Содержание

Введение 2

1.Технология скрининга 4

2. Биообъекты скрининга 7

2.1 Бактерии 8

2.2 Простейшие 9

2.3 Водоросли 10

3. Методы скрининга источников ЛС 12

Заключение 17

Литература 18

Введение

В настоящее время в России имеется немало проблем, связанных со здравоохранением. Ситуацию усугубляет низкий уровень обеспеченности эффективными отечественными лекарственными препаратами медицинских учреждений. Все это обуславливает необходимость поиска, создания и промышленного получения новых отечественных лекарственных средств (ЛС).

Технология высокопроизводительного скрининга (ВПС) биообъектов рассматривается в качестве ключевой на ранних этапах поиска и разработки ЛС. До недавнего времени она использовалась только в наиболее развитых мировых технологических центрах США, Европы и Азии. Технология ВПС оперирует такими понятиями, как высокие скорости, микроколичества, мини-эксперименты, быстрые результаты, большие базы данных.

Современные системы ВПС способны проанализировать более 100 тыс. индивидуальных образцов в день на индивидуальной биомишени, что обычно позволяет выявить 10-100 активных соединений, так называемых «хитов». Информация, полученная в процессе ВПС, используется на последующих стадиях оптимизации хитов. Обнаруженные при этом соединения-«лидеры» затем подвергаются всесторонним испытаниям (фармакокинетика, фармакодинамика, токсичность и пр.) специализированными научно-исследовательскими и клиническими организациями. Результатом является идентификация биообъектов, которые после прохождения клинических испытаний могут стать лекарствами [4].

Успешное внедрение такой высокотехнологичной и наукоемкой системы как ВПС требует создания определенных условий. Необходимо также наличие соответствующей научно-технологической инфраструктуры, т. е. научно-исследовательской базы, мощностей для высокопроизводительного синтеза соединений – будущих объектов испытаний, отработанных логистических схем, высококвалифицированного и обученного персонала.

1. Технология скрининга

В клинике в настоящее время используется порядка двухсот природных и синтетических антибактериальных веществ. Каждое из них имеет свою мишень. Как правило, это или фермент либо рибосомный белок. Для доказательства «существенности» (под «существенностью» подразумевается необходимость гена для жизнедеятельности клетки) генов применяется метод избирательного «выбивания» гена из генома с проверкой выживания организма после такой проуедуры, который представляет большой интерес как технология скрининга антибактериальных (шире – антимикробных) агентов [7].

Традиционно первичный отбор последних проводится путем испытания их действия на рост тест-культуры микроорганизма. Высокоактивные, подавляющие рост вещества, отобранные на этом этапе, проходят дальнейшеие испытания, в частности определяется антимикробный спектр их действя и активность в опытах in vivo на лабораторных животных, а также токсичность как для макроорганизма в целом, так и для отдельных его органов и тканей.

По завершении доклинических испытаний в случае получения положительных результатов препарат передается в клинику. Затем начинается углубленное изучения механизма действия антимикробного агента на субклеточном молекулярном уровнях, то есть ведется поиск его внутриклеточной мишени – макромолекулы или макромолекулярного комплекса – таргета (англ. Target – мишень) по недавно принятой терминологии. Далее выявляется ген, который кодирует образование этой макромолекулы, или гены, кодирующие образование макромолекул, входящих в макромолекулярный комплекс.

По новой технологии скрининга используют информацию о полностью секвенированном геноме патогенна и наличии в нем «существенных» генов. В лабораториях, в которых ведется создание новых лекарств, предварительно выбирается ген, который будет использован, как таргет [2].

Таргетный скрининг позволяет в соответствии с выбором гена отбирать биологически активные вещества с запланированным механизмом действия (в отличие от традиционного метода, когда поиск ведется «от клетки к гену»).

Первый этап таргетного скрининга – это выделение данного гена (соответствующего фрагмента ДНК) из генома. Затем фрагмент ДНК амплифицируется (создается вирусный вектор, который вводится в плазмиду) -количество копий гена умножается. Затем конструируются:

- бесклеточная система, где наработанная матрица служит для получения информационной РНК, специфичной для гена;

- бесклеточная рибосомная система, где эта информационная РНК служит для наработки белкового продукта, кодируемого данным геном.

Бесклеточная система, используемая для первичного отбора и оценки активности потенциальных лекарственных веществ – ингибиторов фермента (продукта изучаемого гена), содержит фермент и его субстрат. Когда наработан белок, возникает вопрос: как узнать функцию этого белка? Существует несколько способов:

- если наработанный белок схож с белком из «модельного» организма, то подобрать бесклеточную систему несложно;

- если сходство есть, но не очень близкое, то прибегают к анализу «мотивов» - коротких участков аминокислотной последовательности, которые распределены по всей длине белковой цепи и могут оказаться сходными у двух белков;

- если сходства не существует, то устанавливают, с какими белками он (наработанный белок) контранскрибируется (переписывается в последовательность матричной информационной РНК).

Таким образом можно проводить серийные испытания потенциальных ингибиторов функций почти любого из тысяч генов, составляющих геном патогенна и обнаруживать все новые «уязвимые точки» микробной клетки.

2. Биообъекты скрининга

Главным звеном биотехнологического процесса являются биообъекты. В настоящее время известно более 100 тыс. биообъектов, которые возможно использовать для производства лекарственных средств. При столь большом многообразии остро стоит вопрос о скрининге биообъектов [10].

Биообъектом может быть целостный сохранивший жизнеспособность многоклеточный или одноклеточный организм. Им могут являться изолированные клетки многоклеточного организма, а также вирусы и выделенные из клеток мультиферментные комплексы, включенные в определенный метаболический процесс. Также биообъектом может быть индивидуальный изолированный фермент.

Функция биообъекта – полный биосинтез целевого продукта, включающий ряд последовательных ферментативных реакций или катализ лишь одной ферментативной реакции, которая имеет ключевое значение для получения целевого продукта [1].

К биообъектам относятся как макромолекулы, так и микро- и макроорганизмы. В качестве макромолекул используются ферменты. Их использование наиболее рационально, так как в этом случае обеспечиваются многократность их применения и стандартность повторяющихся производных циклов.

В качестве биообъектов для приготовления вакцин используются вирусы. Доминирующее положение в современном биотехнологическом процессе занимают микробные клетки эукариот и прокариот. Они являются продуцентами (биообъект, осуществляющий полный биосинтез целевого продукта) используемых в качестве лекарственных средств первичных метаболитов.

Высшие растения являются наиболее обширным источником получения лекарственных средств. При использовании растений в качестве биообъектов основное внимание сосредоточено на вопросах культивирования растительных тканей на искусственных средах.

Традиционными поставщиками лекарственных средств являются представители животного мира. Разнообразие образуемых ими биологически активных соединений, нашедших применения в медицине, крайне велико.

Биотехнологические объекты находятся на разных ступенях организации:

а) субклеточные структуры (вирусы, плазмиды, ДНК митохондрий и хлоропластов, ядерная ДНК);

б) бактерии и цианобактерии;

в) грибы;

г) водоросли;

д) простейшие;

е) культуры клеток растений и животных;

ж) растения – низшие (анабена-азолла) и высшие – рясковые.

Разработка лекарственных препаратов является длительным, ресурсоемким и комплексным процессом, общий успех которого зависит от выбора рациональной стратегии действий на каждом из его этапов.

2.1 Бактерии

Микроорганизмов, синтезирующих продукты или осуществляющих реакции, полезные для человека, несколько сотен видов. Биотехнологические функции бактерий разнообразны. Бактерии используются при производстве пищевых продуктов, молочнокислых напитков, микробных инсектицидов, белка, витаминов, растворителей и органических кислот, биогаза и фотоводорода. Широко используется такое свойство некоторых бактерий, как диазотрофность, то есть способность к фиксации атмосферного азота.

Микробные клетки используют для трансформации веществ. Бактерии широко используются в генноинженерных манипуляциях при создании геномных клонотек, введении генов в растительные клетки (агробактерии) [8].

Большое распростанение получила спирулина (Spirulina platensis). В Африке население района озера Чад давно употребляет ее в пищу. Для белков этой водоросли характерно сбалансированное содержание аминокислот. Клеточная стенка этой водоросли хорошо переваривается.

Преимущества спирулины по сравнению с другими съедобными водорослями не только в простоте культивирования, но и в несложности сбора биомассы, высушивания ее, например, под солнцем. В ряде стран выращивают спирулину вида Spirulina platensis. Недавно было показано, что в клетках спирулины, помимо ценного белка, углеводов, липидов, витаминов, в значительных количествах запасается, например, такое ценное вещество, как поли-b-оксибутират. Отечественная фармацевтическая промышленность выпускает препарат «Сплат» на основе цианобактерии Spirulina platensis. Он содержит комплекс витаминов и микроэлементов и применяется как общеукрепляющее и иммуностимулирующе средство.

2.2 Простейшие

Простейшие относятся к числу нетрадиционных объектов биотехнологии. В настоящее время они привлекли внимание исследователей как продуценты биологически активных веществ.

В этом качестве рациональнее использовать свободноживущих простейших, обладающих разнообразными биосинтетическими возможностями и потому широко распространенными в природе.

Особую экологическую нишу занимают простейшие, обитающие в рубце жвачных животных. Простейшие рубца могут быть источником фермента целлюлазы, способствующей разложению клетчатки в желудке жвачных. Возбудитель южноамериканского трипаносомоза — Trypanosoma (Schizotrypanum cruzi) стала первым продуцентом противоопухолевого препарата круцина (СССР) и его аналога—трипанозы (Франция) [3].

Применение к простейшим общепринятого в микробиологии приема повышения биосинтеза липидов за счет снижения содержания в среде источника азота и увеличения содержания источника углерода привело к резкому торможению или остановке роста культур. Российские ученые получили водорастворимый полусинтетический препарат — астазилид, представляющий собой комплекс эфиров сахарозы и жирных кислот, предварительно выделенных из А. longa. Препарат не обладал прямым цитотоксическим действием на культуру опухолевых клеток, а его противоопухолевое действие, изученное на 8 штаммах перевиваемых опухолей мышей и крыс, реализовалось через иммунную систему.

Другой группой биологически активных веществ простейших являются полисахариды.

Разнообразие полисахаридов, синтезируемых простейшими, достаточно велико. Особый интерес представляет парамилон, характерный для эвгленоидных жгутиконосцев. Представители родов Astasia и Euglena способны к сверхсинтезу парамилона, составляющему свыше 50 % сухого остатка клеток. Этот полисахарид изучается как стимулятор иммунной системы млекопитающих.

2.3 Водоросли

В целом ряде стран водоросли используют как весьма полезную витаминную добавку к кормам для сельскохозяйственных животных. Но гидролизаты белка зеленой водоросли Scenedesmus используются и в медицине и косметической промышленности. Таким образом, культивируя эту водоросль, можно получать глицерол, пигмент и белок, что весьма перспективно с экономической точки зрения [9].

Одним из самых ценных продуктов, получаемых из красных водорослей, является агар — полисахарид, присутствующий в их оболочках и состоящий из агарозы и агаропектина. Водоросли — единственный источник получения агара, агароидов, каррагинина, альгинатовВ нашей стране основным источником агара служит красная водоросль анфельция.

Бурые водоросли богаты также весьма полезным соединением — шестиатомным спиртом маннитом, который с успехом применяют в фармацевтической и пищевой промышленности.

3. Методы скрининга источников ЛС

На этапе планирования биологических испытаний синтезированных соединений разработчик выбирает между двумя принципиальными стратегиями тестирования. В рамках первой стратегии новые соединения испытываются на одной или нескольких выделенных белковых биомишенях, функционирование которых связано с определенными патологическими состояниями.

Важно, что результаты первичных испытаний на индивидуальной биомишени позволяют обнаруживать закономерности зависимости между структурными особенностями молекул и их активностью (зависимости «структура-свойство» или SAR, от англ. structure-activity relationships), что в свою очередь позволяет направленно отбирать соединения для последующих циклов тестирования. Было показано, что несколько раундов такого скрининга, усиливаемых SAR-зависимостями, являются чрезвычайно эффективным средством поиска высокоактивных молекул [6].

В последнее десятилетие, особенно в связи с появлением высокопроизводительных автоматизированных систем биологического скрининга, она стала базовой стратегией поиска активных соединений на ранних этапах разработки лекарств.

При всей своей привлекательности эта стратегия имеет ряд весьма существенных недостатков. Главным из них является то, что при переходе к испытаниям на более комплексных объектах (клетки, ткани или целые организмы) результаты испытаний часто оказываются неадекватными по той причине, что на активность лекарства в реальной физиологической ситуации влияет большое число факторов, которые упрощенная тест-система не способна воспроизвести.

Практика разработки лекарственных средств в последние годы свидетельствует о том, что безоглядная ставка на масштабный скрининг больших библиотек соединений не привела к реальному увеличению числа выведенных на рынок новых лекарств.

Сравнительные характеристики стратегий биологического скрининга

рис.1

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Стратегия скрининга | Особенности | Результат |
| in vitro скрининг – на выделенных биомишенях | – возможность тестирования больших библиотек соединений (десятки и сотни тысяч);  – возможность обнаружения SAR-зависимостей и последующей оптимизации активных структур;  – высокая скорость анализа | in vitro «хиты» с высокой активностью по отношению к отдельной биомишени, но неясными перспективами активности в реальных физиологических условиях |
| in vivo испытания – (модели животных) | – малая производительность;  – длительность экспериментов (до нескольких месяцев);  – проблематичность эффективной оптимизации на основе полученных результатов | cоединения с фармакологически значимой активностью, но с неизвестным механизмом действия |
| «обратный» скрининг – на панели биомишеней | – малая производительность по числу соединений;  – высокая скорость анализа;  – возможность оценки активности соединения по отношению к десяткам и даже сотням биомишеней | cоединения с охарактеризованным мишень-специфичным профилем и потенциальными новыми терапевтическими индикациями |

Альтернативная стратегия биологических испытаний - этота, при которой химические соединения тестируются с использованием модельных систем, более приближенных к живым организмам объектам терапевтического воздействия. Примерами могут служить культуры клеток или тканей, патогенные организмы (например, бактерии) и даже животные. Соединения, активные по отношению к таким объектам, являются гораздо более ценными кандидатами в лекарства, чем вещества, проявившие активность в пробирочных тестах на выделенных белках. Однако здесь тоже существуют препятствия:

- стоимость испытаний на животных во много раз превышает стоимость in vitro испытаний. Это приводит к невозможности испытаний больших библиотек соединений.

- на активность соединений в подобных экспериментах влияет множество факторов, таких как природа молекулярной биомишени, эффективность проникновения соединений через биологические мембраны, скорость метаболитической деградации соединений в тестируемых объектах и другие.

Поэтому на основании подобного тестирования сложно создать адекватные модели связи структуры с активностью, которые являются ценным подспорьем при оптимизации активных молекул. Пробирочные испытания на выделенных биомишенях также не позволяют адекватно судить о мишень-специфичной фармакологии лекарственного кандидата.

Известно, что в настоящее время лекарственные соединения в большинстве является по своей природе полифункциональными. То есть в реальных физиологических условиях они действуют на ряд биомишеней в организме человека. Следовательно, даже в случае успешного преодоления барьера «in vitro» исследователи не имеют полной ясности относительно механизмов функционирования [5].

Производственные штаммы микроорганизмов должны соответствовать определенным требованиям: способность к росту на дешевых питательных средах, высокая скорость роста и образования целевого продукта, минимальное образование побочных продуктов, стабильность продуцента в отношении производственных свойств, безвредность продуцента и целевого продукта для человека и окружающей среды. В связи с этим все микроорганизмы, используемые в промышленности проходят длительные испытания на безвредность для людей, животных и окружающей среды. Важным свойством продуцента является устойчивость к инфекции, что важно для поддержания стерильности, и фагоустойчивость.

Разработчики лекарственных средств оказываются в непростой ситуации: пробирочные испытания на выделенных биомишенях оказываются чрезмерно упрощенной моделью, а более приближенные к реальности эксперименты отличаются высокой стоимостью и малой производительностью. В обоих случаях полученные результаты слабо поддаются интерпретации с точки зрения механизма действия активных соединений.

Экспериментальным подходом, позволяющим эффективно дополнить описанные выше стратегии биологических испытаний и существенно повысить эффективность создания лекарственных средств, является «обратный» скрининг. В отличие от прямого биологического скрининга больших библиотек химических соединений на одной или нескольких биологических мишенях, в рамках концепции «обратного» скрининга одно или несколько соединений, обладающих доказанными фармакологическими эффектами, но неизвестными (или не до конца понятными) механизмами действия, тестируются на большой панели биомишеней, соответствующих типу фармакологической активности (см. рис.1).

В результате обнаруживаются биомишени для действия исследуемого вещества, что является ключевым шагом к оценке его мишень-специфичной фармакологии. Если тестируемое вещество является разрешенным лекарственным препаратом, уточнение профиля мишень-специфической активности может позволить найти новые потенциальные области его терапевтического применения. В этом случае возможно создание препарата причем со значительно меньшими затратами.

Сравнительные характеристики трех описанных стратегий биологического скрининга представлены в таблице (см. выше). Следует отметить, что на практике все эти стратегии являются не конкурирующими, а взаимодополняющими, и выбор оптимальной концепции исследований зависит от терапевтической области, характера исследуемых молекулярных объектов, доступных ресурсов и прочих.

Для практической реализации «обратного» скрининга требуется применение целого комплекса передовых научно-исследовательских технологий, относящихся к дисциплинам геномики, протеомики, робототехники, молекулярной биологии, компьютерного анализа данных.

Технология обратного скрининга позволяет решать целый ряд различных задач, среди которых наибольший интерес представляет анализ механизмов действия лекарственных соединений с использованием панели биологических мишеней. Один из наиболее популярных подходов связан с применением специальных тест-систем на основе белковых микрочипов. Микрочип состоит из определенного количества микроячеек, каждая из которых содержит индивидуальную белковую биомишень, ковалентно привязанную к микроячейке при помощи специальной химической линкерной системы. Анализируемое лекарственное соединение добавляют к каждой микроячейке, после чего определяют наличие взаимодействия между биомишенью и соединением при помощи различных методов детекции.

Заключение

Нет сомнения, потенциал биотехнологии в наши дни велик. Ей дано — пусть в определенных границах — перевивать по-новому «нить жизни» — ДНК — методами генетической и клеточной инженерии, создавать биообъекты по заранее заданным параметрам и, как обычно добавляют, на благо человечества.

Биотехнология представляется «страной контрастов», сочетания самых передовых достижений научно-технического прогресса с определенным возвратом к прошлому, выражающимся в использовании живой природы как источника полезных для человека продуктов вместо химической индустрии.

Выделение и подбор биообъектов и их исследование – важных этап биотехнологического процесса. Основные особенности методов разработки лекарственных средств в «геномную эру» состоят в попытке ускоренного прохождения пути от структур геномов и протеомов человека в состоянии патогенеза к структурам низкомолекулярных модуляторов функций биомишеней, вовлеченных в конкретные патологии.

Как правило, современные подходы связаны с высокотехнологичными методами исследований, нацеленными на высокопроизводительные химико-биологические эксперименты и систематический анализ огромных массивов информации. Развитие этого направления не только решает задачу интенсификации разработки новых лекарств, но и способствует общему движению в сторону развития инновационной составляющей отечественной экономики.

Литература

1. Биотехнология лекарственных средств: учеб. пособие / под ред. В.А. Быкова, М.В. Данилина.-М.: Медбиоэкономика, 1991, стр.105-108.
2. Биотехнология: Принципы и применение / под редакцией И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джойса; пер. с англ.- М.: Мир, 1998, стр.45-82.
3. Биотехнология: Учебное пособие для ВУЗов /Под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова.- М.: Высшая школа, 1987, стр. 15-25.
4. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: М.: Изд-во МГУ, 1994, стр. 73-78.
5. Елинов Н.П. Основы биотехнологии. Издательская фирма «Наука», СПБ, 1995, стр. 61-73.
6. Иммобилизованные клетки и ферменты / под ред. Дж.Вудворта; пер. с англ. – М.: Мир, 1998. – 321с.
7. Микробная биотехнология: Методическое пособие к лабораторным работам для студентов факультета промышленной технологии лекарств / Составители: Е.П.Яковлева и другие; С.-Петербург. Гос.Хим-фармац.акад. - СПб. : Издательство СПХФА, 2000, стр. 32-39.
8. Промышленная микробиология / под. ред. Н.С. Егорова.-М.: Высш. шк., 1989, стр.45-56.
9. Северин С.Е. Биохимия и медицина – новые подходы и достижения / С. Е. Северин. – М: Русский врач, 1998. – 94с.
10. Фармацевтический скрининг в России: прямой или обратный? [Электронный ресурс]. – REMEDIUM, 2007. - №12. – Режим доступа: http://www.remedium.ru/section/state/detail.php