

Тест-системы для химико-  
фармацевтического скрининга  
лекарственных субстанций на основе  
единой платформы нормальных  
специализированных клеток человека

3 декабря 2008

Лаборатория «генетических основ клеточных  
технологий»

ИОГен им. Н.И. Вавилова РАН

ООО «ЛКТ»

# Системы скрининга на основе клеток

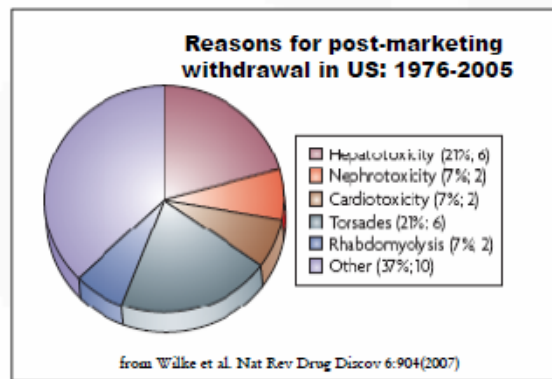
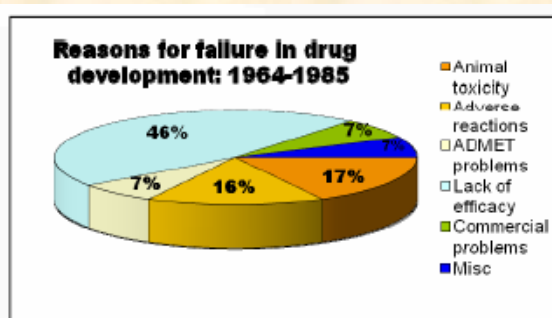
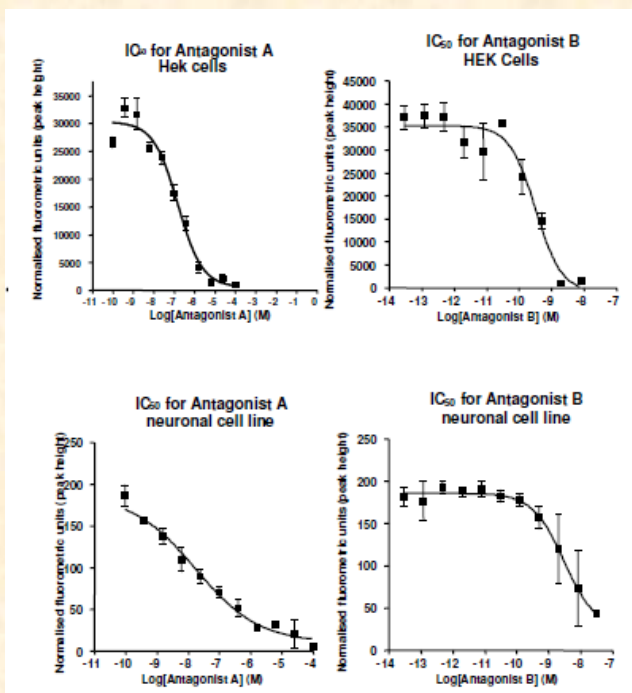
- Для проведения и/или улучшения эффективности выбора «лидерного» лекарственного вещества требуется улучшение функциональных тест систем
- В настоящее время активно используются тест-системы на основе клеток. При этом используются:

Клеточные системы в которых мишень присутствует естественным или искусственным образом

Например, чаще всего используются простые в обращении и быстро пролиферирующие клетки линий НЕК293, CHO

- НО !!! Сигнальные пути трансформированных и нормальных клеток различаются
- Вторичные внутриклеточные взаимодействия некорректны

# Ограниченность и несовершенство существующих систем



**33% НОВЫХ**  
**субстанций В**  
**клинических**  
**испытаниях показали**  
**неудовлетворительную**  
**кардио- и**  
**гепатотоксичности, что**  
**стоило 8 млрд \$ /год.**  
**По оценкам FDA**  
**увеличение**  
**эффективности**  
**скрининга только на**  
**токсичность позволит**  
**сэкономить 100 млн \$**  
**на каждой субстанции.**

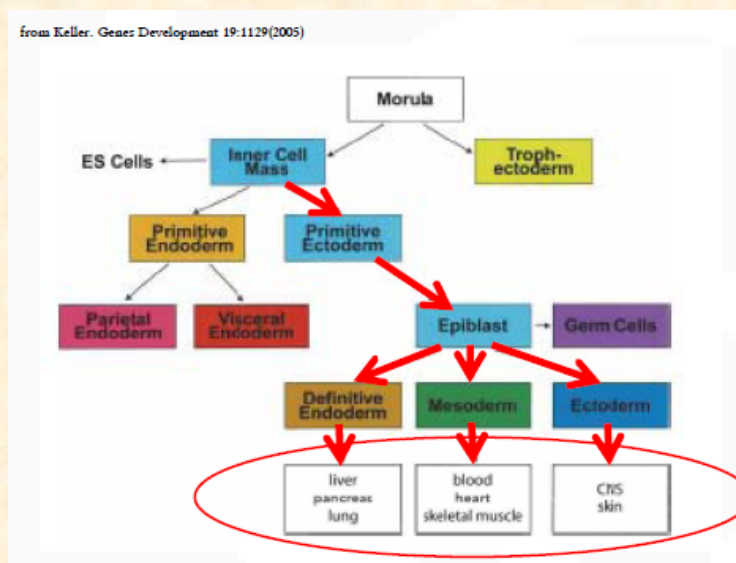
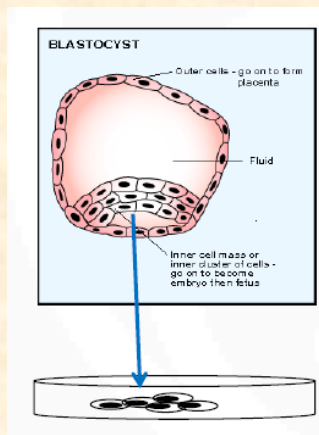
# Без систем скрининга и тестирования разработка современных лекарств НЕВОЗМОЖНА.

Основной задачей является создание наиболее совершенных систем доклинического скрининга эффективности и безвредности «лидирующих» веществ, позволяющих экономить время и деньги и базирующихся на единой платформе

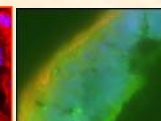
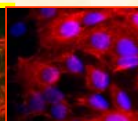
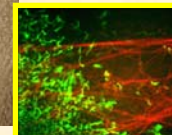
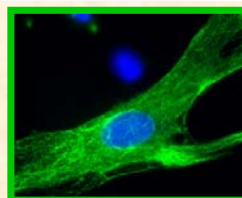
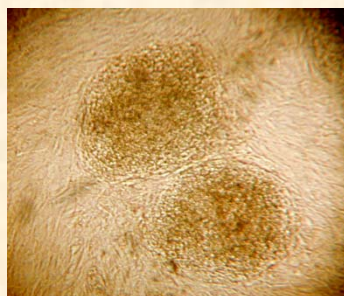
Недостатки существующих:

- Отсутствие надежных (стабильных, стандартных) соответствующих нормальных клеточных линий человека.
- Отсутствие *in vivo* моделей
- Использование для скрининга трансформированных или опухолевых линий.
- Нестандартность и недоступность первичных культур специализированных клеточных линий человека.
- Присутствие животных и не охарактеризованных компонентов среды
- Ограниченное исходное количество и невозможность увеличить без ущерба.
- Время, время, время.....
- Ограниченные возможности генно-инженерных манипуляций

# Единая платформа – линии ЭСК человека

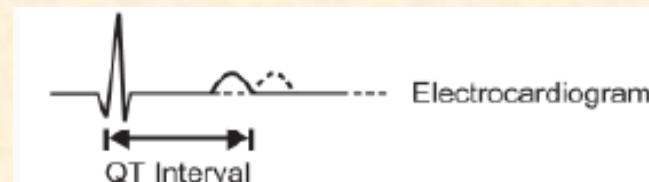
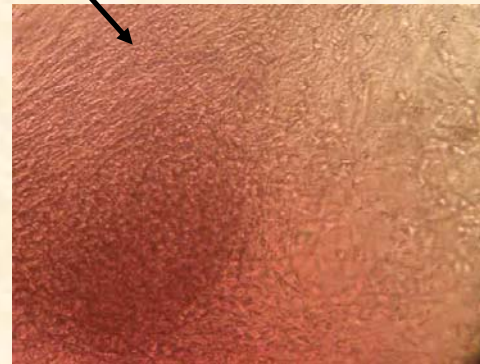
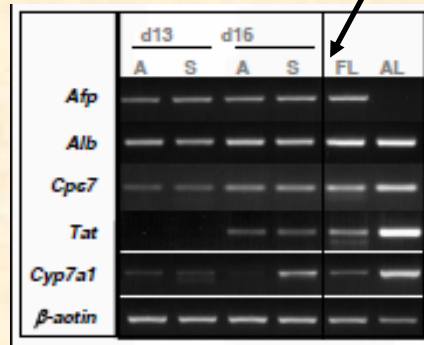


Лагарькова и др, 2005  
 Lagarkova et al, 2006  
 Prokhorovich et al, 2006  
 Lagarkova et al, 2006  
 Kiselev et al., 2006  
 Philonenko et al, 2007  
 Киселев и др, 2007  
 Prokhorovich et al, 2007  
 Lagarkova et al, 2008  
 Korneev et al, 2008  
 Lagarkova et al, 2008  
 Lagarkova et al, 2009



В настоящий момент имеется 6 линий серии HESM(K), 2 их «больные» производные, 3 серии HUES (D. Melton), 2 серии H (J. Thomson, «бушевские»), 2 генетически модифицированные, ведущихся в “defined” условиях

# Снижение стоимости разработки фарм. субстанций за счет таргетной токсикологии



Гепатоциты

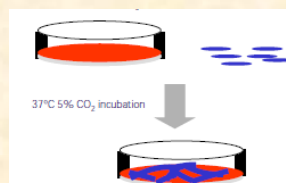
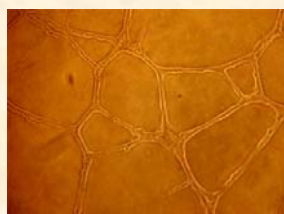
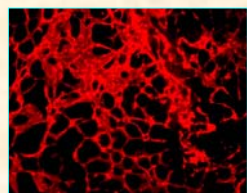
Кардиомиоциты

# Лидирующее положение по смертности и инвалидизации занимают сердечно сосудистые и онкологические заболевания

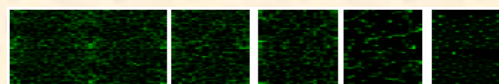
Мишень (target)- функциональный ангиогенез

## Сосудобразование

## Миграция

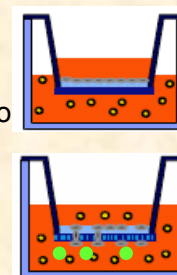


Флуоресцентный краситель в клетки + Lead

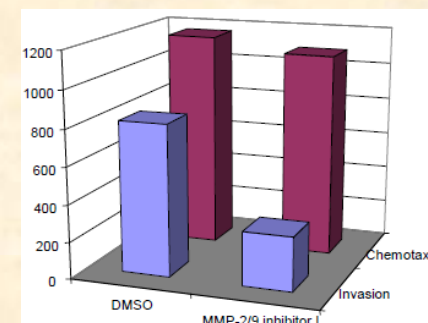
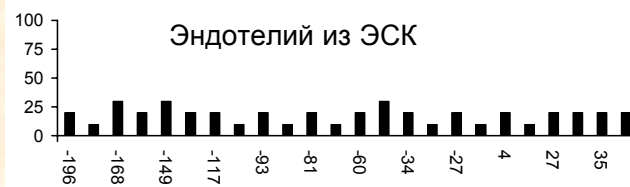
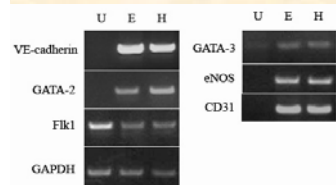


Плотность флуоресценции в зависимости от концентрации ингибитора функциональной активности

Эндотелий флуо  
Матригель  
хемоаттрактант



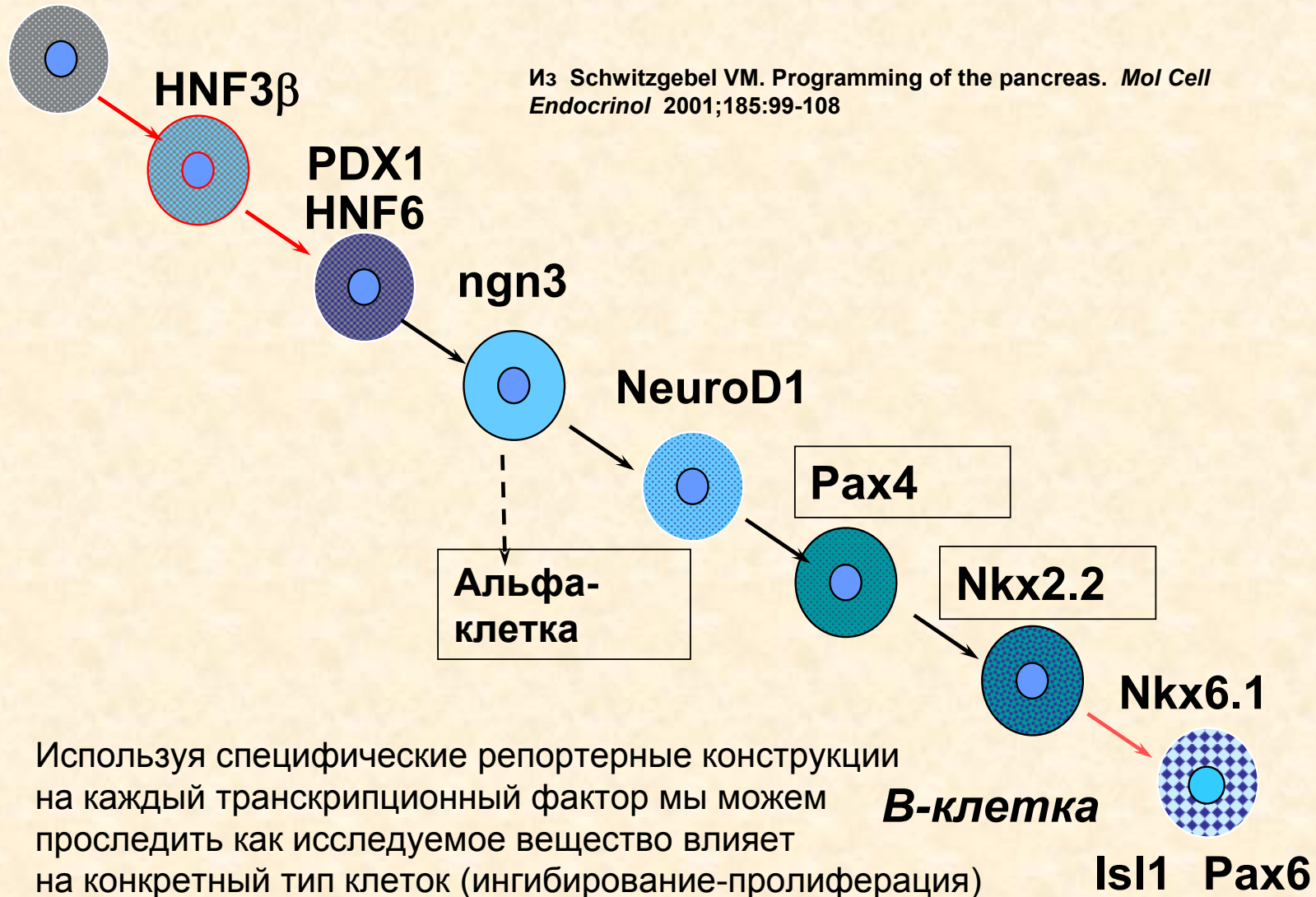
Измерение флуоресценции в нижней камере



Lagarkova et al., Cell cycle, 2008, p2929+патентная заявка

# Роль транскрипционных факторов в дифференцировке $\beta$ -клеток поджелудочной железы

Из Schwitzgebel VM. Programming of the pancreas. *Mol Cell Endocrinol* 2001;185:99-108





## Транскрипционные факторы, определяющие фенотип клеток

**Oligodendrocyte** Olig1 Nkx2.2 Olig 2

**Cardiac myocyte** Nkxx2-5 GATA-4 MEF2c

**Keratinocyte** KLF4

**Hepatocyte** HNF-3 $\beta$ /Foxb3 HNF-4 $\alpha$

**Lymphocyte** GATA-3 LEF-1

**Islet  $\beta$  cell** Pax-4 HNF-3 $\beta$  PDX-1 HNF-1&4 $\alpha$  NeuroD/BETA2

**Neuron** Neurogenin Mash-1 Phox2 Sp4

**B lymphocyte** Pax-5 PU.1 OTF-2 Bright

**Skeletal myocyte** Pax3 MyoD1 Myf5 *early* myogenin MRF4 *late*

**Osteoblast** Core-binding factor alpha 1 Cbfa1

**Chondrocyte** Sox9 Sox6

**Adipocyte** PPAR $\gamma$  C/EBP $\alpha$

**Erythrocyte** Runx1 GATA2 *early* EKLF *late* GATA-3

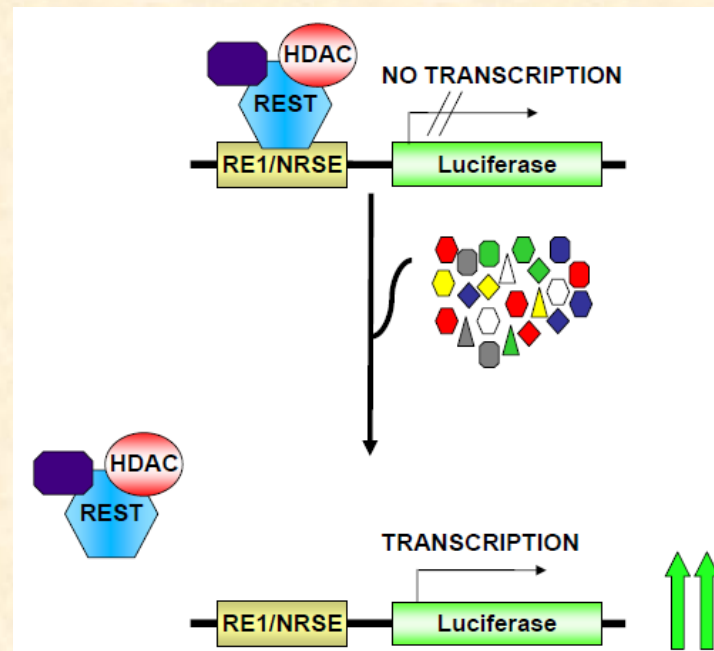
**Melanocyte** *Microphthalmia-associated TF /MITF*

## Транскрипционные факторы, контролирующие метаболизм клетки

- ◆ **MTF-1** **Metal-regulatory Transcription Factor -1**
- ◆ **HIF-1** **Hypoxia-Inducible Factor 1**
- ◆ **ChREBP** **Carbohydrate RE Binding Protein**
- ◆ **SREBP** **Sterol Regulatory Element Binding Protein Sterol RE - 5'-TCACCCCCAC-3'**
- ◆ **CREB** **Cyclic AMP Response Element Binding Protein**  
**ATF-1** **Activation Transcription Factor 1**
- ◆ **SRF** **Serum Response Factor (stays bound to SRE)**
- ◆ **SF-1** **Steroidogenic Factor 1**

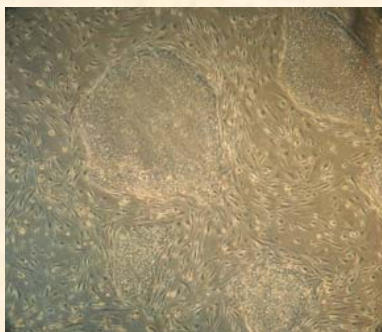
# Пример

При болезни Хантингтона или других нейродегенеративных заболеваниях наблюдается снижение транскрипции генов, контролируемых RE1/NRSE сайленсер. REST кофактор

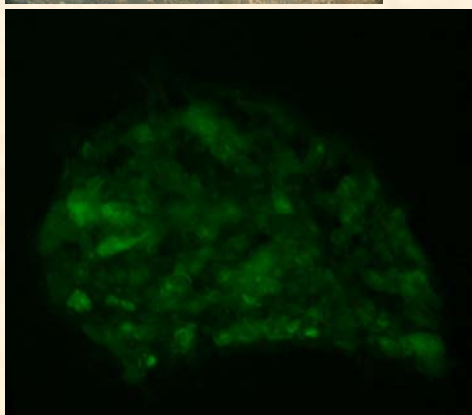


# Единая универсальная платформа специализированных клетки индивидуальных организмов

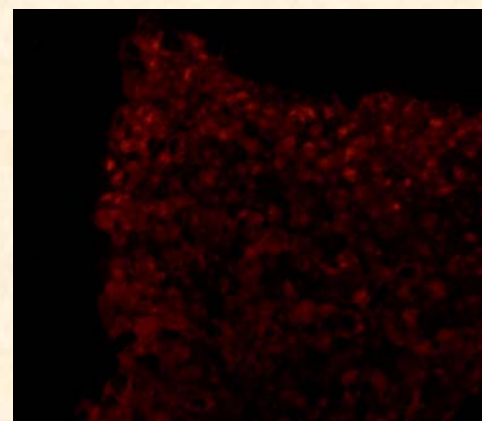
11 базовых линий ЭСК человека (11 индивидуальных организмов), ведущихся в бесфидерных условиях на средах с полностью известным составом и без компонентов животного происхождения



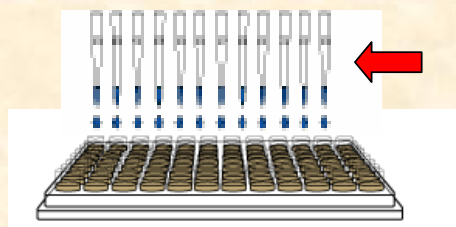
+ генетически модифицированные конструкцией, содержащей 2 пары сайтов гомологичной рекомбинации (lox, frt), позволяющие заменять промоторный участок (CMV на интересующий) или/и репортерный ген (флуоресценции, люминисценции или ген интереса)



+ pCre+pmCherry =

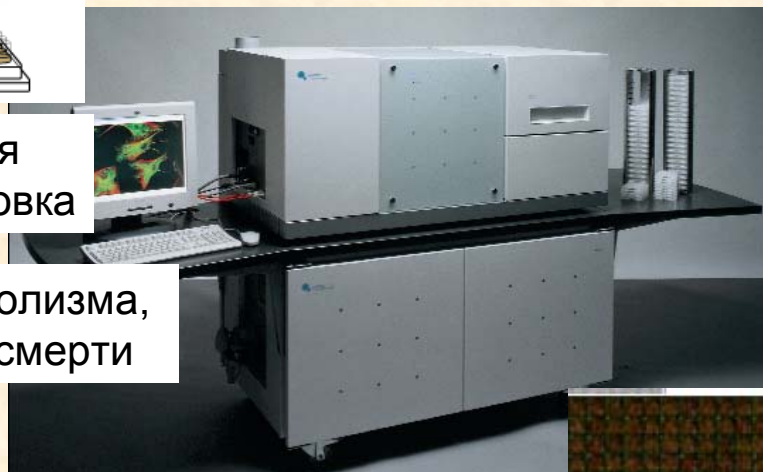


# Принцип высокопроизводительного скрининга



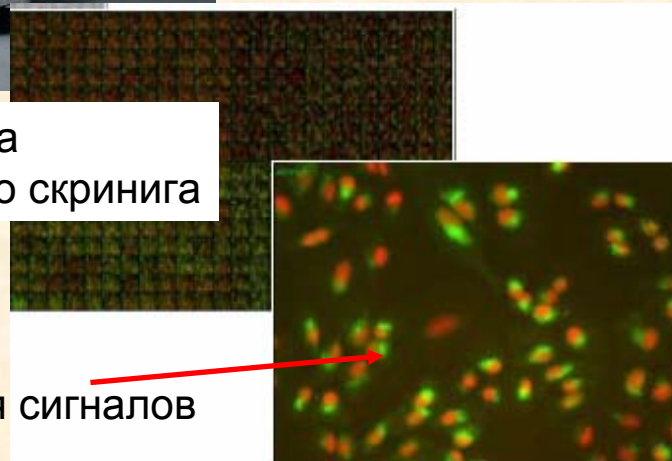
Химические молекулы, факторы, siRNA и др.

- Специфическая дифференцировка
- Репортер метаболизма, пролиферации, смерти



Мультиканальная система высокопроизводительного скрининга

Учитывается суперпозиция сигналов



## Задача 1: анализ свойств клеточных линий с интегрированной репортерной конструкцией

- Способность рекомбинации и экспрессии репортерных генов
- Сохранение функциональной целостности генома

## Задача 2 : технология массового производства

