Скрининг фармакологической активности инновационных лекарственных средств



д.м.н., Макарова М.Н.

Санкт-Петербургский институт фармации

Человек и лекарство, 2015

Когда появился скрининг?

Год	Количество протестированных соединений	Количество лекарств на «выходе»
1910 г.	1200 производных акридина	 Трифловин Риванол Акрихин
1930 г.	16 000 соединений, принадлежащих к различным группам	 Хлорохин Притахин
1966 г.	114 000 соединений	12 потенциальных лекарств 0 реальных лекарств

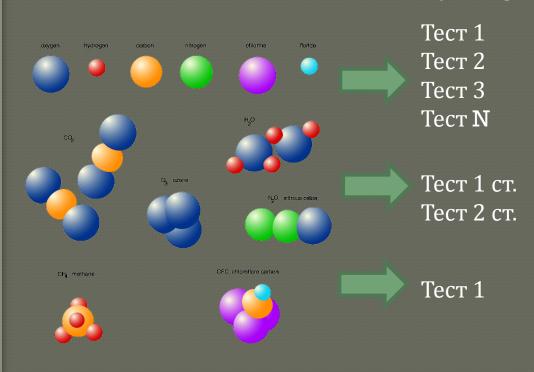
Скрининг (от <u>англ.</u> *screening* — отбор, сортировка) — стратегия научного исследования направленная на выявление фармакологической активности у ряда веществ.

Или еще один термин Хемоинформатика означает совместное использование информационных ресурсов для преобразования данных в информацию и информации в знания для быстрейшего принятия наилучших решений при поиске соединений-лидеров в разработке лекарств и их оптимизации.

Термин Хемоинформатика был введен в употребление Ф. К. Брауном в 1998 г.



Скрининг в фармакологии заключается в экспериментальном выявлении фармакологической активности продуктов химического синтеза и природных соединений. При работе с принципиально новыми рядами химических соединений и при отсутствии информации о фармакологическом действии веществ проводят скрининг для выявления фармакологической активности любого вида с помощью широкого набора специфических тестов. При целенаправленном поиске активных веществ осуществляют скрининг с применением строго определенного набора тестов для оценки каждого класса веществ, например транквилизаторов, антидепрессантов, нейролептиков противосудорожных средств и др. В ряде случаев для выявления фармакологического действия какого-либо одного вида используют скрининг с применением одного метода.



Используемые тесты должны обладать высокой чувствительностью.

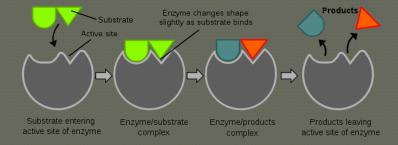
Фармакологическое исследование или скрининг?

Цель скрининга — тестирование большого числа веществ, как правило в 1 дозе. Выявление фармакологической активности у вещества в скрининге позволяет спланировать его дальнейшее изучение, и не изучать вещества не показавшие фармакологической активности.

Фармакологическое исследование	Скрининг
Необходимость большого количества животных в качестве тест-объектов	Как правило, не требуется использование животных
Затрата большого количества исследуемого химического соединения.	Использование веществ микрограммовых или миллиграмовых концентрациях
Ограниченность возможности процесса стандартизации	Высокий уровень стандартизации
Длительность	Непродолжительность
Высокая стоимость	Невысокая стоимость
Тестирование минимум в 3-х дозах	Тестирование в 1 дозе
Низкая вероятность ошибки	Высокая вероятность ошибки
Не позволяет	Позволяет выявить корреляции между структурой и фармакологической активностью вещества

Принципы скрининга:

1



2

Тест «Ингибирование выброса гистамина»

Тест «Связывание с гистаминовым рецептором»

Тест «Ингибирование ГМГ-КоА-редуктазы»

3



Модель бронхиальной астмы на морских свинках

Модель атеросклероза на кроликах

Стандартизация лекарственного средства

Выбор тест системы

- По молекулярным рецепторам, являющимся мишенями для веществ с данными видами активности;
- По принципу надмолекулярной организации и молекулярному составу (близость по структуре);
- По функциональному сходству;
- По органному или тканевому происхождению;
- По близости патологического состояния тест-объекта и реального объекта.

Биохимическая классификация биологических мишеней и их численное соотношение



L. S. Goodman et al., Eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (McGraw-Hill, New York, ed. 9, 1996).

Биомишень - рецептор. Примеры.

Рецептор	Группа лекарственных препаратов
Гистаминовый рецептор	Антигистаминные средства
Альфа и Бета адренорецепторы Ангиотензиновые рецепторы	Гипотензивные средства
Инсулиновый рецептор	Инсулины
Ионотропный α-амино-3-гидрокси-5-метил- 4-изоксазолпропионат- (АМРА) глутаматный рецептор	Противоэпилептические средства
Р2Y ₁₂ -рецептор тромбоцитов	Антиагрегантные средства
Бензодиазепиновые рецепторы ГАМК-рецепторы	Анксиолитики
Рецепторы эндотелиального фактора роста сосудов Рецепторы фактора стволовых клеток	Противоопухолевые
м _{1, 2, 3} -холинорецепторы	м-холинолитики
н-холинорецепторы	Ганглиоблокаторы
И др	

Биомишень – фермент. Примеры.

Фермент	Группа лекарственных препаратов
Ингибиторы циклооксигеназы-2 Ингибиторы липооксигеназа-5	Нестероидные противовоспалительные средства
Ингибиторы дигидрофолатредуктазы	Антиметаболиты (противопухолевые средства)
Ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента	Гипотензивные средства
Ингибиторы H +- K +-АТФ-азы	Противоязвенные средства
Ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы	Антиатеросклеротические средства
Ингибиторы дипептидил пептидазы 4	Гипогликемические препараты
Ингибиторы обратной транскриптазы	Противовирусные препараты прямого действия
Ингибиторы 5-альфа-редуктазы тестостерона	Препараты для лечения доброкачественной гиперплазии предстательной железы
Ингибиторы фосфодиэстеразы-4	Кардиотонические препараты
Ингибиторы фосфодиэстеразы-5	Средства улучшающие эректильную дисфункцию
И др	

Схема изучения инновационного лекарственного средства (на примере средства с гипотензивными свойствами)



Тестируемые объекты (субстанции)

- •Информационный поиск
- •Синтез (например по структурному сходству молекулы или ее части), например, 20-30 объектов
- •Теоретический прогноз активности



Скрининг (субстанции)

- In vitro в тесте «Активность ангиотензин-превращающего фермента»
- In ovo (на хориоаллантоисной мембране) в трех тестах:
 - Влияние на адренергический механизм
 - Влияние на ренин-ангиотензиновый механизм
 - Влияние на синтез **NO**•



Предварительная оценка безопасности (субстанции)

- Острая токсичность цитотоксичность (на клетках мишенях эндотелиоцитах)
- Общая токсичность на уровне целого организма (например, Danio rerio)
- Токсичность для половых клеток (в тесте на подвижность сперматозоидов)
- Оценка мутагенности и генотоксичности (ДНК-комет-тест, микроядерный тест, хромосомные абберации и др.)

Выбор 2-3 субстанций с оптимальным соотношением «Польза – риск»

Схема изучения инновационного лекарственного средства (на примере средства с гипотензивными свойствами)



Исследование фармакологической активности на животных и разработка готовой лекарственной формы

- Тестирование гипотензивной активности (например, SHR)
- Разработка лекарственной формы
- Тестирование гипотензивной активности на альтернативной модели (изадриновая модель, мезатоновая модель)



Оценка общей безопасности на животных (ГЛС)

- Острая токсичность
- Хроническая токсичность



Оценка специфической безопасности на животных (ГЛС)

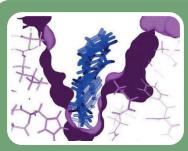
- Репродуктивная токсичность
- Аллергизующие свойства
- Иммунотоксичность
- Мутагенность
- Канцерогенность

Схема изучения инновационного лекарственного средства (на примере средства с гипотензивными свойствами)



Фармакокинетика (ГЛС)

- С разрушением лекарственной формы
- Без разрушения лекарственной формы



Механизм действия (субстанция)

- Возможный поиск дополнительных механизмов действия, например, первичный скрининг показал блокаду α1-адренорецептора, дополнительный поиск механизма действия позволит установить блокаду еще и β1 и 2-адренорецепторов
- Докинг путем молекулярного моделирования



Клинические испытания

1 фаза

2 фаза

3 фаза

Тестируемые объекты (субстанции)

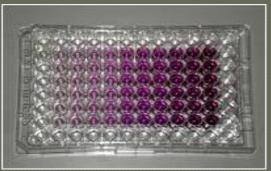
1 3	. ,
Информационный поиск	В ткани гидробионта, региона Баренцево море содержится большое число биологически активных соединений, обладающих противовоспалительными, регенераторными и противоаллергическими свойствами
Синтез /выделение	Выделены из разных тканей морского ежа: T1, T2, T3, T4, T5
Теоретический прогноз активности По составу выделенных БАВ	Т1 – ингибирование ЦОГ 2? Т2 - ингибирование ЦОГ 2? Т3 - ингибирование ЦОГ 2? Т4 – антиаллергическое действие? Т5 - антиаллергическое действие?

Скрининг

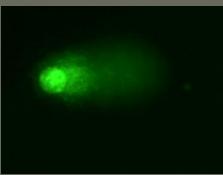
Тестируемый объект	Связывание с гистаминовыми рецепторами	Выброс гистамина тучными клетками	Активность ЦОГ1	Активность ЦОГ 2
T1	87	56	98	87
Т2	97	65	88	44
Т3	27	78	45	65
T4	13	36	82	75
T5	18	15	66	56

Предварительная оценка безопасности (субстанции) – Т2, Т4, Т5









Тестируемый	1
объект	

Острая токсичность цитотоксичность (на клетках мишенях)

На культуре клеток аденокарциномы эпителиоцитов лёгкого человека (A549) Тестирование в 8 концентрациях, 3-параллелях

Общая токсичность – на уровне целого организма

Danio rerio, коагуляция яиц Тестирование в 8 концентрациях, 3параллелях

Оценка мутагенности ДНК-комет-тест

На перевиваемых клетках карциномы протока груди А549 Тестирование в 8 концентрациях, 3- параллелях

T2	Нет	Нет	Нет
T4	Нет	Нет	Нет
T5	Нет	Нет	Нет

 Исследование фармакологической активности на животных и разработка готовой лекарственной формы

Тестируемый объект	Каррагениновый пузырек у крыс (субстанция, раствор, местное применение) (оценка на 6 часов)		
Ключевые параметры оценки	Кол-во лейкоцитов в инфильтрате	Концентрация ТНФ-α в инфильтрате	
Контроль	12±1	389±15	
T2	5±1*	78±9*	
T4	6±1*	502±44*	
T5	8±1	123±21*	

Вывод: 2 тестируемых объекта эффективно уменьшают показатели воспаления при местном применении.

Вопрос: Сохраниться ли эффективность при системном применении, на другой фармакологической модели?

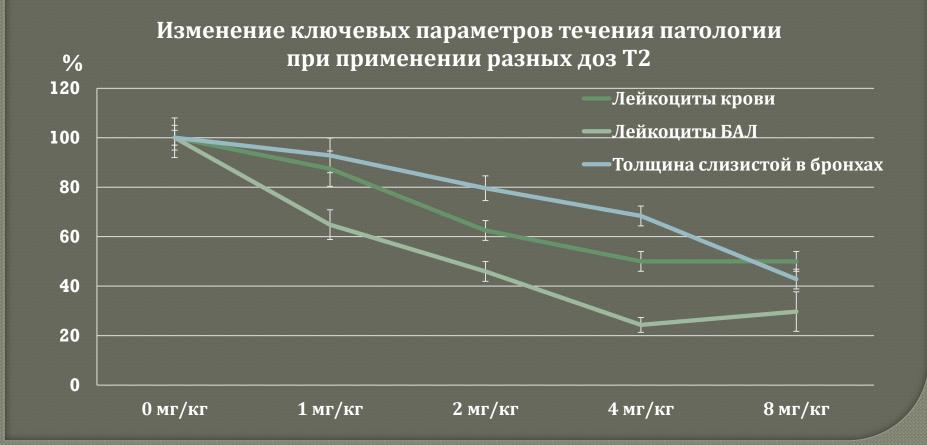
 Исследование фармакологической активности на животных и разработка готовой лекарственной формы

Тестируемый объект	Острый формалиновый бронхит у крыс 2 ГЛФ: Раствор для эндотрахеального применения Раствор для внутримышечного введения		
Ключевые параметры оценки	Кол-во лейкоцитов в крови на 4 сутки	Кол-во бокал. клеток (8 сутки)	Гистологические изменения (8 сутки) в баллах
Контроль	17±2	83±5	15
Т2 эндотрахеально	4±1*	21±9*	3
Т2 внутримышечно	11±2	64±9	14
Т5 эндотрахеально	5±1*	39±6 *	3
Т5 внутримышечно	10±1	86±11	11

Вывод: Оба тестируемых объекта эффективно уменьшают показатели воспаления при местном применении и практически не эффективны при системном применении. Неинвазиный способ предпочтительнее.

Вопрос: Сохраниться ли эффективность на другой фармакологической модели, имеется ли дозозависимость, какова широта терапевтического действия?

Исследование фармакологической активности на животных, тестируемый объект **Т2**. Хронический бронхит у крыс индуцированный сигаретным дымом ГЛФ, раствор для эндотрахеального применения (оценка на 28 сутки)



Исследование фармакологической активности на животных, тестируемый объект **T2**. Бронхиальная астма у морских свинок (ГЛФ, раствор для эндотрахеального применения) (оценка на 21 сутки)



Острая токсичность

Хроническая токсичность

Репродуктивная токсичность

Аллергизующие свойства

Иммунотоксичность







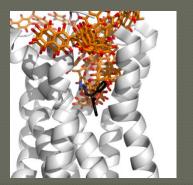




Механизм действия (дополнительный) Сигналинг МАР-киназ

МАР-киназа	Эффект
JNK1	-
JNK2	-
ERK1	-
ERK2	-
p38	+

Связывание с гистаминовым рецептором - докинг



Pozharitskaya O.N., Shikov A.N., Makarova M.N., Ivanova S.A., Kosman V.M., Makarov V.G., Bazgier V., Berka K., Otyepka M., Ulrichova J. Antiallergic effects of pigments isolated from Green sea urchin (Strongylocentrotus droebachiensis) shells // Planta Med. -2013. –Vol. 79. –P. 1698-1704.

Выводы

- Скрининг обязательная и неотъемлемая часть при разработке инновационных лекарственных препаратов.
- Программа скрининга должна формироваться с учетом многих факторов:
 - 1, 2 или более возможных механизмов действия
 - 2. Чувствительность и селективность скрининг-тестов
 - 3. Возможность использования скрининг-тестов для стандартизации лекарственного средства
 - 4. Единство патологических звеньев при скрининге и на фармакологической модели





Спасибо за внимание!

