



Макеев Олег Германович

Заведующий лабораторией клеточной и генной терапии ГАУЗ СО
Институт медицинских клеточных технологий
Заведующий кафедрой биологии ГБОУ ВПО «Уральский государ-
ственный медицинский университет»,
д.м.н., профессор
г. Екатеринбург

*О.Г. Макеев^{1,2}, А.В. Коротков^{1,2}, Е.А. Шуман^{1,2},
В.В. Мелехин^{1,2}, Д.А. Сичкар^{1,2}, О.А. Сатонкина^{1,2},
С.В. Костюкова^{1,2}, А.Д. Балданишириева¹*

ТЕХНОЛОГИЯ СКРИНИНГА СУБСТАНЦИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

¹Лаборатория технологий клеточной и генной ГАУЗ СО «Институт медицин-
ских клеточных технологий», Екатеринбург;

²ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет,
Екатеринбург

Введение

В настоящее время в арсенале клинициста находятся тысячи лекарственных препаратов, однако опыт их использования побуждает искать более эффективные, обладающие большей управляемостью действия и меньшим риском развития неблагоприятных последствий.

Поэтому поиск новых лекарственных средств по-прежнему остается актуальным.

Вместе с тем растет и стоимость таких разработок. Так, если в 2002–2007 финансовые затраты в расчете на одну перспективную молекулу составляли 2,8 млрд долларов, то в настоящее время она превышает 5 млрд долларов.

Разработчики лекарственных средств на раннем доклиническом этапе имеют дело с сотнями молекул в отсутствие каких-либо гарантий, что хотя бы одна или несколько молекул дойдут до уровня клинической апробации. Поэтому вполне естественно желание разработчиков максимально сократить этот этап по времени и финансовым затратам, минимизировав эксперименты на животных.

Для скрининга веществ-кандидатов на модели культуры клеток человека, наряду с определением активности рецепторов, внутриклеточных ферментов и иных репортерных молекул, используется прямая визуализация.

В качестве примера можно привести панель, разработанную в компании Glaxo Smith Kline [1] (табл. 1).

Таблица 1

Панель	Общая токсичность/ Гено- токсичность	Гепато- токсичность	Кардио- токсичность	Нейро- токсичность	Нефро- токсичность	Эмбрио- токсичность
Обоснование	45 % веществ кандидатов отклоняются на этом этапе	11,1 % веществ кандидатов отклоняются на этом этапе	12,2 % веществ кандидатов отклоняются на этом этапе	12 % веществ кандидатов отклоняются на этом этапе	9,4 % веществ кандидатов отклоняются на этом этапе	10,2 % веществ кандидатов отклоняются на этом этапе
Модель	фибробласты, эпителиоциты	гепатоциты, HepG2	кардиомиоциты	нейроподобные клетки фетуса, iPS	почка фетуса	ткани фетуса

Применение панели предполагает оценку общей токсичности и генотоксичности на модели культивируемых фибробластов и эпителиоцитов человека для отбора наименее токсичных вариантов. Современная лабораторная техника дает возможность анализировать десятки вариантов и изомеров молекулы в сутки и уже на этом этапе позволяет получить важные данные для построения зависимости строение/токсичность с целью оптимизации синтеза новых вариантов. По опыту компаний, на этом этапе отбраковывается до половины веществ-кандидатов.

На последующих этапах панели оценивается токсичность препарата в отношении отдельных клеток (клеток почек, печени и иных), что уже на этапе доклиники позволяет отсеять подавляющее большинство изучаемых молекул

Данный подход резко снижает финансовые затраты на доклинические исследования и в десятки раз сокращает время, необходимое для отбора наиболее перспективных веществ-кандидатов.

Подобные панели используют и другие компании (Astra Zeneca, Novartis, Pfizer, Pharmaxis).

Важным представляется то, что применение таких панелей дает исследователям информацию о первичной и вторичной биомиссии отобранного вещества-кандидата, позволяет разработать оптимальный протокол проведения дальнейших исследований. Использование культивируемых клеток человека дает возможность с большей степенью точности прогнозировать негативные эффекты, которые не могут быть обнаружены на моделях лабораторных животных, определить возможные пути метаболизма в организме человека до начала клинических исследований и, соответственно, составить план и определить риски и их маркеры для выполнения клинической апробации [2].

Первые успешные шаги при изучении перспективных препаратов в нашей лаборатории были выполнены в 2009–2010 годах при исследовании новых рентгеноконтрастных веществ на основе наночастиц ортоталата иттрия. Для оценки общей токсичности частиц были использованы фибробласты человека, как наиболее применимые для токсикологических исследований самых разнообразных субстанций. Наряду со стандартными тестами на токсичность (витальное окрашивание, построение кривой роста), в качестве метода оценки была избрана тест-система TOX 1 (Sigma, США), предназначенная для опреде-

ления суммарной активности внутриклеточных дегидрогеназ и ТОХ 7 (Sigma, США) для оценки активности лактат-дегидрогеназы. Выбор был обусловлен тем, что для наночастиц, имеющих в своем составе металлы, наиболее характерно поражение дыхательной цепи митохондрий, а для соединений иттрия — необратимое ингибирование митохондриальной лактат-дегидрогеназы.

Генотоксичность наночастиц изучали методом оценки полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (ПДАФ). Суть метода заключается в амплификации фрагментов ДНК с использованием единичного короткого праймера (праймеров) с низкой температурой отжига в реакции ПЦР. Праймер связывается с геномной ДНК в двух различных участках инвертированных повторов. При электрофоретическом разделении амплифицированной ДНК образуются дискретные продукты, размер которых варьирует от 100 до 5000 п.н. (ДНК-паттерны). Эти фрагменты представляют собой последовательности ДНК, заключенные между двумя инвертированными повторами. Различия в ДНК-паттернах определяются различиями в одном или обоих праймер-связывающих сайтах (наличие или отсутствие полосы ПЦР-продукта в спектре) или присутствием инсерции/делеции в амплифицируемом фрагменте (различия ПЦР-продуктов по размеру). Прогностические возможности RAPD-технологии успешно проиллюстрированы на многочисленных примерах [3, 4, 5]. Для повышения качества результатов, нами была разработана модификация метода на основе изотопно меченых нуклеотидов, что позволяет количественно учитывать как точечные мутации, так и геномные перестройки, в том числе нарушения метилирования и экспрессии генов (эпигеномные перестройки). Результаты были представлены на Международном салоне инновации в Женеве, где были удостоены золотой медали [6].

Аналогичные работы активно проводились с Екатеринбургским Медицинским Научным Центром Профилактики и Охраны Здоровья Рабочих Промпредприятий ФБУН по исследованию наночастиц и экзополлютантов, а так же поиску веществ и их комбинаций, способных предотвратить их нежелательные эффекты на организм человека. Закономерным результатом явилось помимо многочисленных публикаций, получение патента РФ [7].

В октябре 2015 года на основании Договора о сотрудничестве между Уральским федеральным университетом и Уральским государственным медицинским университетом, в том числе с участием институтов УрО РАН была создана совместная проблемная лаборатория. При этом Научно-технический и инновационный центр фармацевтических технологий Уральского Федерального университета осуществляет синтез потенциально перспективных молекул, а отдел молекулярных и клеточных технологий ЦНИЛ Уральского государственного медицинского университета и лаборатория технологий клеточной и генной терапии Института медицинских клеточных технологий осуществляет скрининг синтезированных молекул на предмет общей токсичности, генотоксичности, эмбрио-, гепато-, кардио-, нефро- и нейротоксичности на модели культивируемых клеток человека.

К настоящему времени выполнена оценка потенциально перспективных молекул для борнейтронзахватной терапии онкопатологии.

Проведение таких исследований требует преодоления ряда сложностей, связанных с невозможностью длительного культивирования отдельных разно-

видностей клеток.

Альтернативой известным подходам может стать направленная дифференцировка индуцированных плюрипотентных клеток (ИПС), получаемых из зрелых или прогениторных клеток взрослого организма посредством их генетического репрограммирования. Такие технологии позволяют создать платформу по биоскринингу лекарственных средств на клетках человека, получаемых путем направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных клеток.

Основная проблема практического использования ИПС — крайне низкий выход гомогенных клеток при индукции плюрипотентности. Наша технология, как показали предварительно проведенные эксперименты, позволяет увеличить выход клеток в 8–15 раз. Кроме того, отечественные разработчики для репрограммирования клеток используют средства на основе вирусов, что необратимо изменяет геном клеток и, соответственно, клеточные характеристики. В разрабатываемой методике множественного трансфектирования и синхронизации культуры трансфектируемых клеток используются невирусные системы репрограммирования, которые не изменяют геном клетки и саморазрушаются после его завершения.

Заключение

Таким образом, скрининг перспективных в отношении молекул для создания лекарственных средств с использованием культивируемых клеток человека, в связи с активизацией работ по государственной программе «Фарма - 2020», предусматривающей обеспечение потребности населения отечественными препаратами, становится все более востребованным в России.

ЛИТЕРАТУРА

1. Whitebread S., Bowes J., Brown A. et al. Rational design of an in vitro safety profiling panel to reduce undesired secondary pharmacology of drug candidates // *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. - 2011. - Vol. 64(1). - PP e18.
2. Boms J., Andrew J. Brown A.J., Jacques Homon J., Wolfgang Jarolimek W. et al. Reducing safety-related drug attrition: the use of in vitro pharmacological profiling. // *Nature REVIEWS*. - 2012. - PP 609-922.
3. Caetano-Anolles G., Bassam B.J., Gresshoff P.M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotides. // *Biotechnology*. - 1991. - Vol.9(6). - P.553.
4. Waugh R., Powell W. Using RAPD marker for crop improvement. // *Trends Biotechnol.* - 1992. - Vol.10. - P.186.
5. Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // *Nucleic Acids Res.* -1990. -Vol.18. (24). - P.7213.
6. Васильева М.С., Коротков А.В., Макеев О.Г. Сравнительная оценка цитотоксичности наночастиц ортоганталата иттрия и серебра на культивируемых клетках человека // *Цитология*. - 2011. – Vol. 9(53).- PP. 727-729.
7. Кацнельсон Б.А., Привалова Л.И., Гурвич В.Б., Макеев О.Г., Шур В.Я., Сутункова М.П., Киреева Е.П., Минигалиева И.А., Логинова Н.В., Валамина И.Е. Способ профилактики вредных эффектов общетоксического и генотоксического действия наночастиц оксида меди на организм. // Патент на изобретение № 2530639.

REFERENCES

1. Whitebread S., Bowes J., Brown A. et al. Rational design of an in vitro safety profiling panel to reduce undesired secondary pharmacology of drug candidates // Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. - 2011. - Vol. 64(1). - PP e18.
2. Boms J., Andrew J. Brown A.J., Jacques Homon J., Wolfgang Jarolimek W. et al. Reducing safety-related drug attrition: the use of in vitro pharmacological profiling. //Nature REVIEWS. - 2012. - PP 609-922.
3. Caetano-Anolles G., Bassam B.J., Gresshoff P.M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotides. //Biotechnology. - 1991. - Vol.9(6). - P.553.
4. Waugh R., Powell W. Using RAPD marker for crop improvement.//Trends Biotechnol. - 1992. - Vol.10. - P.186.
5. Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers //Nucleic Acids Res. -1990. -Vol.18. (24). - P.7213.
6. Vasileva M.S., Korotkov A.V., Makeev O.G. Sravnitel'naya otsenka tsitotoksichnosti nanochastits ortotantalata itriya i serebra na kultiviruemyih kletkah cheloveka //Tsitologiya. - 2011. – Vol. 9(53).- PP. 727-729.
7. Katsnelson B.A., Privalova L.I., Gurvich V.B., Makeev O.G., Shur V.Ya., Sutunkova M.P., Kireeva E.P., Minigalieva I.A., Loginova N.V., Valamina I.E. Sposob profilaktiki vrednyih effektov obschetoksicheskogo i genotoksicheskogo deystviya nanochastits oksida medi na organizm. //Patent na izobretenie № 2530639.