

На правах рукописи

КОБОРОВА Ольга Николаевна

**ПОИСК ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ  
ДЛЯ ТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ  
НА ОСНОВЕ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ  
РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА**

03.01.09 - математическая биология, биоинформатика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича» Российской академии медицинских наук (ФГБУ «ИБМХ» РАМН)

**Научные руководители:** доктор биологических наук, профессор,  
**Поройков Владимир Васильевич**

кандидат физико-математических наук,  
**Филимонов Дмитрий Алексеевич**

**Официальные оппоненты:** **Веселовский Александр Владимирович,**  
доктор биологических наук,  
ФГБУ «ИБМХ» РАМН, зав. лаб.

**Алексеевский Андрей Владимирович,**  
кандидат физико-математических наук,  
НИИ Физико-химической биологии им.  
А. Н. Белозерского МГУ им. М. В.  
Ломоносова, зав. лаб.

**Ведущее учреждение:** Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт молекулярной  
биологии имени В. А. Энгельгардта  
Российской академии наук

Защита состоится «7» июня 2012 г. в 12:30 часов на заседании диссертационного совета Д 001.010.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича» Российской академии медицинских наук по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ИБМХ» РАМН.

Автореферат разослан «\_\_\_» мая 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат химических наук



Е. А. Карпова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Поиск фармакологических мишеней для терапии социально значимых заболеваний человека представляет одну из наиболее важных задач современной биоинформатики. Рак молочной железы (РМЖ) у женщин, по данным Американского онкологического общества за 2011 год, находится на втором месте по количеству летальных исходов среди различных видов опухолей, и поиск новых фармакологических мишеней для терапии РМЖ более чем актуален. Экспериментальные методы исследования различных клеточных фенотипов, в том числе и опухолевых, в масштабах целого генома быстро совершенствуются, что позволяет более глубоко изучать механизмы опухолевых процессов на молекулярном и клеточном уровнях. Системный подход повышает эффективность при отборе перспективных мишеней лекарств и уменьшает как риски для пациентов, так и финансовые издержки фармацевтических компаний в процессе разработки препаратов (Chua и Roth, 2011).

Регуляция клеточного цикла включает в себя важнейшие процессы, имеющие решающее значение для выживания клетки, в том числе выявление и репарацию генетических повреждений, а также предотвращение бесконтрольного клеточного деления. Нарушения этих процессов составляют основу патогенеза опухолевого роста. Регуляцию клеточных процессов часто рассматривают как сеть, которая отражает теоретическую абстракцию биохимических реакций и межмолекулярных взаимодействий в клетке. Несмотря на большое количество разрабатываемых методов анализа и моделирования поведения регуляторных сетей, основной проблемой оказывается невозможность оценки влияния всей совокупности положительных и отрицательных обратных связей, что ограничивает существующие методы в поиске новых фармакологических мишеней. Эти предпосылки легли в основу разработки метода поиска фармакологических мишеней для терапии РМЖ на основе компьютерного моделирования регуляции клеточного цикла.

**Цель работы:** разработать компьютерный метод выявления молекулярных мишеней для лекарственной терапии злокачественных новообразований и апробировать его на примере рака молочной железы.

**Задачи исследования:**

1. Собрать и проанализировать информацию о регуляции клеточного цикла, экспрессии белков в нормальных и опухолевых клетках.

2. Разработать и реализовать в виде компьютерной программы метод выявления и оценки противоопухолевых мишеней.
3. Провести валидацию предложенного метода идентификации перспективных противоопухолевых мишеней на основе доступных экспериментальных данных.
4. Применить разработанный метод к идентификации перспективных противоопухолевых мишеней для терапии опухолевых заболеваний.

**Научная новизна.** Впервые предложен и реализован в виде компьютерной программы NetFlowEx метод дихотомического моделирования регуляции клеточного цикла в норме и при патологиях с целью выявления перспективных фармакологических мишеней. Впервые проведено моделирование поведения регуляторной сети, состоящей из 1405 вершин и 2336 взаимодействий с использованием данных об экспрессии в норме и для четырех групп РМЖ: генерализованного рака молочной железы, HER2/neu-положительной карциномы молочной железы, карциномы протоков, инвазивной карциномы протоков и/или узловых метастазов. Для терапии РМЖ выявлены значимые мишени, ингибиторы к которым проявили противоопухолевую активность на трех опухолевых клеточных линиях карциномы молочной железы (MCF7, SkBr и MDA-MB231). Получено свидетельство №2011617330 от 21.09.2011 г. на регистрацию программы для ЭВМ NetFlowEx, выданное Федеральной службой по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам.

**Личный вклад автора.** Представленные в диссертационной работе результаты получены лично соискателем, а также совместно с коллегами: А. А. Лагунин и А. В. Захаров – поиск лигандов к выявленным мишеням; Ю. В. Кондрахин и Р. Шарипов – статистическая обработка данных об экспрессии генов; Г. Селиванова с сотр. – экспериментальная валидация полученных лигандов для выявленных мишеней. В опубликованных работах [2-4] соискателю принадлежат разработка, реализация в виде компьютерной программы и применение разработанного метода для поиска перспективных противоопухолевых мишеней РМЖ.

**Практическая значимость.** Разработанный и реализованный в программе NetFlowEx метод использован для выявления перспективных фармакологических мишеней в рамках Европейского проекта "Net2Drug — From gene regulatory networks to drug prediction". Метод может быть применен для анализа и моделирования регуляторных сетей, а также для поиска

перспективных молекулярных мишеней при некоторых формах онкопатологии. Метод может быть использован в научно-исследовательских и медицинских учреждениях, работающих в областях системной биологии, молекулярной биологии и генетики, генной инженерии и др., а также применен в поиске и разработке новых лекарственных препаратов, использован в учебном процессе высших учебных заведений соответствующего профиля.

Работа выполнена при поддержке грантов Европейской Комиссии № 037590 (FP6-2005-LIFESCIHEALTH-7) и Госконтракта № 07.514.11.4118.

**Апробация работы.** Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: “Московская конференция по вычислительной молекулярной биологии” – МССМВ-2009 и МССМВ-2011, Россия, Москва, 2009; “XVI и XV Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»”, Россия, Москва, в 2009 и 2010; “Международный симпозиум по вычислительным методам в токсикологии и фармакологии объединяющих интернет ресурсов” – СМТPI-2007 (Россия, Москва) и СМТPI-2009 (Турция, Стамбул); “Шестая международная конференция по биоинформатике регуляции и структуры генома” – BGRS-2008, Новосибирск, 2008; “Четвертая международная конференция «Геномика, протеомика, биоинформатика и нанобиотехнологии для медицины» ” – GPBVM-2008, Россия, Москва – Нижний Новгород – Москва, 2008; “Симпозиум по системной биологии Гемгольц-Россия-Германия”, Россия, Москва, 2008; “Четвертая международная конференция «Постгеномные технологии разработки противоопухолевых агентов с новыми механизмами действия»”, Россия, Москва, 2007; “Четвертый московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития»”, Россия, Москва, 2007; “Четвертый евразийский съезд по гетероциклической химии” – EAMNS-2006, Салоники, Греция, 2006.

**Публикации.** Материалы диссертационной работы отражены в 18 публикациях, из них 3 статьи в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК, 15 публикаций в трудах конференций. Получено 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа изложена на 156 страницах машинописного текста, содержит 20 рисунков и 7 таблиц, состоит из введения, трех глав, заключения, списка литературы, содержащего 155 ссылок, и приложения.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Обзор литературы

Рассмотрены понятия регуляторных сетей, фармакологических мишеней и пр. Представлена информация об особенностях регуляции клеточного цикла и апоптоза, в частности, о ключевых белках, активация и/или блокада которых отражает переход между фазами цикла и необратимый запуск апоптоза. Также проанализированы существующие подходы к формальному описанию и представлению взаимодействий между белками и/или генами. Детально рассматриваются методы моделирования регуляторных сетей: непрерывные (моделирование с использованием дифференциальных уравнений, непрерывные линейные модели, анализ баланса потоков) и дискретные (логические сети, сети Петри, и их разновидности). Представлены примеры применения вышеперечисленных методов для поиска перспективных фармакологических мишеней, проанализированы их преимущества и ограничения, а также приведено обоснование для разработки дихотомической модели регуляции клеточного цикла для выявления перспективных противоопухолевых мишеней лекарств.

### Глава 2. Материалы и методы

Информация об участках регуляторных сетей была экстрагирована нами из базы данных (БД) TRANSPATH<sup>®</sup> (<http://www.biobase-international.com>), содержащей информацию о белках, генах и их взаимодействиях (Krull *et al.*, 2006).

Информация о генах "домашнего хозяйства"<sup>1</sup> (ГДХ) человека была получена с использованием биоинформатического ресурса ExPlain<sup>®</sup> (<http://www.genexplain.com/>) (A. Kel *et al.*, 2008).

Списки генов с измененной экспрессией для РМЖ были взяты из БД Cyclonet (<http://cyclonet.biouml.org>) (Kolpakov *et al.*, 2007).

Дихотомическое моделирование и выявление перспективных фармакологических мишеней было проведено с помощью разработанной нами компьютерной программы NetFlowEx, написанной на языке Java 2.0 в среде разработки Eclipse ([www.eclipse.org](http://www.eclipse.org)).

---

<sup>1</sup> Гены "домашнего хозяйства" – гены, необходимые для поддержания важнейших жизненных функций организма, которые экспрессируются практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне. Гены домашнего хозяйства функционируют повсеместно, на всех стадиях жизненного цикла организма.

Для более подробного анализа выявленных мишеней нами была проанализирована БД Integrity<sup>®</sup> (<http://www.prous.com/integrity/>), содержащая наиболее полную информацию по разрабатываемым лекарственным препаратам.

### **Глава 3. Результаты и обсуждение**

#### **3.1. Анализ информации о регуляции клеточного цикла, экспрессии белков в норме и при раке молочной железы**

В результате анализа литературы и БД TRANSPATH<sup>®</sup> была составлена регуляторная сеть, состоящая из 1405 вершин (генов и белков) и 2336 взаимодействий, и содержащая различные регуляторные пути, вовлеченные в развитие и прогрессию РМЖ. Для вершин, отражающих белки, были отобраны только реакции, которые подтверждены экспериментально; также были включены связи между генами и белками (транспрессия, трансактивация, экспрессия). Среднее число взаимодействий для вершин в полученной сети составляет 1,66.

Количество отобранных для моделирования генов с измененной экспрессией для РМЖ и ГДХ, использованных для моделирования, представлены в Таблице 3.1 диссертационной работы.

#### **3.2. Метод дихотомического моделирования регуляторных сетей**

Одним из фундаментальных принципов работы биологических систем является принцип усиления и ограничения сигнала для поддержания устойчивости и/или для перехода между состояниями системы при воздействии внутренних и/или внешних факторов (Kitano, 2007). В рамках дихотомической модели каждый ген и каждый белок представлены в виде вершины направленного графа, в котором ребра проводятся между вершинами тогда и только тогда, когда между ними имеется взаимодействие. Отдельные вершины сети (белки и/или гены) могут быть в одном из двух состояний: активном и неактивном. Активное состояние гена соответствует экспрессии соответствующего белка, активное состояние белка – его способности связывать свои субстраты. Состояния изменяются в дискретные моменты времени. Последовательность состояний сети  $S(0)$ ,  $S(1)$ ,  $S(2)$ , ... ,  $S(k)$  называется *траекторией*. В каждый момент времени (шаг траектории) состояния вершин зависят от состояний вершин на предыдущем шаге моделирования. Подмножества состояний  $\{S\} \in 2^N$  сети из  $N$  узлов называются *событиями*. Вычисление траектории прекращается после наступления некоторого события, интересующего исследователя, например,

апоптоза, когда запускается каскад каспаз и процесс становится необратимым, или остановки клеточного цикла на одной из его фаз.

Входными данными модели являются состояния вершин в начальный момент времени. Состояние узла обозначено  $S_i$  – для активного узла  $S_i = 1$ , а для неактивного  $S_i = 0$ . Функции перехода в нашей дихотомической модели сети регуляции клеточного цикла представлены в виде:

$$S_i(n + 1) = \theta(a_i + \sum_k b_{ik} S_k(n)) \quad (1)$$

где пороговая функция  $\theta(x) = 0$  при  $x \leq 0$  и  $\theta(x) = 1$  при  $x > 0$ ;  $b_{ik} = 1$ , если ребро выходит из узла  $k$  и активизирует узел  $i$ ;  $b_{ik} = -1$ , если ребро выходит из узла  $k$  и инактивирует узел  $i$ ;  $b_{ik} = 0$  во всех остальных случаях, а  $b_{kk} \equiv 0$  означает, что узел не активизирует сам себя; только одно из двух чисел  $b_{ik}$  или  $b_{ki}$  может быть отличным от нуля. В простейшем случае  $a_i \equiv 0$ ,  $b_{ik} = \pm 1$ , однако, эти параметры можно использовать для более тонкой настройки модели по известным данным о процессах регуляции.

Для достижения целей работы необходимо вычисление не одной, а целого пучка траекторий, что позволит верифицировать построенную модель по имеющимся литературным данным об особенностях функционирования сетей регуляции клеточного цикла.

Для выявления молекул-мишеней, соответствующих определенным белкам/генам, состояние узлов сети фиксируется согласно виду предполагаемого воздействия, например,  $S_i(0) = S_i(1) = S_i(2) = \dots = S_i(n) = 0$  при ингибировании соответствующего  $i$ -ого белка/гена. Если при ингибировании или активировании белка/гена и/или комбинации белков/генов, поведение сети меняется желаемым образом, например, происходит переход клетки в апоптоз или остановка клеточного цикла – такой белок и/или комбинация белков рассматривается как перспективная фармакологическая мишень/мишени.

Метод дихотомического моделирования регуляции клеточного цикла реализован нами в компьютерной программе NetFlowEx (Net Flow Explorer) на языке Java 2.0 (см. раздел 2.3 диссертационной работы). Программа зарегистрирована в Федеральной службе по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам [1].

### 3.3. Моделирование клеточных процессов в норме

Для моделирования клеточных процессов в норме в качестве входных данных нами были использованы ГДХ, начальные состояния которых в дихотомической модели рассматривались как активные. Для некоторых ГДХ отсутствовала информация об их регуляции другими генами или белками,

поэтому, для этих генов значения параметра  $\alpha_i$  (уравнение 1) были взяты таким образом, чтобы обеспечивалась постоянная активность данных генов.

Для того, чтобы убедиться, что все взаимодействия между вершинами могут быть задействованы при моделировании, максимальное число шагов траектории было выбрано бóльшим, чем количество вершин в исследуемой сети (2500 шагов).

В результате моделирования при активных начальных состояниях ГДХ с 14 по 19 шаг и с 15 по 20 шаг траектории белок CDK1 и комплекс Cyclin A:CDK1 активны, соответственно (Рис.1). Однако, после 20-го шага участники клеточного цикла остаются неактивными, клетка не входит в М фазу клеточного цикла (комплекс Cyclin B:CDK1 неактивен).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
CYCLIN E	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CDK2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CYCLIN E:CDK2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HISTONE H1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CYCLIN A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CDK1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CYCLIN A:CDK2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CYCLIN A:CDK1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CYCLIN B1:CDK1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CYCLOSOME	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CYCLIN B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CYCLIN D1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CDK4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CDK6	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CYCLIN D:CDK4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CYCLIN D:CDK6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P19INK4D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P57KIP2	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AKT	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BAX	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DAXX	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CASPASE-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BID	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BAK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CYTOCHROME C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CASPASE-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CASPASE-9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CASPASE-7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CASPASE-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CASPASE-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Рисунок 1.** Результат моделирования нормальных клеточных процессов при активных начальных состояниях ГДХ. Представлены состояния белков клеточного цикла и их комплексов, отвечающих за переход по фазам клеточного цикла, а также белки апоптоза, активация которых является индикатором необратимости данного процесса. Строки соответствуют белкам, колонки соответствуют шагам траектории; ячейка таблицы отражает активное (1) или неактивное (0) состояние белка на определенном шаге. Активные состояния выделены серым цветом.

Белок P57KIP2, который ингибирует различные комплексы CDK2, ответственные за вход и продвижение по S-фазе, становится активным с четвертого шага, что согласуется с известной информацией об участии P57KIP2 в процессах регуляции клеточного цикла (Borriello *et al.*, 2011). Как видно из рис. 1, каспазы (Caspase-2, -3, -6, -7, -9) и цитохром C, активация которых необратимо переводит клетку в апоптоз (Wyllie, 2010), неактивны. Таким образом, результаты моделирования не противоречат известным процессам в клетках в покое (Caruso *et al.*, 2003, Wyllie, 2010, Borriello *et al.*, 2011).

### 3.4. Моделирование патологических процессов

Моделирование патологических процессов было проведено для каждой из четырех групп данных для РМЖ: (1) HER2/neu положительной карциномы молочной железы, (2) карциномы протоков, (3) инвазивной карциномы протоков и/или узловых метастазов и (4) генерализированного РМЖ. Для моделирования было также выбрано 2500 шагов, чтобы все вершины при моделировании могли быть пройдены. Результат моделирования для генерализированного РМЖ представлен на рис. 2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
CYCLIN E	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
CDK2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
CYCLIN E:CDK2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
HISTONE H1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
CDK1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0
CYCLIN A:CDK1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	
CYCLIN B1:CDK1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
CYCLOSOME	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0
CYCLIN B1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1
P107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P19INK4D	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P57KIP2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AKT	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BAX	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DAXX	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CASPASE-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BID	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BAK	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CYTOCHROME C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CASPASE-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CASPASE-9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CASPASE-7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CASPASE-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CASPASE-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Рисунок 2.** Результат моделирования патологических процессов при генерализированном РМЖ. Представлены состояния наиболее важных для клеточного цикла и апоптоза белков. Строки соответствуют белкам, колонки соответствуют шагам траектории; ячейка таблицы отражает активное (1) или неактивное (0) состояние белка на определенном шаге. Активные состояния выделены серым цветом.

Входные данные для начальных состояний моделирования содержат пять гиперэкспрессированных ГДХ: EZRIN, NDKA, PIN1, PRDX1 и RHOGDI-1. Состояния двадцати четырех генов были определены как постоянно гиперэкспрессированные (значения параметра  $a_i$  обеспечивали постоянную активность данных генов), поскольку они не могут продуцировать самих себя в модели в связи с недостатком информации об их регуляции. Несмотря на то, что один из ингибиторов клеточного цикла p19INK4D постоянно активен - комплексы клеточного цикла в модели периодически активируются. Cyclin E:CDK2 активен с 9 по 14 шаг, а с 21 шага и далее активен на каждом пятом шаге. Cyclin A:CDK1 и Cyclin B1:CDK1 активны с 7 по 10 шаг и с 9 по 16 шаг, соответственно. Комплекс Cyclin A:CDK1 и комплекс Cyclin B1:CDK1 периодически активизируются не более чем через каждые два шага, начиная с 20-ого шага и с 21-ого шага, соответственно. Белок АКТ, способствующий выживаемости клеток с помощью негативной регуляции апоптотического белка p53 (Hers I. *et al.*, 2011), остается активным с третьего шага траектории.

Результаты моделирования для всех рассмотренных типов РМЖ показали, что участвующие в апоптозе белки являются неактивными, комплексы Cyclin/CDK и основные факторы роста, принадлежащие к белковым семействам ERBB, EGFR и VEGFR, наоборот, находятся в активном состоянии. Поведение Cyclin/CDK для рассматриваемых типов РМЖ в модели отличается периодичностью активации: чем более инвазивен вид опухоли, тем чаще происходит повторение фаз клеточного цикла, что согласуется с известными данными о метастазировании опухолей (Hanahan и Weinberg, 2011).

### **3.5. Идентификация фармакологических мишеней**

Идентификация фармакологических мишеней для терапии РМЖ в рамках развитого нами дихотомического подхода происходит следующим образом: используя регуляторную сеть и данные об экспрессии генов при РМЖ в качестве входных данных, происходит расчет траектории, и выполняется проверка наступления определенного события. Если в процессе моделирования, при инактивации какой-либо вершины или комбинации вершин, наступает выбранное исследователем желаемое событие – в данном случае были выбраны: (1) остановка клеточного цикла и (2) стимуляция апоптоза, – то такая вершина или комбинации вершин могут рассматриваться как перспективные фармакологические мишени, воздействие на которые может быть использовано для терапии данного вида опухоли. Этот процесс поиска происходит до тех пор, пока не будет осуществлен перебор всех

комбинаций инактивируемых вершин. Ниже рассмотрены результаты выявления перспективных мишеней для терапии РМЖ для каждого из выбранных событий.

### **3.5.1. Остановка клеточного деления**

В качестве желаемого события нами было выбрано блокирование комплексов Cyclin/CDK, т.к. их ингибирование ведет к остановке клеточного цикла как *in vivo*, так и *in vitro* (Sharma *et al.*, 2008). Комплексы Cyclin/CDK могут быть блокированы напрямую или опосредованно через активацию или ингибирование других вершин, поэтому в качестве желаемых событий нами было выбрано блокирование Cyclin D1:CDK4 и Cyclin D1:CDK6 (G1 фаза); Cyclin E:CDK2 и Cyclin A:CDK2 (G1/S фаза, S фаза), Cyclin B:CDK1 (G2/M фаза). Для выявления мишеней, ингибирование которых приводит к инактивации комплексов Cyclin/CDK, была произведена инактивация вершин сети по одной поочередно, и было проверено, дает ли ингибирование той или иной вершины желаемое событие. Как видно из Таблицы 1, для блокирования комплексов Cyclin A:CDK2 и Cyclin E:CDK2, были найдены: CYCE, CYCLIN E, CDK2, PLK1 и АКТ-1.

Нами не было найдено мишеней, влияние на которые приводит к инактивации комплекса Cyclin B1:CDK1, за исключением киназы SYK. Недавно было показано (Singh *et al.*, 2009), что мутации, активирующие K-Ras, часто присутствуют в опухолях и увеличивают экспрессию SYK киназы в некоторых клеточных линиях рака легких и поджелудочной железы. Также показано, что ингибиторы SYK влияют на супрессию опухолевого роста В-клеток (Ruzza *et al.*, 2009).

Нами не было найдено нетривиальных комбинаций мишеней, блокада которых ведет к одновременному ингибированию всех комплексов циклин-зависимых киназ. Однако PLK1 и АКТ-1 могут быть интересными мишенями в связи с тем, что их комбинация с циклинами и циклин-зависимыми киназами не столь очевидна, и их функционирование оказывает влияние на переход между фазами клеточного цикла в норме и при патологиях (Lindqvist *et al.*, 2009).

**Таблица 1.** Результаты идентификации перспективных мишеней для терапии РМЖ.

Событие	Механизм	HER2/neu положительная карцинома молочной железы	Карцинома протоков молочной железы	Инвазивная карцинома протоков молочной железы и/или узловые метастазы	Генерализованный РМЖ
<b>Ингибирование клеточного цикла</b>	Инактивация Cyclin D1:CDK4, Cyclin D1:CDK6 (G1 фаза)	СУСD1, СУСЛN D1			
		СУСЕ, СУСЛN E, СДК2, РЛК1, АКТ-1			
	Инактивация Cyclin E:CDK2 (G1/S фаза), Cyclin A:CDK2 (S фаза)	SYK	-	SRC	-
	Инактивация Cyclin B:CDK1 (G2/M фаза)	SYK	-	-	-
<b>Активация апоптоза</b>	Высвобождение цитохрома C	BCL-2			
	Активация каспазы-3	МКК4, РЛК, МКК6, P38ALPHA, SRC1, NPK1			
				VEGF-A, VEGFR-2, HIF-1ALPHA, VEGF	
					интегрин $\alpha_5\beta_1$ , фибронектин

### **3.5.2. Стимуляция апоптоза**

В качестве желаемых событий были выбраны (1) высвобождение цитохрома С; (2) активация каспазы-3, так как данные события приводят к апоптозу – запрограммированной гибели клеток (Sykes *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2009).

3.5.2.1. *Высвобождение цитохрома С.* В результате моделирования для генерализированного РМЖ снижение уровня экспрессии фибронектина, либо инактивация интегрина  $\alpha_5\beta_1$  приводят к активации цитохрома С, а, следовательно, и к апоптозу, в то время как инактивация RAF-1, GRB-2, PKC или RACK1 приводит к апоптозу при инвазивной карциноме протоков молочной железы и/или узловых метастазов. Белок BCL-2 был выявлен в качестве потенциальной мишени для всех рассматриваемых видов опухолей молочной железы.

3.5.2.1. *Активация каспазы-3.* Инактивация белков, ответственных за рост кровеносных сосудов VEGF-A, VEGFR-2, HIF-1ALPHA и VEGF, приводит к активации каспазы-3 при инвазивной карциноме протоков молочной железы и/или узловых метастазов. В литературе показана эффективность ингибирования факторов роста кровеносных сосудов при инвазивных опухолевых процессах (Bischoff и Ignatov, 2010). В Таблице 2 приведены общие мишени, найденные для всех рассматриваемых видов опухолей: MKK4, PI3K, MKK6, P38ALPHA, CRKL и HPK1.

### **3.6. Верификация метода**

Валидация результатов моделирования и выявления перспективных фармакологических мишеней была осуществлена путем моделирования инактивации найденных мишеней в норме с использованием ГДХ. Ингибирование практически всех выявленных мишеней приводит к апоптозу только при наличии патологии, за исключением MKK4, MKK6 и BCL-2. Это может быть связано с неполнотой имеющихся данных о регуляции клеточного цикла. Ингибирование MKK4 и MKK6 может быть разрушительно для клетки, т.к. данные киназы являются важными проводниками клеточных сигналов при ее нормальном функционировании (Remy *et al.* 2010; Haesusgen *et al.*, 2011). Инактивация BCL-2 также ведет к инициации апоптоза через цитохром С по пути катепсина В. Однако, цитохром С становится неактивным с 20-го шага и остается неактивным по 2500 шаг.

Верификация алгоритма была осуществлена посредством использования случайно сгенерированных списков гипер- и гипохеэкспрессированных генов. При этом не было выявлено ни одной

мишени. Это позволяет предполагать, что разработанный нами алгоритм выявляет те мишени, которые действительно важны для регуляции и сигнализации клеточных процессов, и наши результаты не являются результатом случайного выбора.

Выявленные мишени были нами проанализированы с использованием БД Integrity<sup>®</sup> (<http://www.prous.com/integrity/>) по разрабатываемым лекарственным препаратам. Были найдены одиннадцать мишеней, для которых известны препараты, используемые в клинике. Препараты для двенадцати выявленных мишеней относят к группе для терапии РМЖ. Для четырех мишеней: Rack1, MKK6, CRKL, HPK1 информация о разрабатываемых лекарственных препаратах и соответствующих терапевтических группах не обнаружена.

### **3.7. Поиск и экспериментальная валидация перспективных фармакологических мишеней для клеточной линии MCF-7 РМЖ**

#### **3.7.1. Поиск перспективных фармакологических мишеней для достижения синергетического эффекта с противоопухолевым веществом Rita**

Селивановой Г. с сотр. из Каролинского института (Швеция) экспериментально показано, что в клеточных линиях MCF-7 после инкубирования с низкомолекулярным соединением Rita 0,1 мкмоль/л происходит остановка клеточного деления, а при 1 мкмоль/л Rita инициируется апоптоз. Апоптоз также возникает в клеточной линии MCF10A, которая является экспериментальной моделью нормальных клеток молочной железы. В связи с этим, необходимо найти дополнительную мишень и соответствующий лиганд, который проявит синергичный эффект с Rita, что приведет к апоптозу опухолевых клеток, не оказывая существенного влияния на нормальные. Для этого при дихотомическом моделировании были использованы списки гипер- и гипозэкспрессированных генов клеточной линии MCF-7 после инкубирования с Rita 0,1 мкмоль/л. В результате комплексы Cyclin/Cdk были неактивны, что согласуется с информацией о действии Rita 0,1 мкмоль/л на клеточные линии MCF-7. Для идентификации перспективных мишеней, нами были выбраны события: активация каспазы 3, 7 или 6, а также высвобождение цитохрома C (Таблица 2). Были выявлены мишени как для клеточной линии MCF-7, так и для четырех типов РМЖ: P38ALPHA, BCL-2, PI3K, MKK4, CRKL, HPK1.

**Таблица 2.** Результаты идентификации перспективных мишеней для клеточной линии РМЖ МСF-7, инкубированной с Rita 0,1 мкмоль/л.

Событие	Механизм	Мишени для клеточной линии МСF-7 с Rita 0,1 мкмоль/л
Инициация апоптоза	Активация каспазы-3	P38ALPHA, CIAP-2
	Высвобождение цитохрома С	BCL-2, P38ALPHA
	Активация каспазы-7	P21CIP1, PI3K, RAF-1, PAK1, JAK2, MEK1, MEK2, MKK3, INSR, ERK2, P21WAF1, CIAP-2
	Активация каспазы-6	MKK4, PI3K, RAF-1, PAK1, TAK1, JAK2, MEK1, MEK2, MKK6, P38ALPHA, INSR, CRKL, ERK2, CIAP-2, HPK1

### 3.7.2. Валидация найденных мишеней в эксперименте

Отобранные коллегами (Д. А. Филимонов, А. А. Лагунин, А. В. Захаров и Г. Селиванова) на основе предсказаний PASS (Filimonov и Poroikov, 2008), одиннадцать химических структур были протестированы на трех опухолевых клеточных линиях РМЖ (МСF7, SkBr и MDA-MB231) и на МСF10А (норма) Г. Селивановой с сотр. в Каролинском институте (Швеция). Молекулы СРІ и СРІІ ингибировали рост опухолевых клеток, но не воздействовали на нормальные клетки. Молекула СРІІ показала свой ингибирующий рост эффект на клеточных линиях меланомы, в то время как молекула СРІ оказывала влияние на все три клеточные линии РМЖ. Было показано наличие синергетического действия молекулы СРІ в комбинации с Rita на ингибирование опухолевых клеток без влияния на рост клеточной линии МСF10А (норма). Эти данные позволяют предполагать, что СРІ может рассматриваться как потенциальное соединение для разработки нового противоопухолевого препарата. Г. Селивановой с сотрудниками был проведен анализ экспрессии генов при инкубировании клеточной линии МСF-7 с СРІ, с СРІ+Rita и отдельно с Rita с использованием технологии микрочипов. Была выявлена пониженная экспрессия ряда генов, в том числе p38alpha, HIF-1alpha, MKK4, которые были выявлены нашим методом в качестве перспективных противоопухолевых мишеней.

В рамках проекта Net2Drug с помощью программы GeneXplain (Kel *et al.*, 2011) А. Келем с сотр. при инкубировании клеточной линии МСF-7 с Rita+СРІ были найдены промотеры гипозэкспрессированных генов, отвечающих за выживание клетки и идентифицированы транскрипционные

факторы, участвующие в их регуляции. Среди них оказались P13K и AKT, которые были найдены нашим методом (Таблицы 1 и 2). Таким образом, результаты нашего метода согласуются с результатами выявления ключевых мишеней с помощью GeneXplain, и не противоречат экспериментальным данным при инкубировании клеточной линии MCF-7 с Rita+CPI.

### **3.7.3. Моделирование блокады и активации комбинации противоопухолевых мишеней, предсказанных PASS**

Нами было проведено моделирование и анализ комбинаций мишеней, лиганды к которым являются аналогами Rita, CPI и CPII. Комбинации мишеней для каждого лиганда были отобраны по их наличию в регуляторной сети. Всего для дихотомического моделирования было отобрано 37 тройных комбинаций, где 13 комбинаций приводили к апоптозу во всех четырех типах РМЖ. Данные комбинации содержат белок BCL-2, предсказанный нашим методом в качестве перспективной мишени (см. раздел 3.5.2). Блокада ряда комбинаций приводила к остановке клеточного цикла в некоторых типах РМЖ. Активация комбинации цитокинов, отвечающих за межклеточные взаимодействия {IFN $\alpha$ , M-CSF, TNF} приводила к блокированию клеточного деления только в генерализированном РМЖ. Эта комбинация является нетривиальной, т.к. влияние на эти белки в комбинации не было нами найдено в литературе. Активация или блокада других комбинаций белков не приводила ни к блокированию клеточного деления, ни к инициации апоптоза, при этом моделирование показывало последовательную активацию комплексов Cyclin/CDK.

Результаты показали, что наш метод применим для предсказания возможного механизма совместного действия аналогов Rita и CPI.

## ВЫВОДЫ

1. В результате сбора и анализа информации о регуляции клеточного цикла, экспрессии белков в нормальных и опухолевых клетках, была составлена сеть, состоящая из 1405 вершин (генов и белков) и 2336 взаимодействий, ответственных за регуляцию клеточного цикла в норме и при раке молочной железы. Полученная сеть и списки гипер- и гипоэкспрессированных генов были использованы в качестве входных данных для дихотомической модели.
2. Разработан и реализован в виде компьютерной программы NetFlowEx метод выявления перспективных противоопухолевых мишеней базирующийся на дихотомическом моделировании регуляторных сетей с использованием данных об экспрессии генов.
3. Разработанный метод был провалидирован с использованием доступных данных об экспрессии генов в норме и при раке молочной железы. Результаты моделирования согласуются с известными процессами регуляции клеточного цикла в норме и при онкопатологии.
4. Применение метода идентификации фармакологических мишеней для четырех типов рака молочной железы выявило как общие, так и специфические для каждого типа значимые мишени. Низкомолекулярные соединения к выявленным мишеням проявили противоопухолевую активность на клеточных линиях карциномы молочной железы (MCF-7, SkBr и MDA-MB231), но не оказывали влияния на клеточную линию MCF10A (норма).

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Коборова О.Н., Поройков В.В., Филимонов Д.А., Кель А.Э. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ NetFlowEx №2011617330 от 21.09.2011 г., Москва, Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам.

### Статьи в рецензируемых журналах:

2. Koborova O.N., Filimonov D.A., Zakharov A.V., Lagunin A.A., Ivanov S.M., Kel A., Poroikov V.V. In silico method for identification of promising anticancer drug targets // SAR and QSAR Environ. Res. 2009. Vol. 20 (7-8). P. 755-766.
3. Коборова О.Н., Филимонов Д.А., Захаров А.В., Лагунин А.А., Кель А., Колпаков Ф., Кондрахин Ю.В., Шарипов Р., Поройков В.В. Моделирование регуляторных сетей для выявления противоопухолевых мишеней на примере рака молочной железы // Информационный вестник ВОГиС. 2009. Т.13 (1). С. 201-207.
4. Коборова О.Н., Филимонов Д.А., Захаров А.В., Лагунин А.А., Кель А., Колпаков Ф., Кондрахин Ю.В., Шарипов Р., Поройков В.В. Выявление противоопухолевых мишеней с использованием биоинформационных технологий // Рос. биотерапевт. журн. 2008. Т. 7(2). С. 54-56.

### Материалы трудов конференций:

5. Poroikov V.V., Lagunin A.A., Koborova O.N., Filz O.A., Filimonov D.A. In silico screening and rational design of multitargeted drugs // Abstr. 5-th Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB 11). Moscow, Russia, 2011. P. 290.
6. Поройков В.В., Коборова О.Н., Лагунин А.А., Филимонов Д.А. Компьютерные методы поиска препаратов для лечения заболеваний мультифакториальной природы // Мат. докл. Второй Всероссийской научно-практической конф. с межд. уч. «Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии». Курск, 2011. С. 342-344.
7. Коборова О.Н., Опарина Н.Ю., Филимонов Д.А., Лагунин А.А., Кель А., Поройков В.В. Поиск противоопухолевых мишеней на основе регуляции клеточного цикла // Мат. докл. XVI Рос. нац. конгресса «Человек и лекарство». Москва, 2010. С. 638.
8. Коборова О.Н., Филимонов Д.А., Захаров А.В., Лагунин А.А., Кондрахин Ю.В., Поройков В.В. Компьютерный поиск перспективных мишеней для терапии рака молочной железы // Мат. докл. XV Рос. нац. конгресса «Человек и лекарство». Москва, 2009. С. 534.

9. Koborova O.N., Filimonov D.A., Zakharov A.V., Lagunin A.A., Poroikov V.V. Finding of molecular targets and their ligands for breast cancer therapy // Abstr. 4-th Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB 09). M., 2009. P.172-173.
10. Koborova O.N., Filimonov D.A., Zakharov A.V., Ivanov S.M., Poroikov V.V., Kel A. In silico method for identification of promising anticancer targets // Abstr. Fifth International Symposium on Computational Methods in Toxicology and Pharmacology Integrating Internet Resources. Istanbul, Turkey, 2009. P.60.
11. Koborova O.N., Filimonov D.A., Zakharov A.V., Lagunin A.A., Kel A., Kolpakov F. Sharipov R., Kondrachin Y., Poroikov V.V. Modelling of regulatory networks to indentify promising drug targets for breast cancer therapy // Abstr. 6-th International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure. Novosibirsk, 2008. P. 118.
12. Koborova O.N., Filimonov D.A., Zakharov A.V., Lagunin A.A., Poroikov V.V. Method of perspective target analysis for breast cancer therapy // Abstr. 4-th International Conference “Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanobiotechnologies for Medicine”. Moscow-Nizhny Novgorod-Moscow, 2008. P. 37.
13. Koborova O.N. Computer – aided prediction of promising drug targets for breast cancer // Abstr. Helmholtz-Russian-German Workshop on Systems Biology. Moscow, 2008. P. 41.
14. Коборова О.Н., Филимонов Д.А., Захаров А.В., Лагунин А.А., Кель А., Колпаков Ф., Шарипов Р., Поройков В.В. Выявление противоопухолевых мишеней с использованием биоинформационных технологий // Мат. докл. Четвертой Междунар. конф. «Постгеномные технологии разработки противоопухолевых агентов с новыми механизмами действия». Москва, 2007. С. 15.
15. Поройков В.В, Лагунин А.А., Коборова О.Н., Захаров А.В., Филимонов Д.А. Компьютерный поиск противоопухолевых препаратов множественного действия: достижения и перспективы // Мат. докл. Четвертой Междунар. конф. «Постгеномные технологии разработки противоопухолевых агентов с новыми механизмами действия». Москва, 2007. С. 24.
16. Поройков В.В., Лагунин А.А., Коборова О.Н., Захаров А.В., Филимонов Д.А. Роль био- и хемоинформатики в создании лекарств, действующих на множественные мишени // Мат. докл. Четвертого Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, 2007. С. 396-397.

17. Коборова О.Н., Захаров А.В., Шарипов Р., Колпаков Ф.А., Кель А., Поройков В.В. Возможности предсказания перспективных фармакологических мишеней на примере регуляторного пути E2F/PRB для рака молочной железы // Мат. докл. Четвертого Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 2007. С. 405.
18. Koborova O.N., Zakharov A.V., Lagunin A.A., Filimonov D.A., Kel A., Kolpakov F., Sharipov R., Poroikov V.V. Computer-aided prediction of promising anti-tumor targets taking into account information about probable side effects // Abstracts of the Fourth International Symposium on Computational Methods in Toxicology and Pharmacology Integrating Internet Resources. Москва, 2007. P. 109.
19. Poroikov V.V., Koborova O.N., Zakharov A.V., Lagunin A.A., Filimonov D.A., Glorizova T.A., Sharipov R., Kolpakov F., Milanesi L., Kel A. Targeting cell cycle: old and new stories in anticancer therapy // Abstr. 4<sup>th</sup> Eurasian Meeting on Heterocyclic Chemistry. Thessaloniki, Greece, 2006. P.73-74.