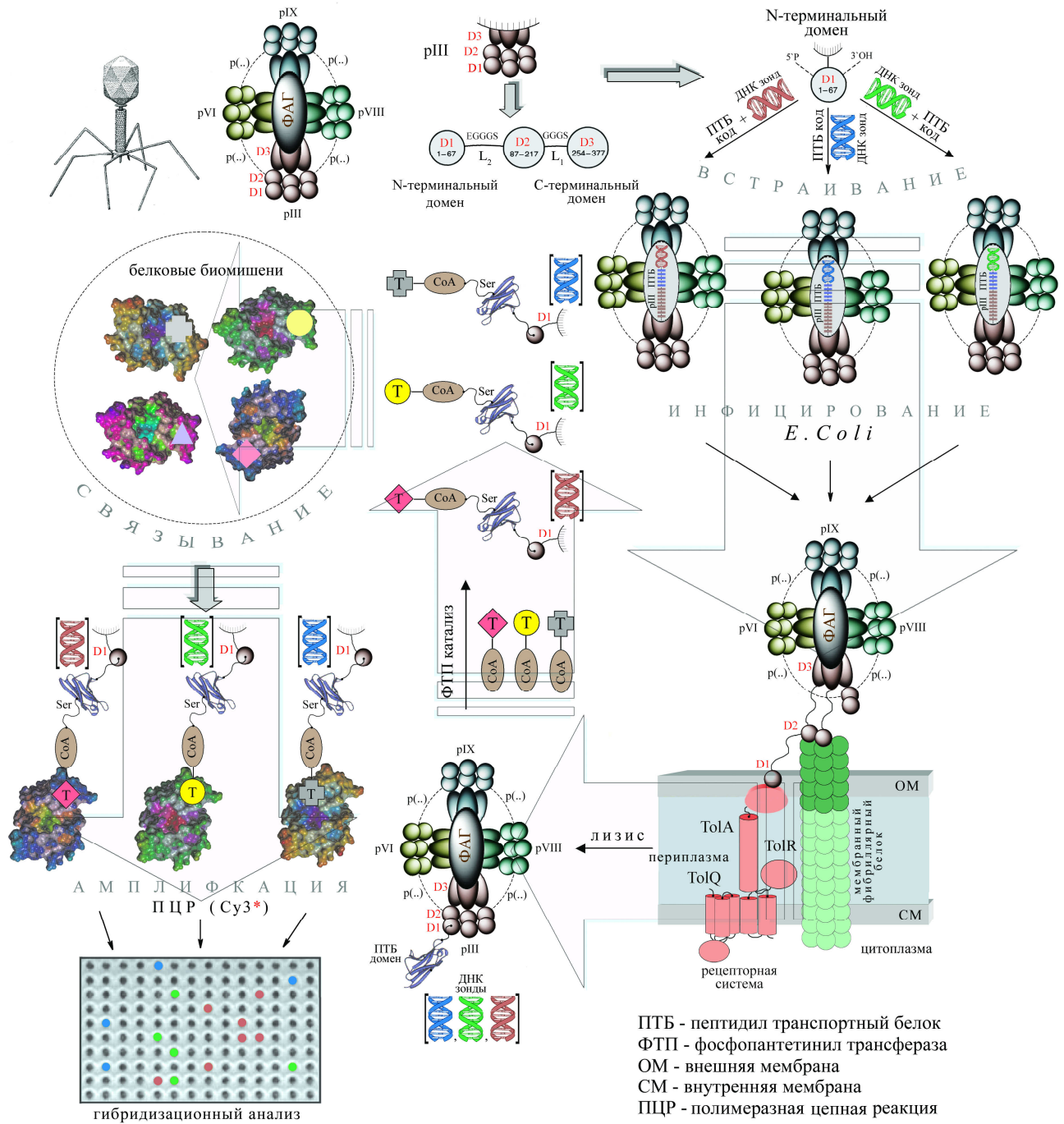


Рис. 12. Применение технологии фагового мониторинга для анализа механизмов действия лекарственных соединений

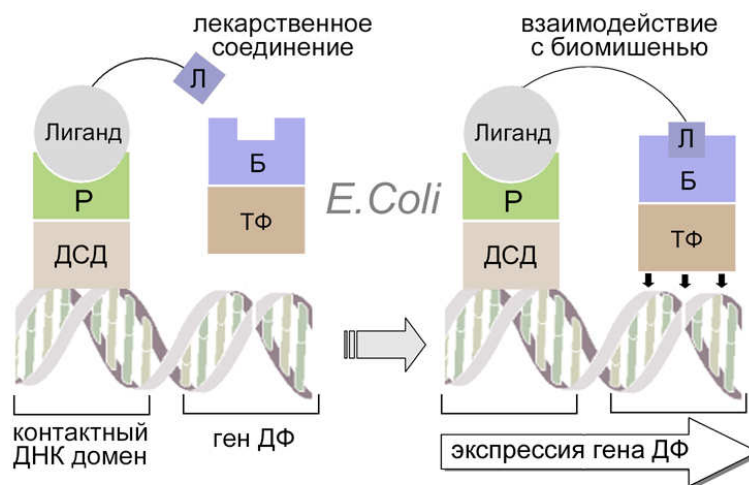


Рис. 13. Технология Y3H (yeast three-hybrid)

Биологическими мишенями в данном случае могут выступать DMS-зависимый глюкокортикоидный рецептор, дигидрофолат редуктаза (DHFR) или рецепторы, чувствительные к соответствующим гормонам, например, эстрогеновый рецептор (ER). Они экспрессируются в бактериальных клетках, как ДСД связанные рецепторные системы (ДСД – ДНК связанный домен, англ. DBD), с применением одного из методов генетической инженерии. В качестве ДСД часто используют бактериальный белок LexA, который непосредственно связан с молекулой ДНК в области, кодирующей определенный детекционный фактор (ДФ). Как правило, ДФ – это легко детектируемое прямым или косвенным путем органическое соединение, представляющее собой фермент, например β -галактозидаза, или ауксотрофный маркер, например HIS3. Актуальная биологическая мишень (рис. 13 - Б) экспрессируется в бактериальных клетках, как ТФ связанный белок (ТФ – транскрипционный фактор). Наиболее распространенными являются GAL4 и V42 факторы, представляющие собой белковые макромолекулы, способные специфично взаимодействовать с определенными участками ДНК и вызывать тем самым экспрессию гена, кодирующего соответствующий ДФ. Заметим, что на сегодняшний день существуют огромные библиотеки клонированных ДНК, которые программируют тысячи белковых комплексов Б-ТФ. Ключевой стадией процесса является взаимодействие лекарственного соединения с биологической мишенью, в результате которого происходит димеризация ДСД-связанного комплекса с анализируемым белком (Б). Это взаимодействие активирует соответствующий транскрипционный фактор, стимулирующий

экспрессию гена ДФ. Совсем недавно с применением описанного метода было осуществлено тестирование некоторых лекарственных агентов, таких как Пурваланол Б, Ме-Пурваланол Б, Росковитин и др., обладающих высокой активностью по отношению к некоторым классам киназных ферментов ([Becker et al., 2004]. В рамках проведенной работы, удалось показать, что помимо уже известных киназных биомишеней, таких как CDK(1,2,5-7), CSNK1(D-G) и ERK1/2, анализируемые соединения проявляют высокую степень активности по отношению и к другим, не менее значимым классам. Например, было обнаружено, что Пурваланол Б эффективно связывается с некоторыми киназами, принадлежащими классам CMGC, AGC и TK. Кроме того, экспериментальные наблюдения в очередной раз подтвердили тот факт, что на первый взгляд похожие химические агенты могут обладать совершенно разной степенью активности по отношению к одним и тем же биологическим мишеням. В данном случае велика роль, как центрального структурного фрагмента, так и боковых заместителей, специфическим образом взаимодействующих с определенными участками белковой макромолекулы. Заметим, что все стадии эксперимента полностью совместимы с технологией ВПС, а минимальное количество ограничений не оказывает существенного влияния на его производительность и точность.

В заключении необходимо отметить, что описанные в работе методы анализа механизмов действия лекарственных соединений являются всего лишь малой частью тех подходов, которые существуют на сегодняшний день в мировой фармацевтической индустрии. Однако авторы надеются, что рассмотренные примеры позволяют

читателю более уверенно ориентироваться в мире современных биохимических технологий, отчетливо понимая всю сложность решаемых задач.

Автор выражает искреннюю признательность за помощь при подготовке рукописи статьи д.б.н. Вахитовой Ю.В., а также сотрудникам ИБГ УНЦ РАН к.б.н. Ямиданову Р.С. и к.б.н. Бикбулатовой С.М.

Цитированная литература

1. Зефирова О.Н. Курс лекций по медицинской химии. МГУ, ХимФак, Москва, 2002 г. (неопубл.)
2. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л. Рецепторы физиологически активных веществ. Москва, Медицина, 1987, с. 350.
3. Balakin K.V. Pharmaceutical Data Mining: Approaches and Applications for Drug Discovery // John Wiley and Sons, 2009: 565 p..
4. Bannwarth W., Hinzen B. Combinatorial chemistry: from theory to application // Wiley-VCH, 2006
5. Braun P., Hu Y, Shen B, Halleck A, Koundinya M, Harlow E, LaBaer J. Proteome-scale purification of human proteins from bacteria. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Mar 5;99(5):2654-9.
6. Becker F, Murthi K, Smith C, Come J, Costa-Roldán N, Kaufmann C, Hanke U, Degenhart C, Baumann S, Wallner W, Huber A, Dedier S, Dill S, Kinsman D, Hediger M, Bockovich N, Meier-Ewert S, Kluge AF, Kley N. A three-hybrid approach to scanning the proteome for targets of small molecule kinase inhibitors. // Chem Biol. 2004. 11(2): 211-23.
7. Davies S.P., Reddy H., Caivano M., Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors // Biochem. J. (2000). 351, 95-105
8. Fabian MA, Biggs WH 3rd, Treiber DK, Atteridge CE, Azimioara MD, Benedetti MG, Carter TA, Ciceri P, Edeen PT, Floyd M, Ford JM, Galvin M, Gerlach JL, Grotzfeld RM, Herrgard S, Insko DE, Insko MA, Lai AG, Lélias JM, Mehta SA, Milanov ZV, Velasco AM, Wodicka LM, Patel HK, Zarrinkar PP, Lockhart DJ. A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. // Nat Biotechnol. 2005. Mar; 23(3):329-36.
9. Frankel A, Li S., Starck S.R., Roberts R W.. Unnatural RNA display libraries // Current Opinion in Structural Biology. 2003, 13: 506–512.
10. Hüser J. High-throughput screening in drug discovery // Wiley-VCH, 2006: 344 p..
11. Lebediker M., Danieli T. Purification of proteins fused to maltose-binding protein. // Methods Mol Biol. 2011;681:281-93.
12. Mukund S. C. Drug Discovery and Development: Drug Development // John Wiley and Sons, Hardcover, 2006: p. 476.
13. Nilsson J, Ståhl S, Lundeberg J, Uhlén M, Nygren PA. Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins. // Protein Expr Purif. 1997 Oct;11(1):1-16
14. Rang H. P., Drug discovery and development: technology in transition, // Churchill Livingstone / Elsevier 2006: 346 p.
15. Singh P.K., Chan P.F., Hibbs M.J., Vazquez M.J., Segura D.C., Thomas D.A., Theobald A.J., Gallagher K.T., Hassan N.J. High-yield production and characterization of biologically active GST-tagged human topoisomerase II α protein in insect cells for the development of a high-throughput assay // Protein Expr Purif. 2011 Apr;76(2):165-72.
16. Takahashi, T.T., Austin, R.J. and Roberts, R.W. mRNA display: ligand discovery, interaction analysis and beyond // Trends Biochem Sci 2003, 28, 159-165.
17. Trayer I P., Olsen K. W. Affinity-chromatography studies on the A protein of lactose synthetase // Biochem. J. (1972), 127 (9–0).
18. Turner J. R. New drug development: design, methodology, and analysis // Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience. xxi, 2007: 270 p..
19. Zhu H, Klemic JF, Chang S, Bertone P, Casamayor A, Klemic KG, Smith D, Gerstein M, Reed MA, Snyder M. Analysis of yeast protein kinases using protein chips. // Nat Genet. 2000/ Nov;26(3):283-9.

Поступила в редакцию 11 мая 2011 г.

TARGETED SEARCH FOR NEW DRUGS AND ANALYSIS OF POSSIBLE MECHANISMS OF ACTION

Ivanenkov Y.A.

Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Science,
Russia, Moscow Region, Chernogolovka, smart_people@inbox.ru

The understanding of therapeutic mechanism of the targeted drug action is one of the biggest problems in modern drug design & development. To the current date, a range of advanced technologies has been discovered and effectively applied to reveal the specific mechanism of drug action as well as possible side-effects and toxicity. Among them, affinity chromatography, protein microchips, phage-based monitoring and Y3H-technology are the most effective methods. A huge amount of research within the title field is carried out using these technologies. This review is specifically focused on the listed approaches and their use in biochemistry and medicinal chemistry.

Keywords: biological screening, combinatorial synthesis, biological targets, receptors, therapeutic agents, affinity, small molecule ligands, protein microchips, phage monitoring, Y3H-systems