

Лекция 6

***Высокопроизводительный скрининг
лекарственных препаратов и
малые модельные организмы***

План лекции

1. Фармацевтическая промышленность и разработка новых лекарственных средств.
2. Тенденции в сфере разработки лекарственных препаратов и скрининг на малых модельных организмах.
3. *Macrostomum lignano* - объект высокопроизводительного скрининга.

Фармацевтическая промышленность

Фармацевтическая промышленность - представляет собой отрасль по разработке, производству и продвижению на рынок лицензируемых лекарственных препаратов и медикаментов.



Липитор

Объем продаж за 2011 год:
2 млрд. \$

Топ - 5 крупнейших мировых фармацевтических компаний:

«Pfizer»

«sanofi-aventis»

«Novartis»

«Glaxo-Smith-Kline»

«Roche»

Процесс создания новых лекарственных средств



Первый этап направлен на **поиск перспективных соединений**, возможно, обладающих лечебным действием (срок не ограничен).

Второй этап — это **доклиническое изучение биологической активности** обозначенных к дальнейшему исследованию веществ (в среднем 4 года).

Третий этап - **клинические испытания** нового лекарственного вещества (в среднем 7 лет).

Процесс создания новых лекарственных средств

1. Определение мишени лекарственного препарата.



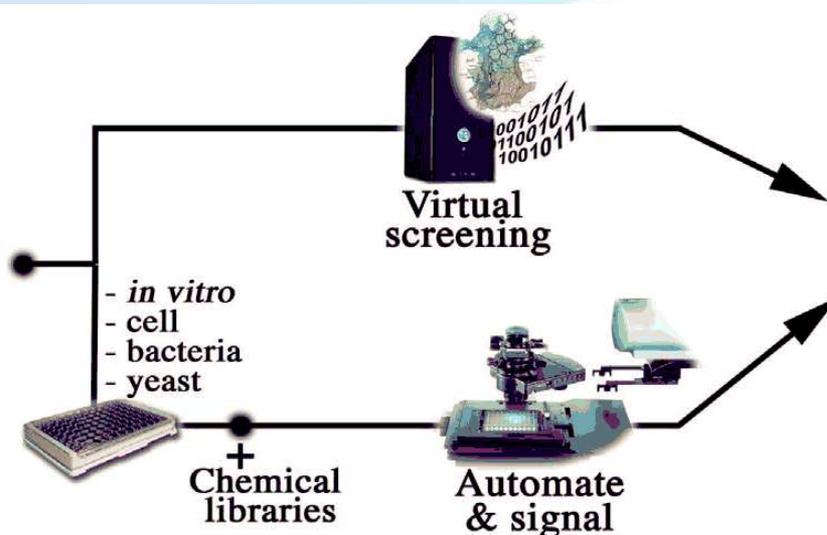
Процесс создания новых лекарственных средств

2. Выявление потенциально активных молекул (хитов)



Подходы для выявления хитов

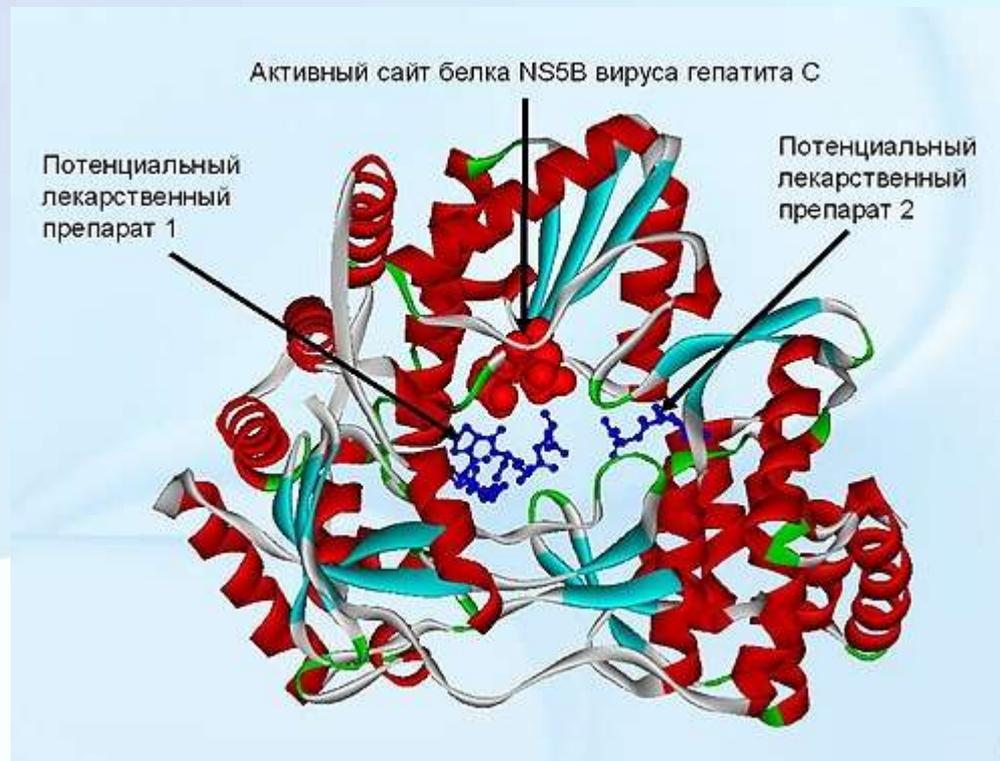
- **Высокопроизводительный скрининг** представляет собой поиск химических веществ (хитов) обладающих сродством или активностью по отношению к терапевтической мишени в огромной библиотеке химических соединений (из 50 тысяч-100 тысяч – 1 миллион).
- **Виртуальный скрининг**



Два основных подхода при выявлении потенциальных хитов

Виртуальный скрининг

Виртуальный скрининг - поиск потенциальных хитов с помощью суперкомпьютерных технологий и методов компьютерного молекулярного моделирования.



Результат виртуального скрининга потенциальных лекарственных молекул для лечения гепатита С

Процесс создания новых лекарственных средств

3. Оптимизация выявленных хитов



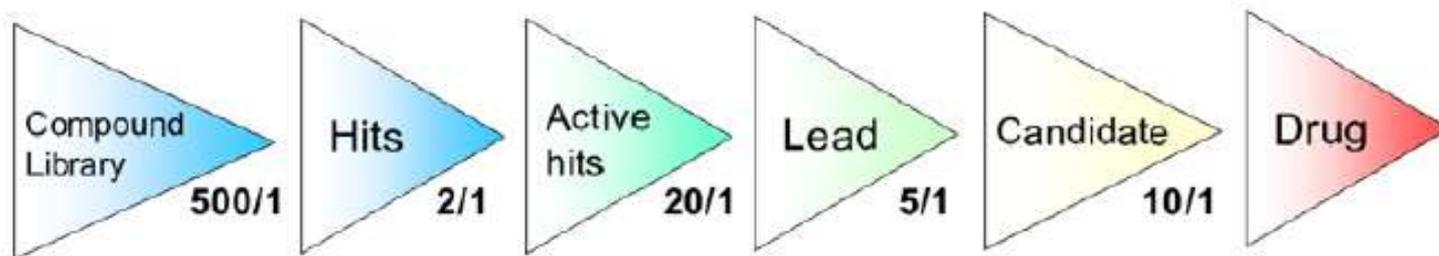
Процесс создания новых лекарственных средств

4. Доклинические исследования



Основные проблемы современной фармацевтической промышленности

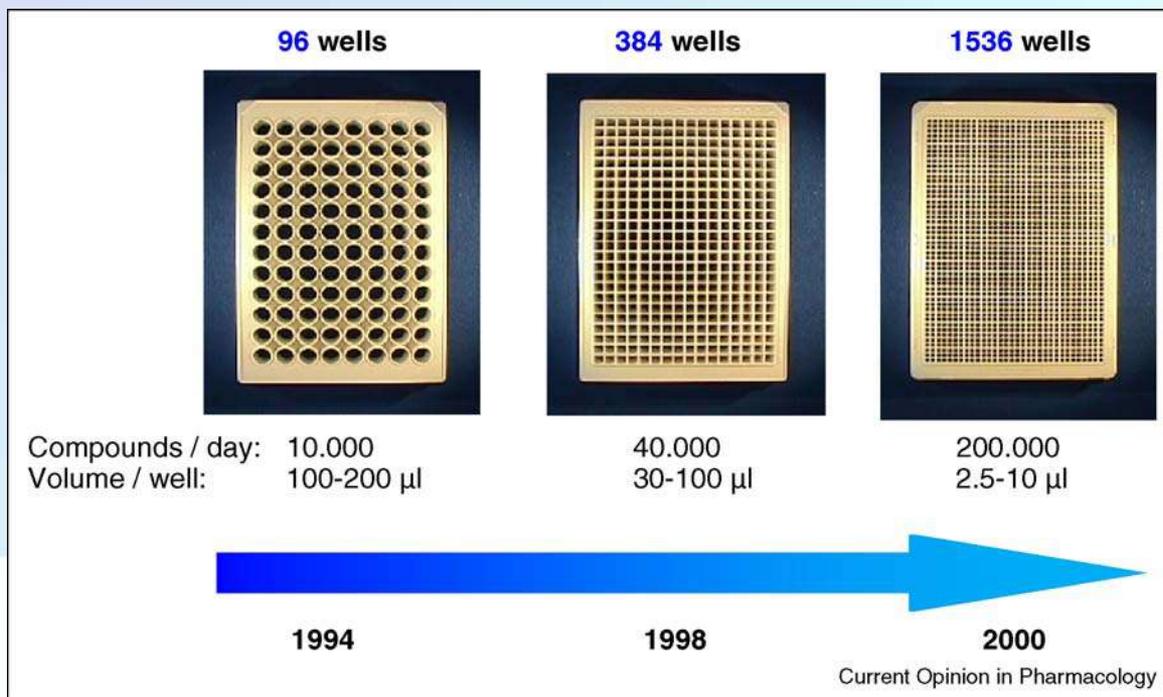
- Поиск подходящей фармацевтической мишени.
- Невозможность моделирования значительного количества заболеваний в системе *in vitro*.
- Большинство хитов обнаруженных на этапе традиционного скрининга не проходят доклинические исследования на мышах.



Выбраковывание потенциальных лекарственных веществ

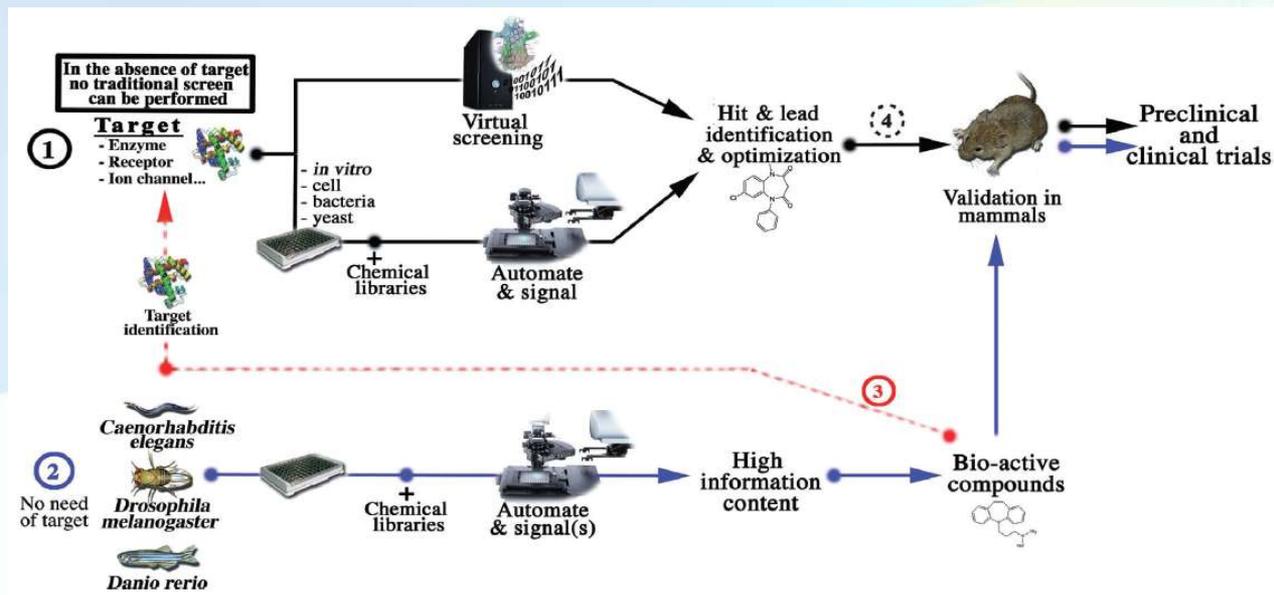
Тенденции развития процесса разработки лекарственных средств

1. Миниатюризация процесса выявления потенциально активных молекул (хитов).

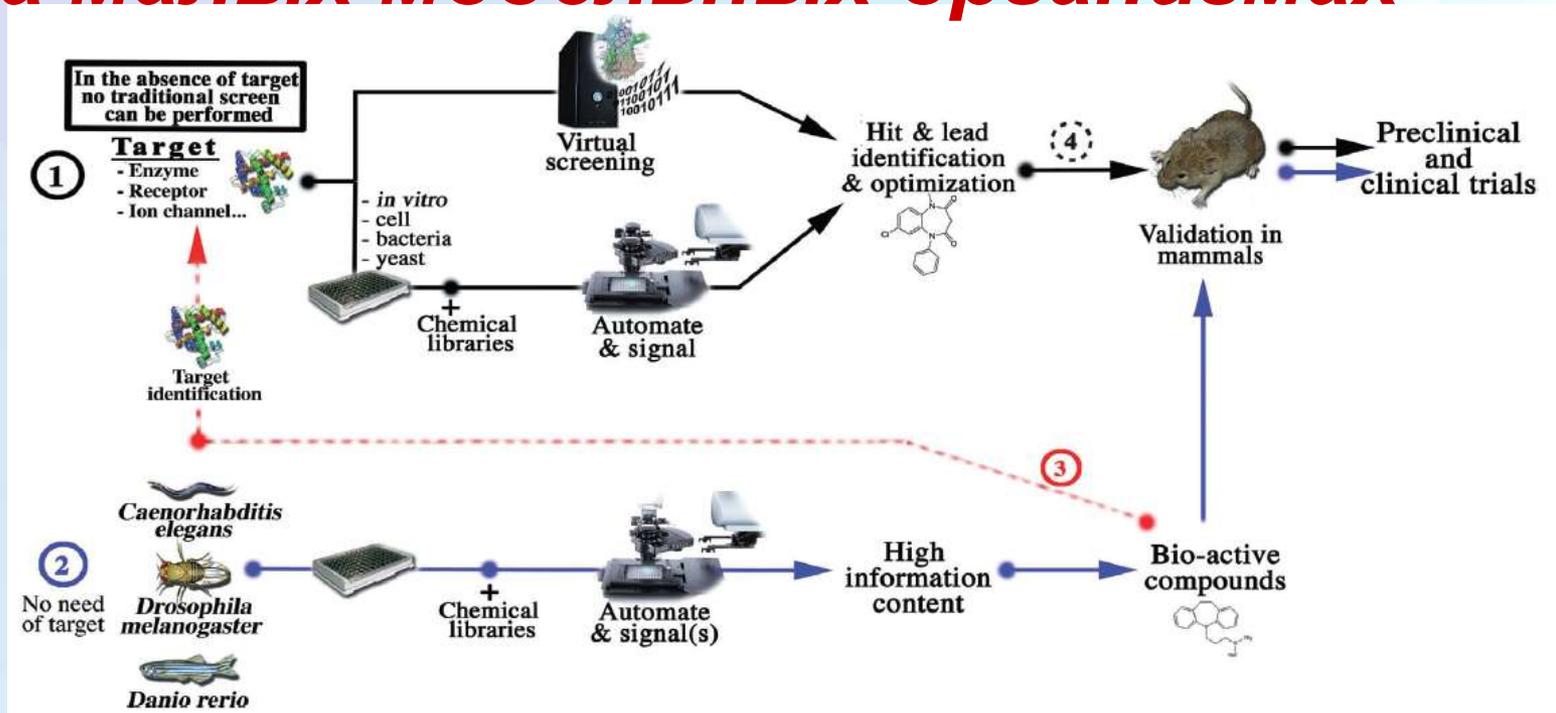


Тенденции развития процесса разработки лекарственных средств

2. Введение дополнительного этапа –скрининга лекарственных веществ на малых модельных организмах.



Высокопроизводительный скрининг на малых модельных организмах



Преимущества введения дополнительного этапа:

1. выявление новых активных соединений;
2. выявление дополнительных мишеней и / или молекулярных механизмов;
3. генерация дополнительной информации.

Caenorhabditis elegans в качестве модели для ВС



Основным недостатком *C.elegans* для моделирования является: Отсутствие соответствующих генов или органов.

NemaGENETAG
European Commission 6th Framework Programme STREP Consortium
Project summary

WormBase
WormBase Release WS138
Find: Anything, Any Gene, Author/Person, ...
gluocb
as XML Literature Search

Caenorhabditis elegans WWW Server
WormBase

Recent papers	Literature Search	Meetings
CGC	Labs	Researchers
Wormatlas	Announcements (Saturday, January 22, 2005)	Bionet.celegans
Software		Nematodes
The Genome	Movies	Protocols

Caenorhabditis elegans is a small (about 1 mm long) soil nematode found in temperate regions. In the 1960's [Sydney Brenner](#) began using it to study the genetics of development and neurobiology. Since then the community of *C. elegans* researchers has expanded to over a thousand. [The Riddle Lab](#) has written [an introduction to C. elegans for non-specialists](#). Biologists unfamiliar with *C. elegans* may find Mark Blaxter's [The Genetics of Caenorhabditis elegans, An Introduction](#) useful.

Users in Europe may find access to [the Greek mirror](#) of the *C. elegans* WWW Server more convenient.

December 24, 2004: WormBase features described in new publication
New features to WormBase are described in a new manuscript "WormBase: a comprehensive data resource for Caenorhabditis biology and genomics. Chen et al." appearing this month in the annual *Nucleic Acids Research Database issue*. Access to the full text is free.
December 24, 2004: New release of WormBase, WS136
WormBase has been updated to the WS136 release of the database. This is the final data release for 2004. This release includes a new Gene Class display. This display makes it easy to see, for example, all genes that fall into the ln class (as well as genes previously included in this class).
December 5, 2004: Initial batch of BCGSC GFP expression patterns available

Основные информационные ресурсы по *C.elegans*

Drosophila melanogaster в качестве модели для ВС



Основным недостатком *D. melanogaster* для моделирования является: крупный размер взрослой мухи и отсутствие возможности выращивания в жидкой среде.

Основные информационные ресурсы по *D. melanogaster*

Danio rerio в качестве модели для ВС



Основным недостатком *D. rerio* для моделирования является: крупный размер взрослого организма и ограниченное количество мутантных линий.

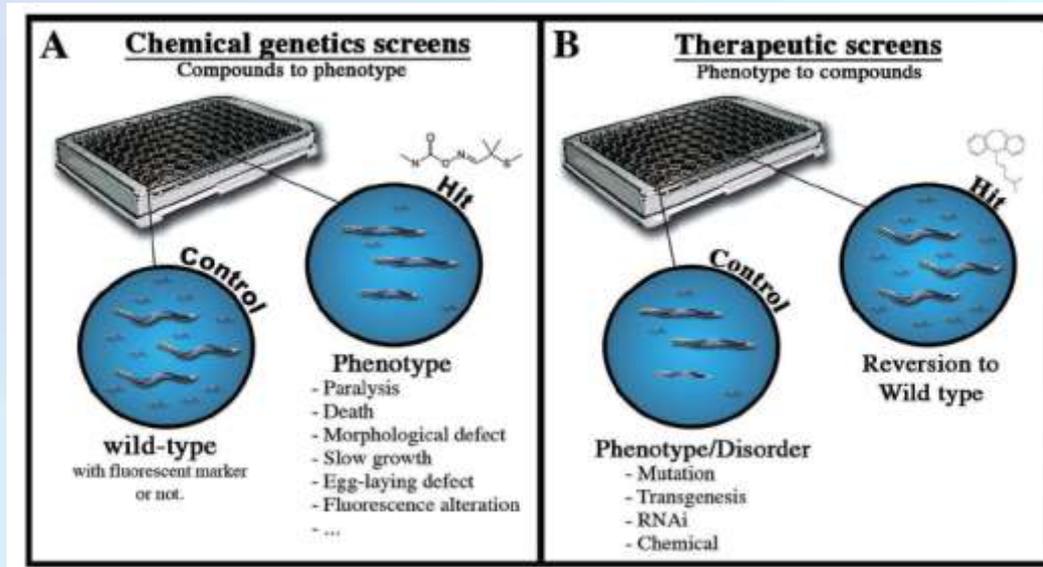
The screenshot shows the ZFIN website interface. On the left, there is a navigation menu with categories like Genes / Markers / Clones, BLAST of ZFIN, Gene Expression, Antibodies, Mutants / Morphants / Transgenics, and more. The main content area includes sections for Zebrafish International Resource Center, Genomes, Zebrafish Programs, and News. A search bar is located at the top right. The bottom of the page contains an 'Acknowledging Materials and Services' section.

Acknowledging Materials and Services
The Zebrafish International Resource Center is supported by grant P40 OH012546 from the NIH/NIDDK. Please acknowledge the Zebrafish International Resource Center and this grant number in all publications resulting from the materials and/or services we are providing to you. Thank you.

Основные информационные ресурсы по *D. rerio*

Что мы ищем?

Два основных подхода скрининга на малых модельных организмах



1. **Химико-генетический скрининг:** результатом скрининга являются хиты оказывающие влияние на фенотип.
2. **Терапевтический скрининг:** результатом являются хиты, возвращающие нормальный фенотип.

Выявление нового блокатора кальциевых каналов в процессе ХГС на модели *C.elegans*



Нормальный фенотип

14 100 биологически активных молекул



308 хитов, оказывающих влияние на фенотип



Измененный фенотип



1 хит – немадипин – А,
оказывающие вызывающий дефекты
морфологии и откладки яиц

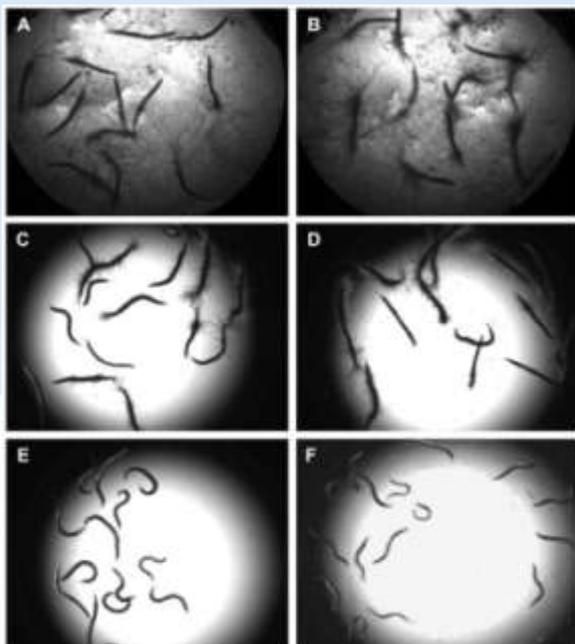
Мишени немадипина - А:

кальциевые каналы беспозвоночных egl-19
и L- тип кальциевые каналы позвоночных

Выявление нового противогрибкового агента в процессе ТС на модели *C.elegans*

Грибковая инфекция *C. albicans*

1. Предварительная обработка потенциальными хитами
2. Заражение грибом *C. albicans*
3. Визуализация терапевтического эффекта



(A) Отрицательный контроль
(C), (E) Амфотерицин В (1.0 mg/mL и 2.5 mg/mL)
(B,D,F) Кетоконазол – противогрибковая активность *in vivo* (концентрации 2,4 и 8 mg/mL)

*Выявление нового противогрибкового агента в процессе ТС на модели *C.elegans**

3228 биологически активных молекул



19 хитов, обладающих противогрибковой активностью

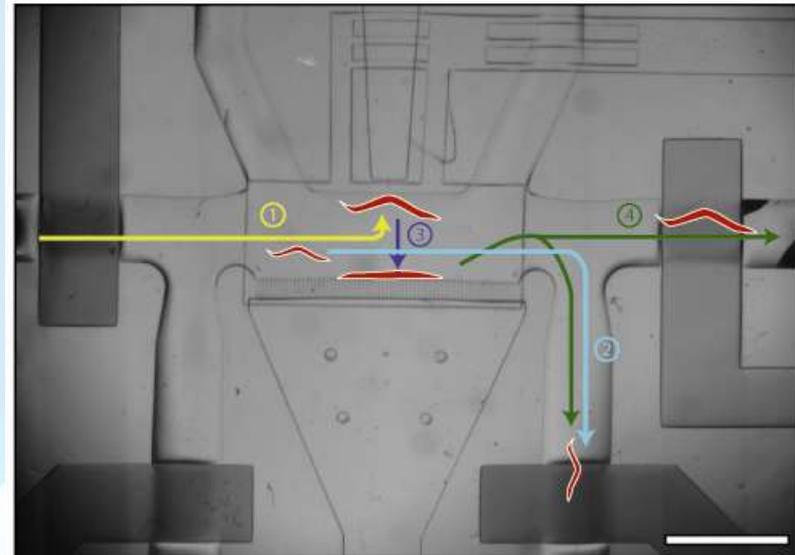
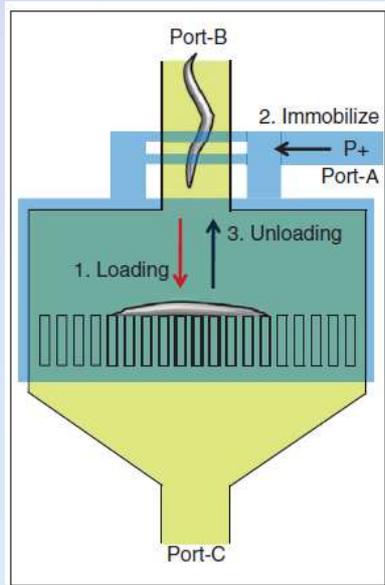


7 противогрибковых агентов

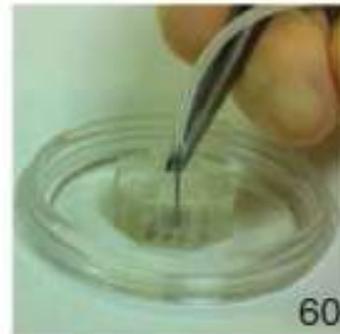
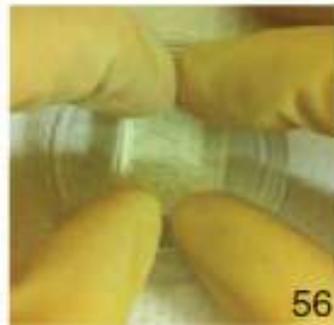


12 новых агентов, ранее не применявшихся
в качестве противогрибковых

Технологии микрофлюидики для ВС на малых модельных организмах



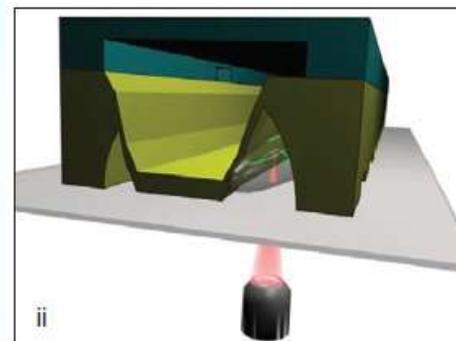
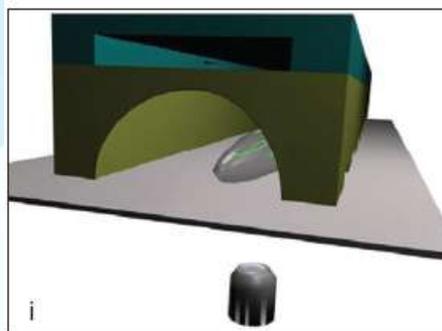
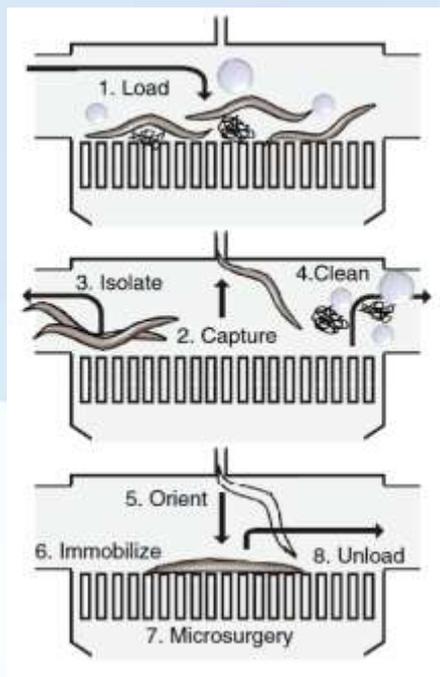
Чип для механической иммобилизации *C.elegans*.



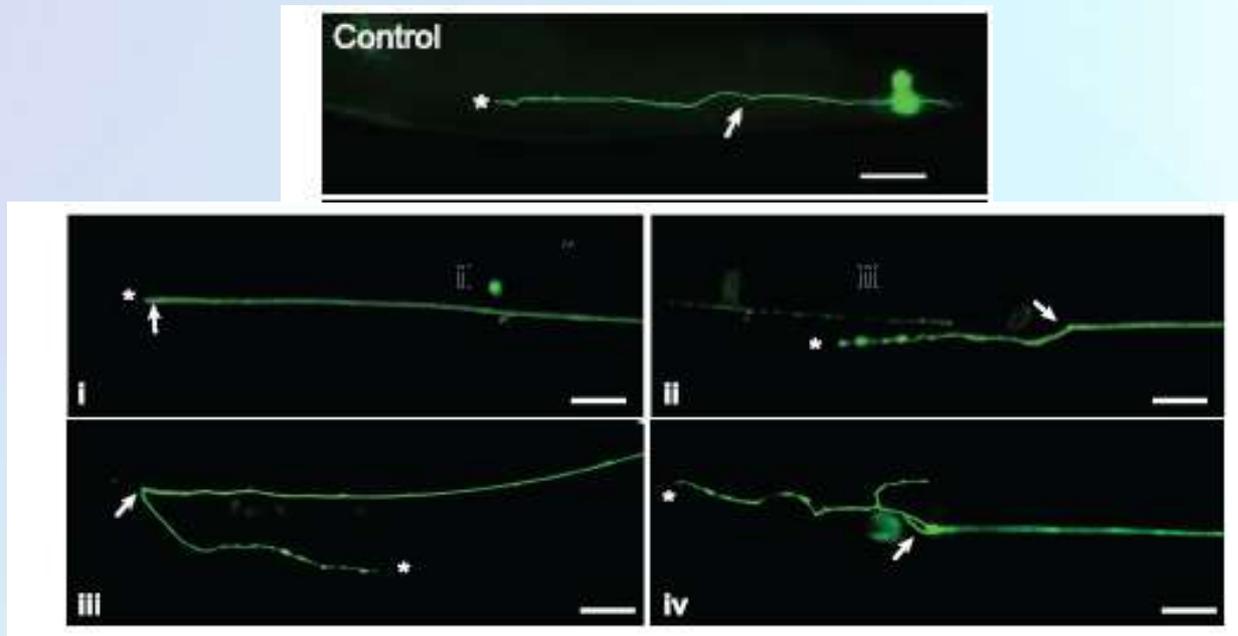
Применение чипов для ВС на *C.elegans*

Задача: поиск соединений воздействующих на регенерацию нервных клеток.

Постановка эксперимента: путем лазерной микрохирургии разрушались участки GFP-меченных аксонов, далее велось наблюдение за их регенерацией в естественных условиях.



Применение чипов для ВС на *C.elegans*



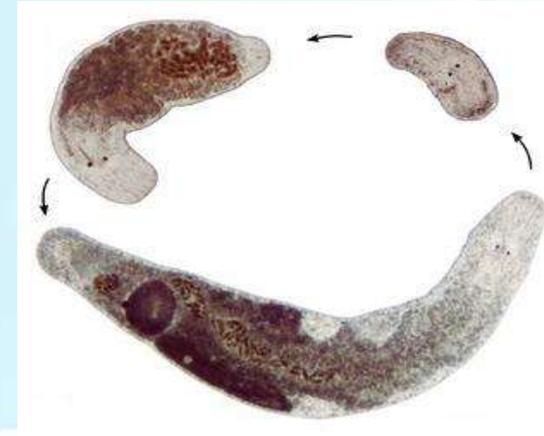
(i) слабая регенерация

(ii и iii) регенерация в направлении вперед, назад соответственно

(iv) регенерация с ветвлением

Результат: Выявлено 10 модуляторов протеинкиназ, которые оказывают различное влияние на восстановление нервных клеток у *C.elegans*.

Macrostomum lignano в качестве модели для ВС



Macrostomum lignano – свободноживущие морские плоские черви.

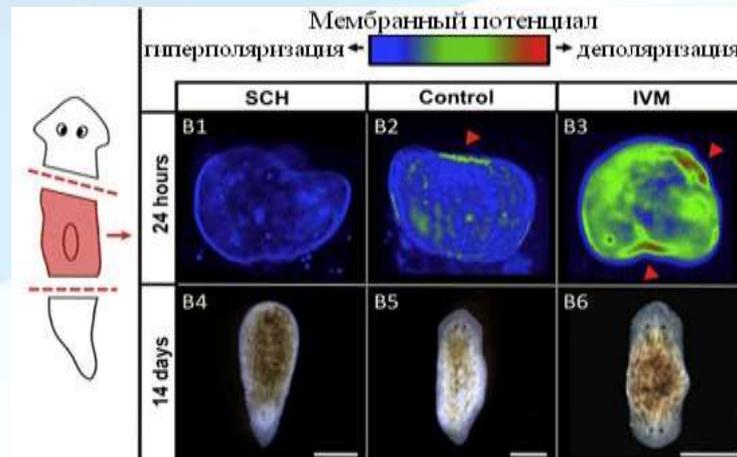
Преимущество *Macrostomum lignano*, как объекта ВС:

- очень маленький размер,
- прозрачность,
- относительно короткая продолжительность жизни,
- простота культивирования и манипуляции в лабораторных условиях,
- возможность моделирования заболеваний связанных с регенерацией тканей.

Исследование влияния модуляторов ионных каналов на регенерацию тканей у плоских червей *Macrostomum lignano*

Цели проекта:

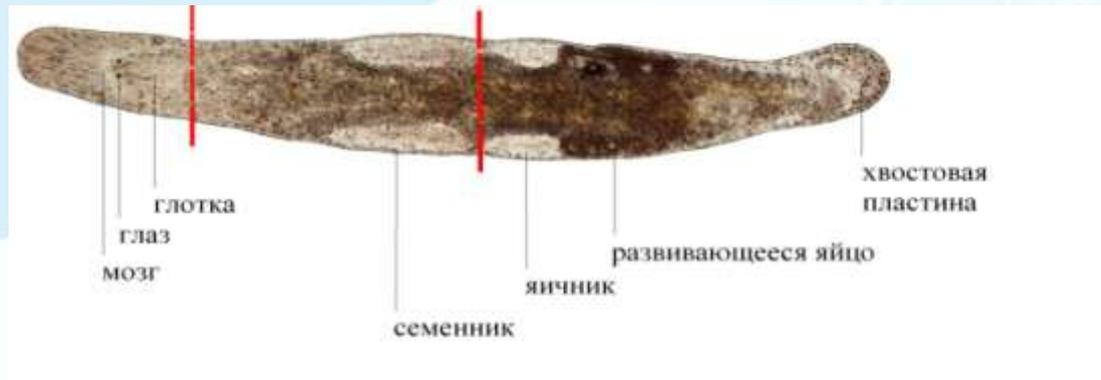
1. Исследование влияния модуляторов ионных каналов на паттерн регенерации у *Macrostomum lignano*
2. Пилотное испытание соответствия *Macrostomum lignano* требованиям, предъявляемым к объектам ВС



Модуляция процесса регенерации у планарий *Dugesia japonica*

Этапы исследования

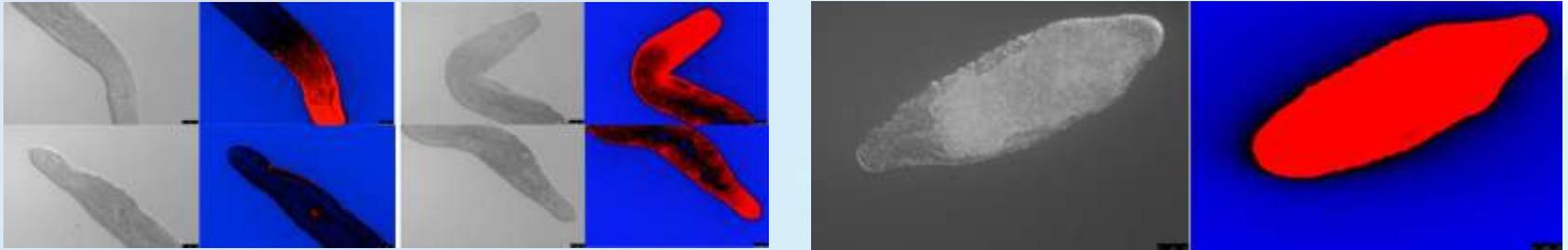
1. Выявление химических соединений влияющих на биоэлектрическую поляризацию мембран (ивермектин (IVM), празиквантел (PZQ) и др.).
2. Проведение экспериментов по изучению влияния хим. соединений на интактных червей и регенерацию.
3. Создание трансгенных линий плоских червей *Macrostomum lignano* (GECO; p_Ufluorin2) для детального изучения эффектов различных модуляторов на процесс регенерации.



Красными линиями указаны позиции для разрезания

Результаты

1. IVM и PZQ изменяют паттерн мембранного потенциала интактных червей

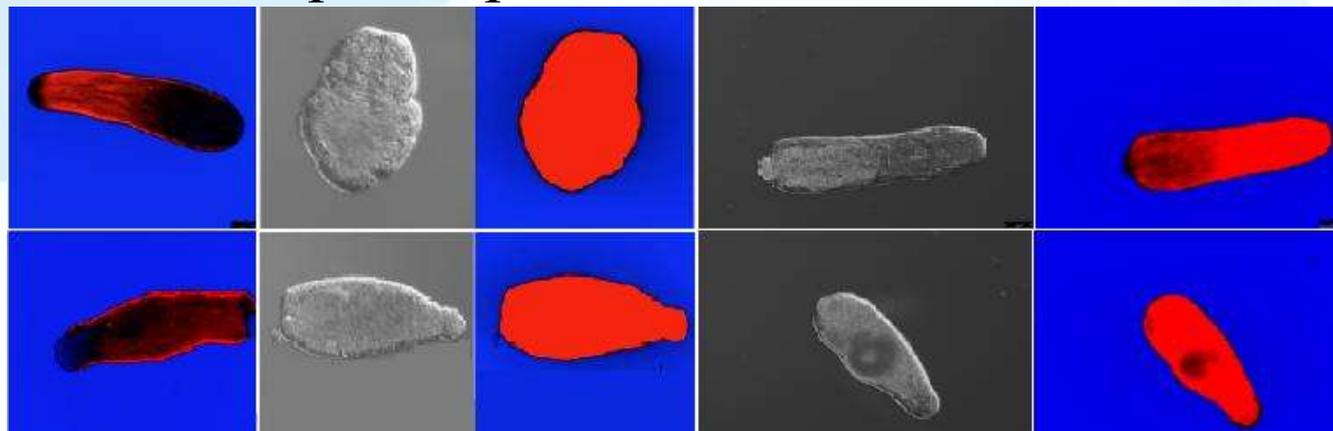


Контроль f/2

IVM 1µM

PZQ 100µM

2. IVM и PZQ изменяют паттерн мембранного потенциала при инициации регенерации



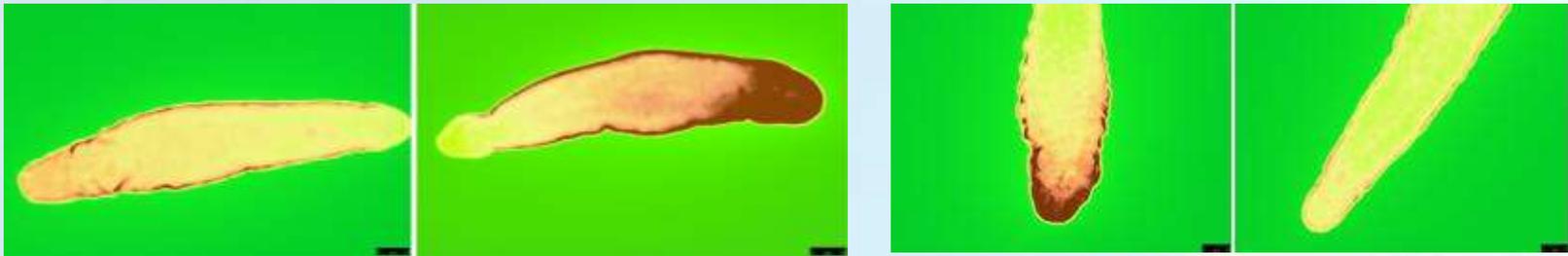
Контроль f/2

IVM 1µM

PZQ 100µM

Результаты

3. IVM и PZQ изменяют распределение ионов кальция в организме *интактных* червей (краситель X-rhod-1).

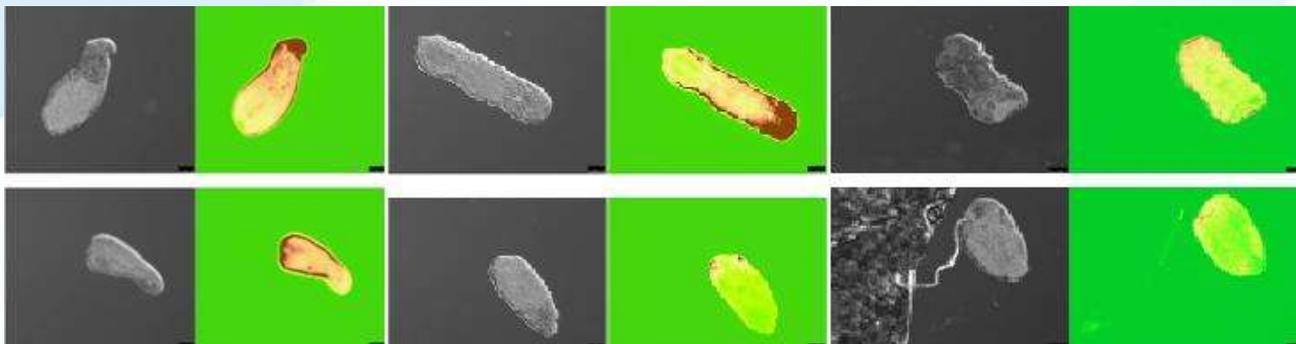


Контроль f/2

IVM 1μM

PZQ 100μM

4. IVM и PZQ изменяют распределение ионов кальция в процессе *инициации регенерации* (краситель X-rhod-1).



Контроль f/2

IVM 1μM

PZQ 100μM

Результаты

5. Воздействие IVM приводит к полной регенерации фрагмента головы и усиленно регенерации фрагмента хвоста. Воздействие PZQ в 5% случаев вызывает полную деградацию фрагментов головы и хвоста.

