

*Кафедра органічної хімії Харківського національного  
університету імені В.Н. Каразіна*

# МЕДИЧНА ХІМІЯ

БІОЛОГІЧНІ ВИПРОБУВАННЯ НОВИХ СПОЛУК

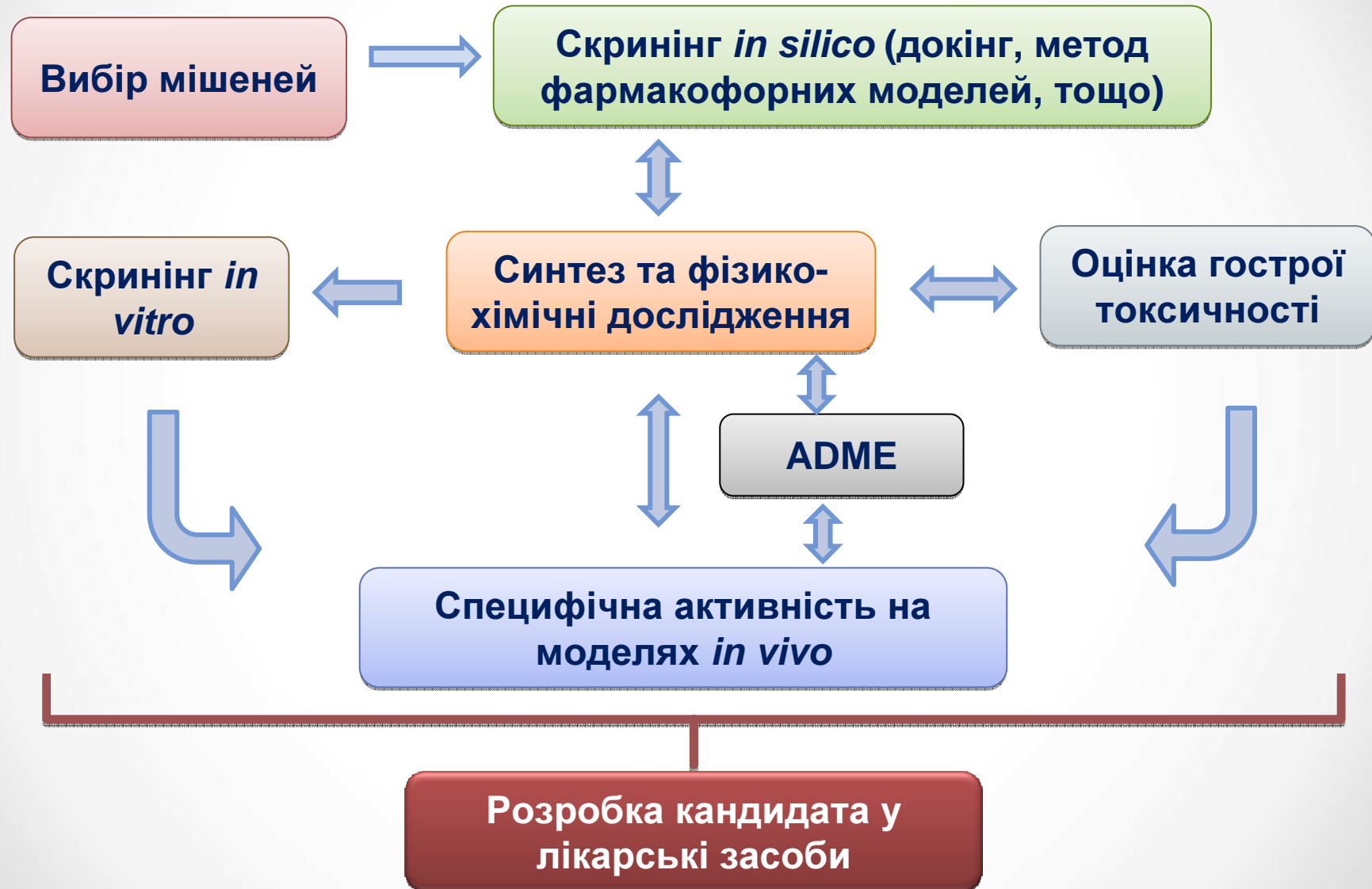
Д.х.н., проф. В.В. Ліпсон



Харків - 2020

# Етапи дослідження інноваційних лікарських засобів

2

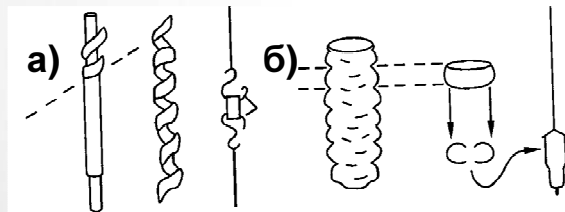


# Дослідження *in vitro*

## Тестування БАР на:

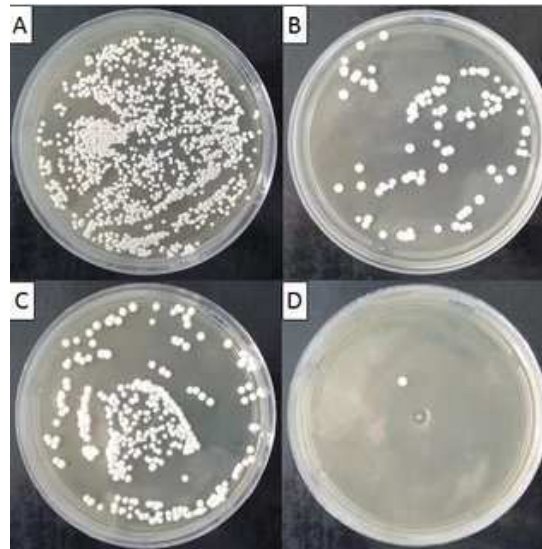
- зразках тканини;
- на ізолюваних клітинах;
- на культурі тканини;
- на гомогенатах;
- на клітинних мембранах

## Препарати гладкої м'язової тканини

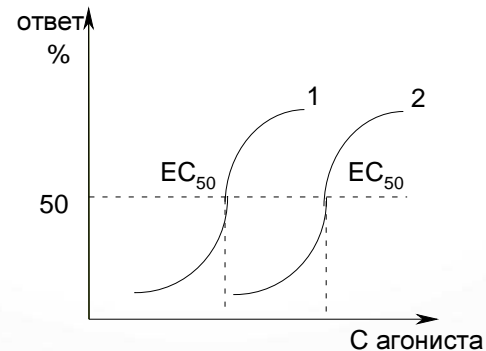


а) судина; б) трахея

## Оцінка антибактеріальних властивостей БАР



## Визначення $EC_{50}$ ( $ED_{50}$ )

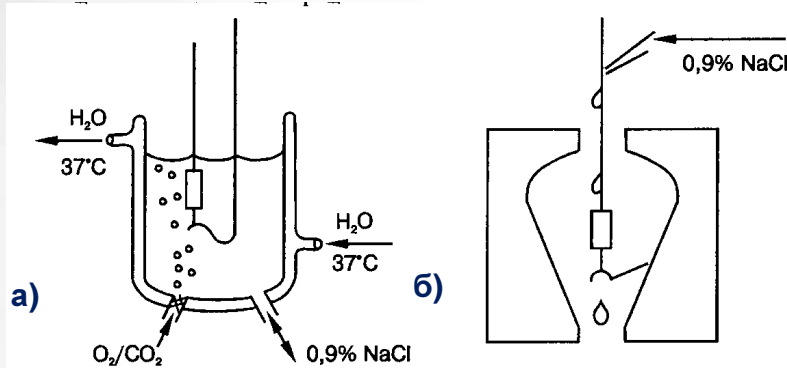


Пауль Ерліх  
1854-1915  
Нобелівська премія  
з фізіології або медицини  
1908 р.

Залежність «доза-відповідь»  
для БАР (2)  
та препарату порівняння (1)

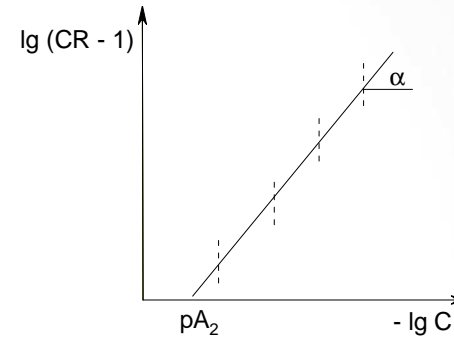
# Дослідження *in vitro*

## Способи розміщення зразка тканини в експериментах *in vitro*



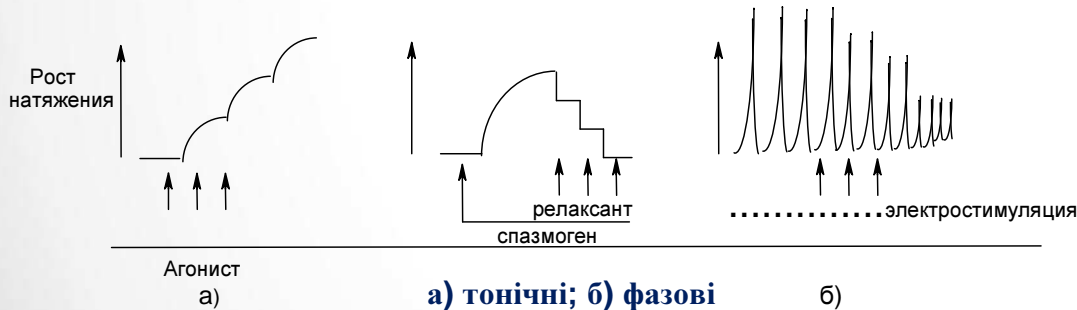
а) у сосуді; б) у камері

## Залежність $\lg(CR-1)$ от $-\lg C$



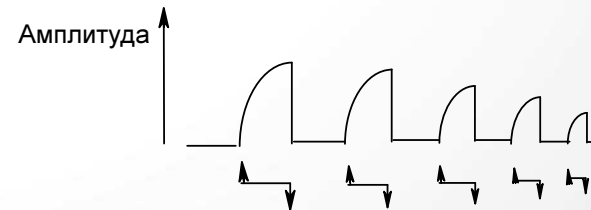
**CR** – концентраційне співвідношення, **C** – концентрація антагоніста

## Види скорочень зразка м'язової тканини

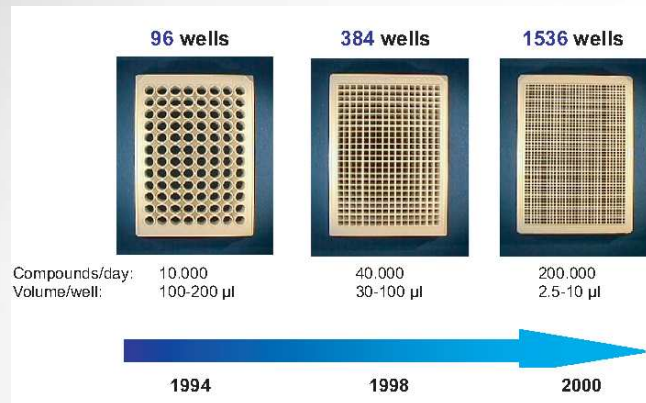


а) тонічні; б) фазові

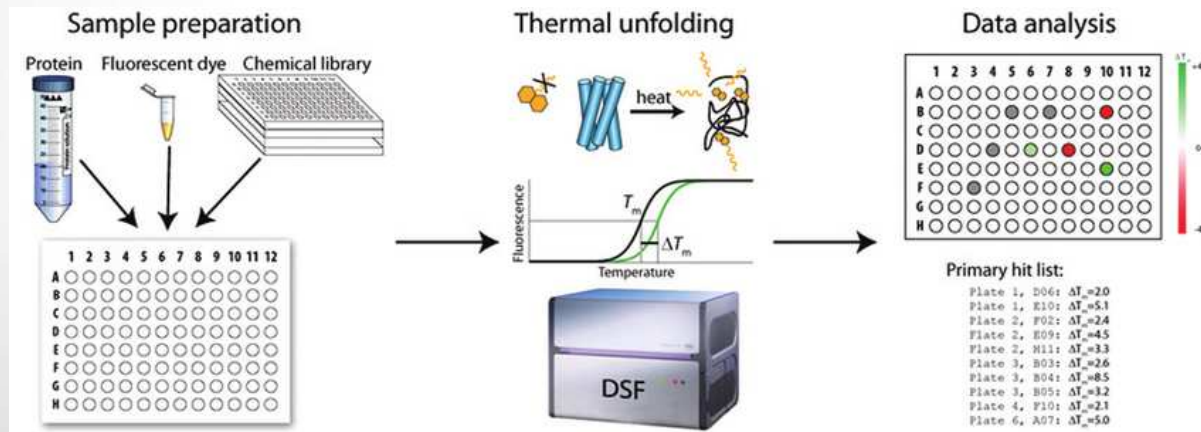
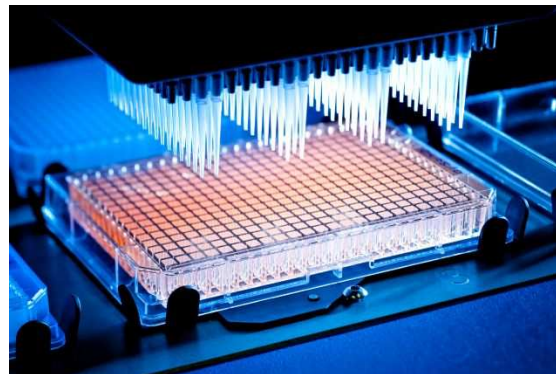
Поступове зниження амплітуди скорочення м'язу при повторному введенні агоніста



# Технології *high-throughput screening*

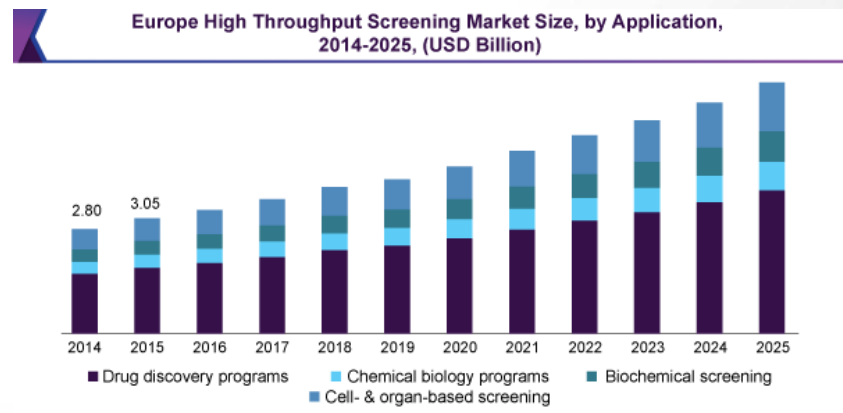
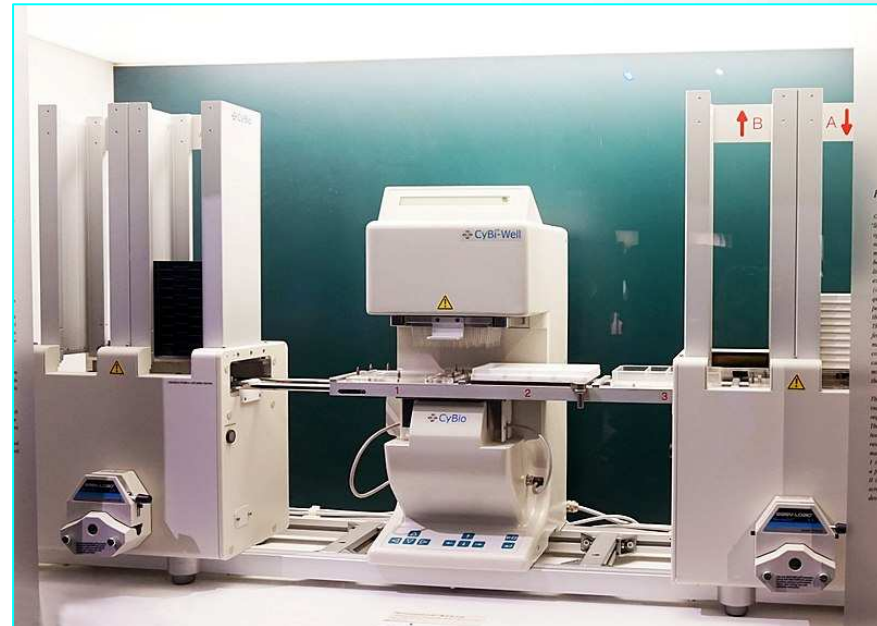
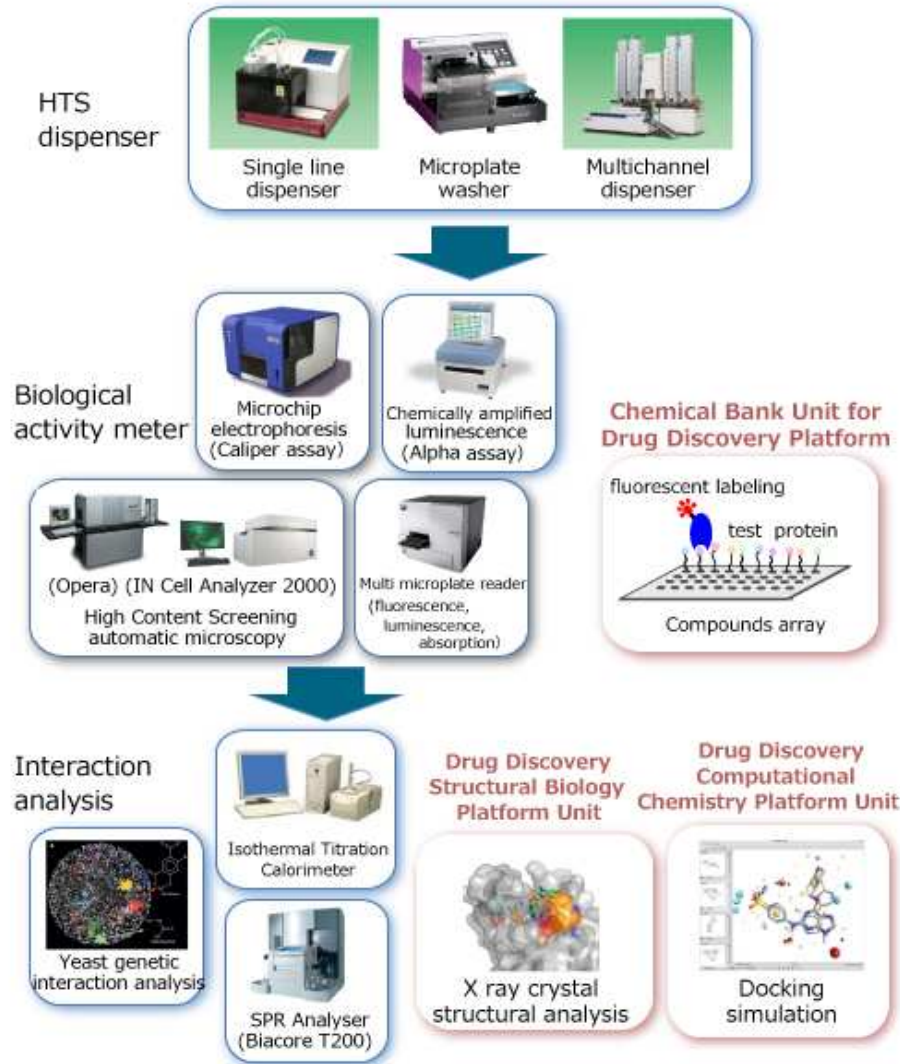


**96** - 100-300  $\mu$ кл  $\sim 10^{-9}$  M  
**384** - 25-100  $\mu$ кл  $\sim 10^{-10}$  M  
**1536** - 2-10  $\mu$ кл  
**96000** - 0.2  $\mu$ кл



# Технології *high-throughput screening*

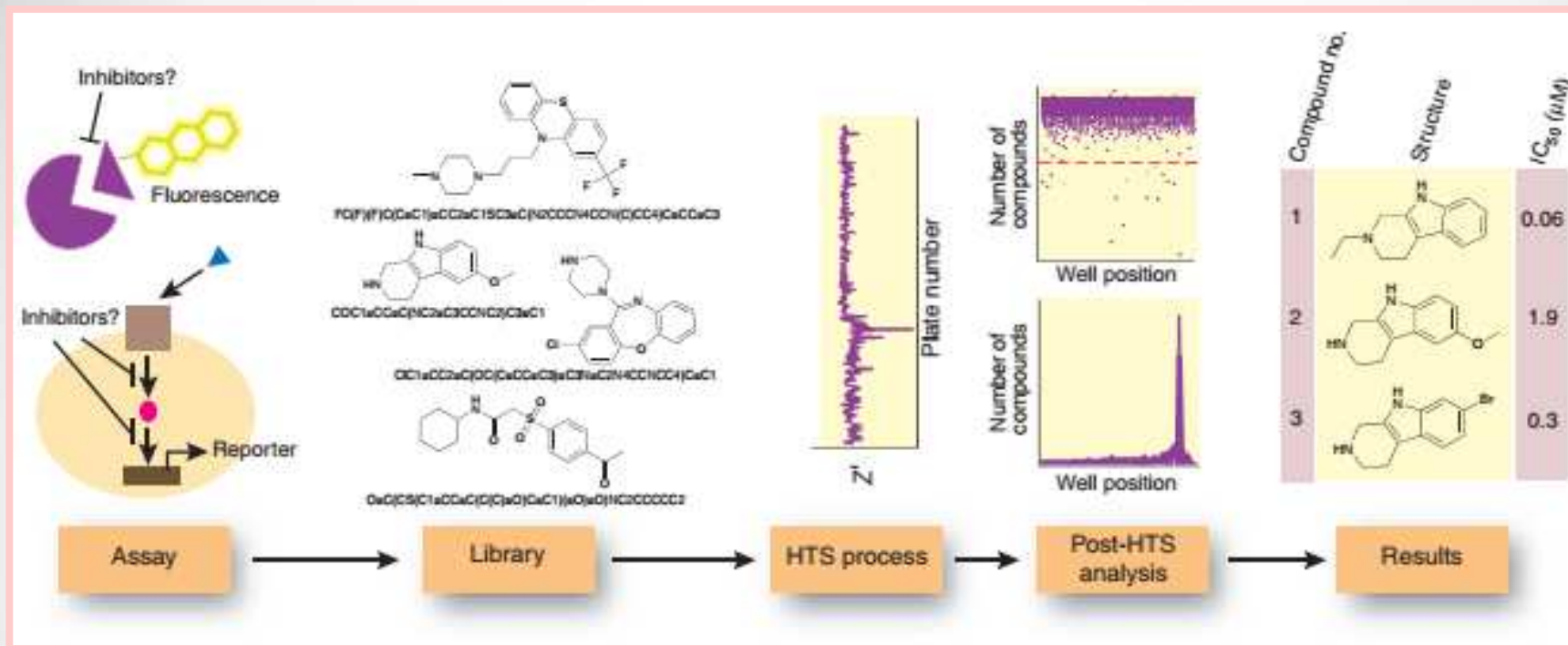
## Seed Compounds Exploratory Unit for Drug Discovery Platform



## Assay methods for HTS

Assay types	<i>In vitro</i> biochemical assay	Cell-based assay	
		Target-oriented assay	Phenotypic assay
Targets	Enzymes, Receptors, Protein/protein interaction, etc	GPCRs, Receptors, Ion channels, Nuclear hormone receptors, Protein/protein interactions, Signaling pathways, etc	Morphology, localization, numbers, and intensities of cells, organelles, cellular structures, and molecules
Methods	Absorbance, Fluorescence Intensity, Fluorescence Polarization (FP), Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), Time-Resolved FRET, AlphaScreen/Alpha LISA, Mobility Shift Assay (MSA)	Reporter assay (Luciferase, SEAP etc), Cell imaging (In cell FRET, Fluorescent proteins, Immunostaining), Yeast system, FLIPR/FDSS (Aequorin, Ca <sup>2+</sup> sensor, other sensors), Split luciferase complementation, etc	Cell imaging (Fluorescent proteins, Organella-specific staining, Immunostaining)

# Скринінг комбінаторних бібліотек



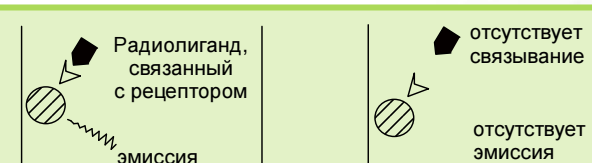
James Inglese, Caroline E Shamu & R Kiplin Guy

VOLUME 3 NUMBER 8 AUGUST 2007 NATURE CHEMICAL BIOLOGY

## Принцип сцинтиляційного детектування комбінаторної бібліотеки

- а) сцинтилятор зв'язаний з полімерною гранулою;
- б) сцинтилятор розташований у дні мікрокувети

а)

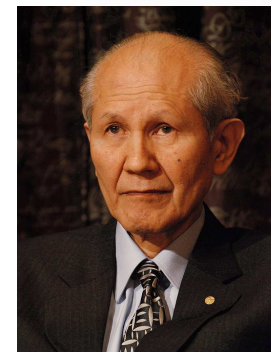
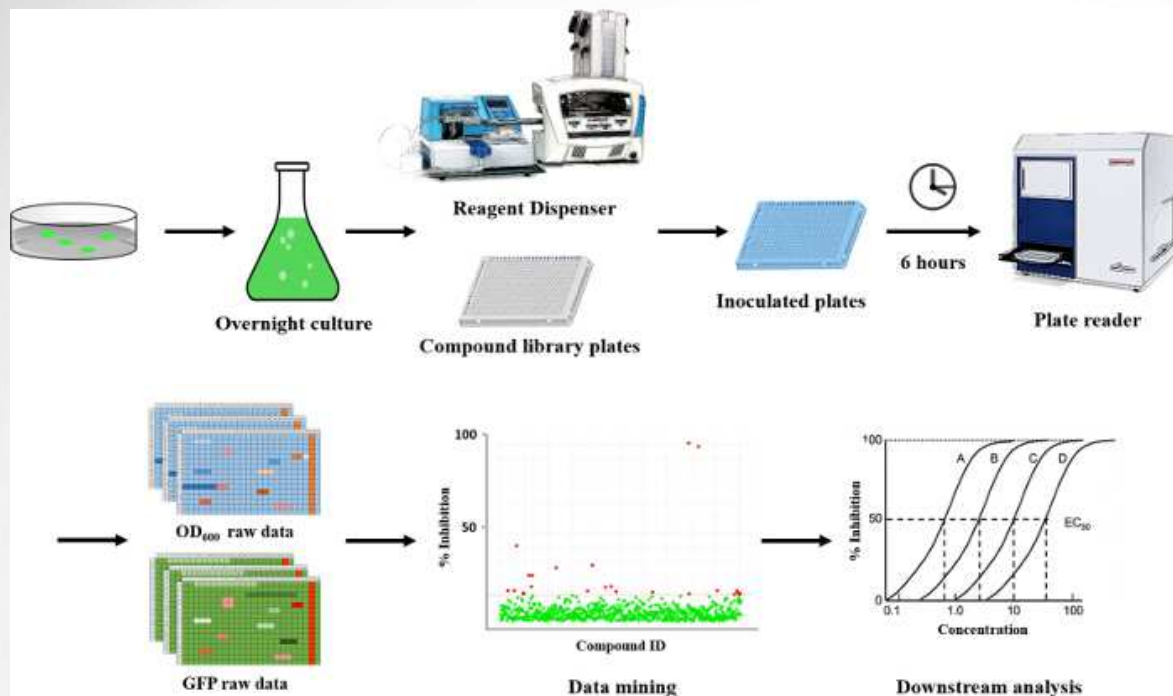


б)





# Скринінг комбінаторних бібліотек

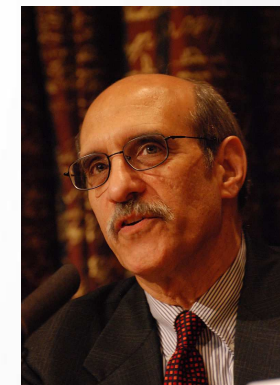


Осаму Сімомура  
1928-2018



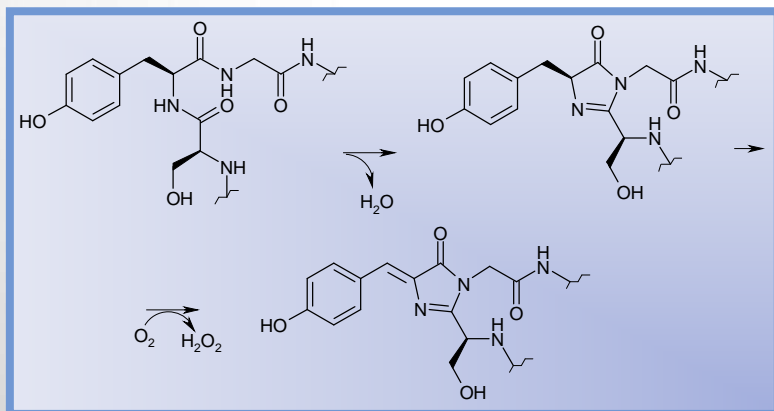
Роджер Тсієн  
1952-2016

Нобелівська  
премія  
з хімії 2008 р.



Мартин Чалфі  
1947

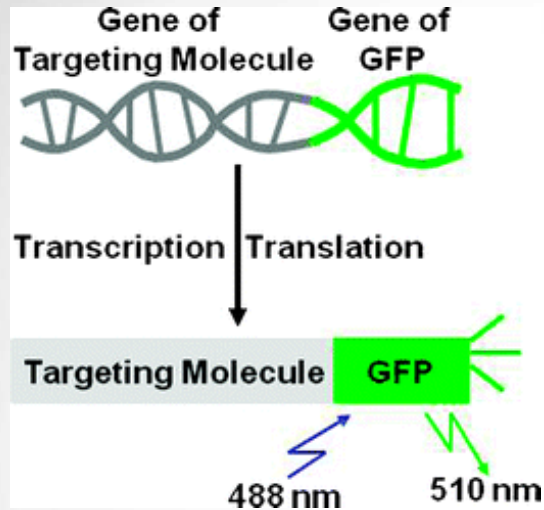
GFP (green fluorescent protein)



*Aequoria victoria*

## Використання GFP у скринінгових дослідженнях

10



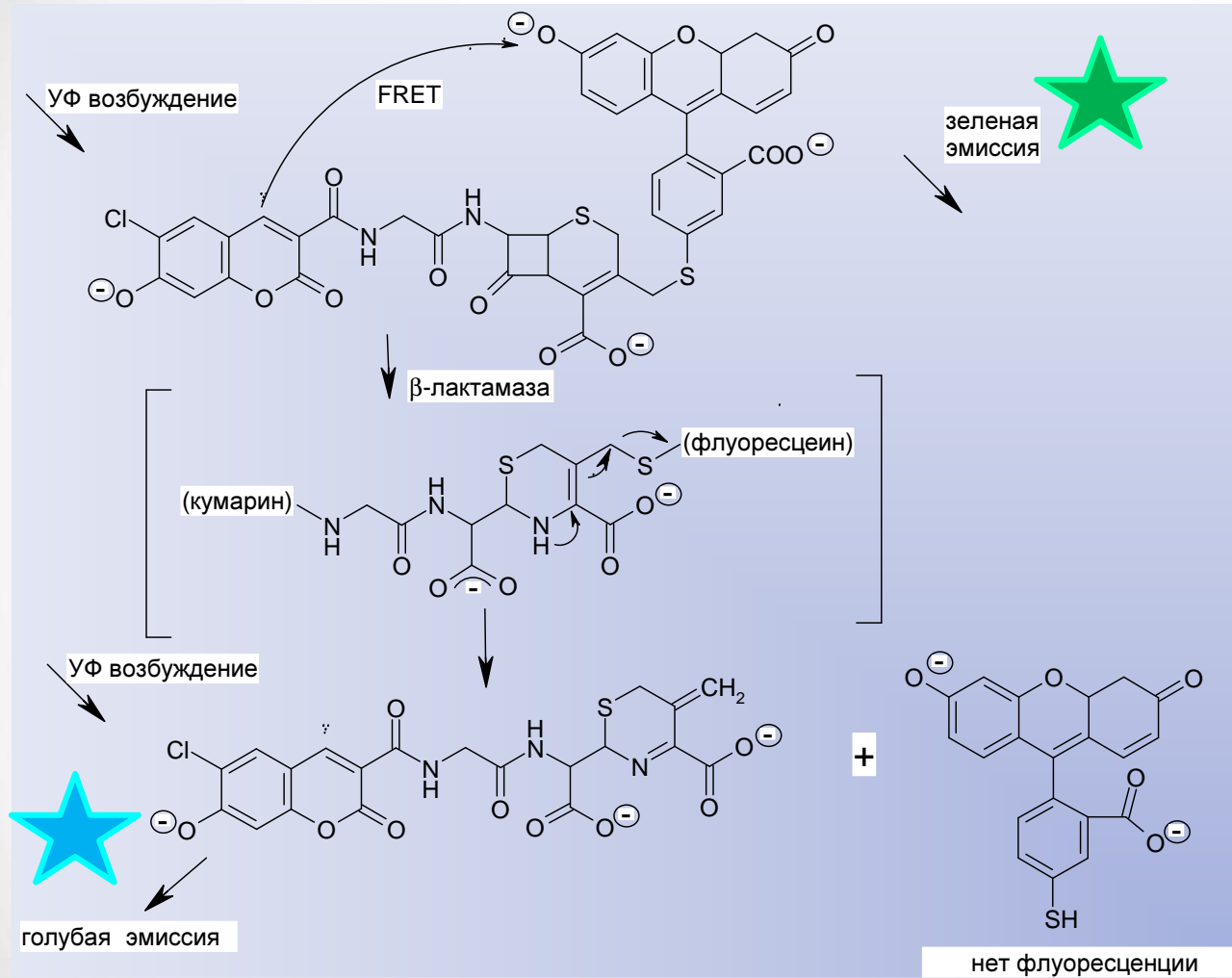
Спектральні характеристики GFP та мутантних флуоресцентних білків

Мутація	$\lambda_{\text{exc}}$ , нм	$\lambda_{\text{em}}$ , нм	Коефіцієнт екстинкції $\epsilon$ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Примітка
відсутня	395 / 475	508 / 503	21000 / 7150	GFP
S65T	488	511	39200	«яскравий GFP»
Y66H	383	447	13500	«блакитний GFP» або BFP
T203Y/S65G/ V68L/S72A	512	527	36500	«жовтий GFP» або YFP

Порівняння методик оцінки активності ЛЗ по відношенню *Micobacterium tuberculosis* з використанням GFP та радіолігандного дослідження в апараті BACTEC 460

Препарат	$\text{IC}_{90}$ , мкг/мл (BACTEC 460)	$\text{IC}_{90}$ , мкг/мл (GFP)
Рифампіцин	0.01	<0.01
Ізоніазид	0.01-0.05	0.01-0.05
Капреоміцин	2.5	2.5
Офлоксацин	1.0-2.0	0.5-1.0
Кларитроміцин	0.5-2.0	0.5
Амікацин	2.5	2.5

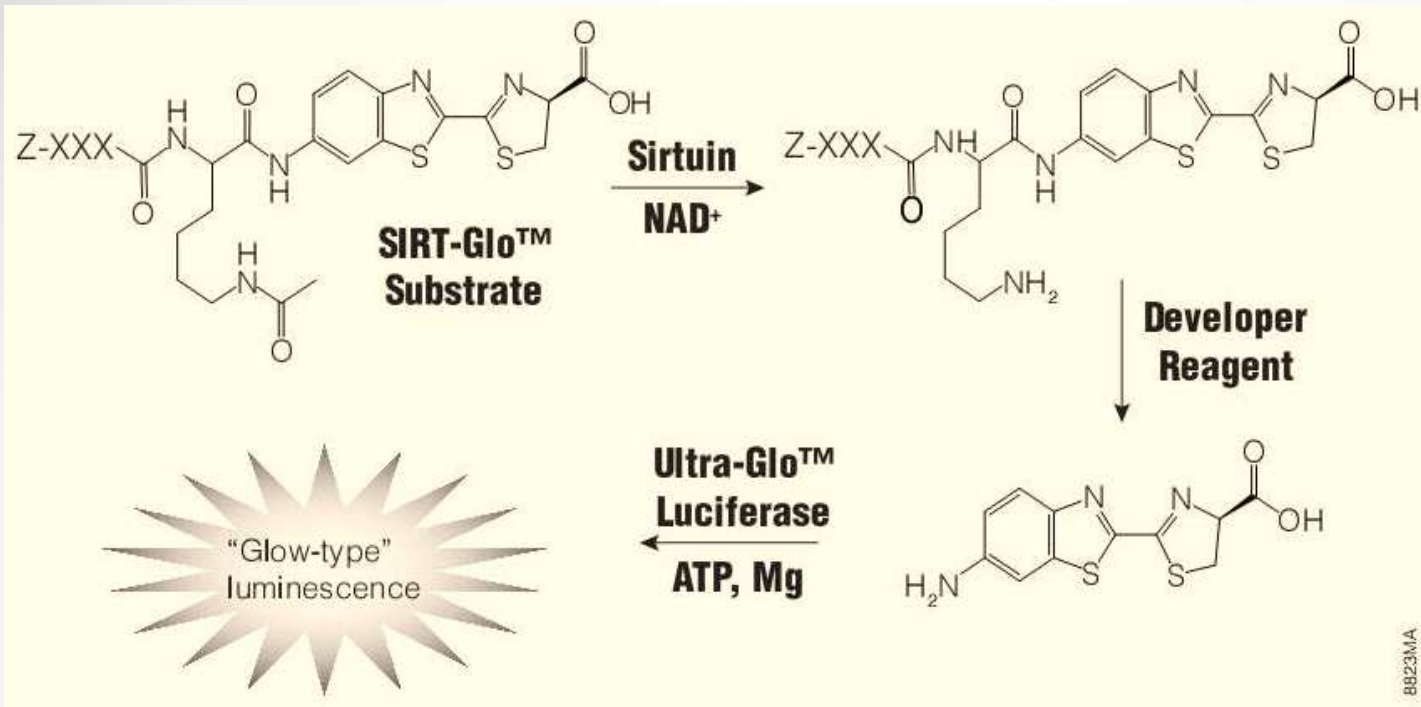
# Дослідження експресії β-лактамаз з використанням FRET-методики



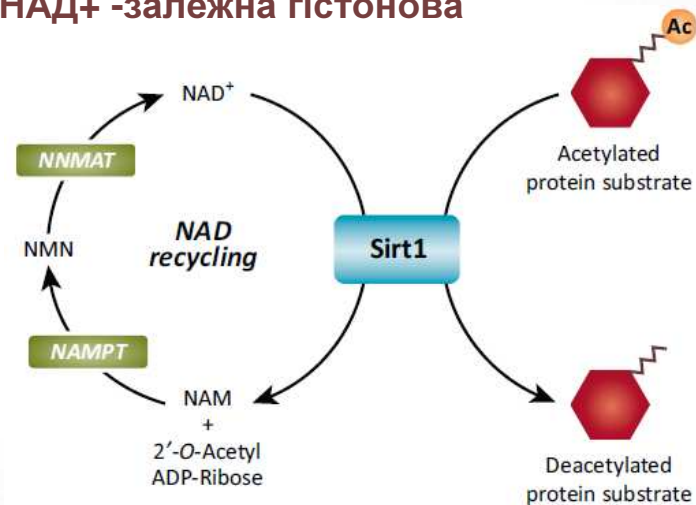
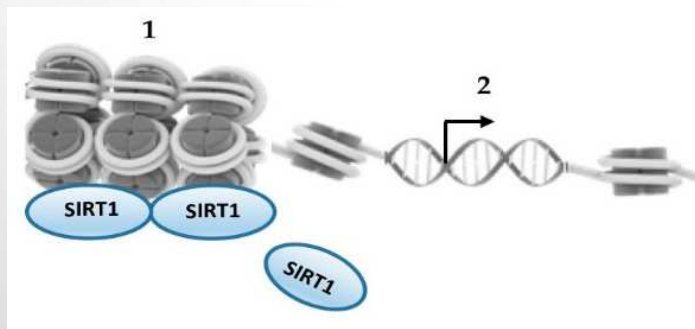
(FRET- fluorescent resonance energy transfer)

# HTS потенційних лігандів SIRT1

12

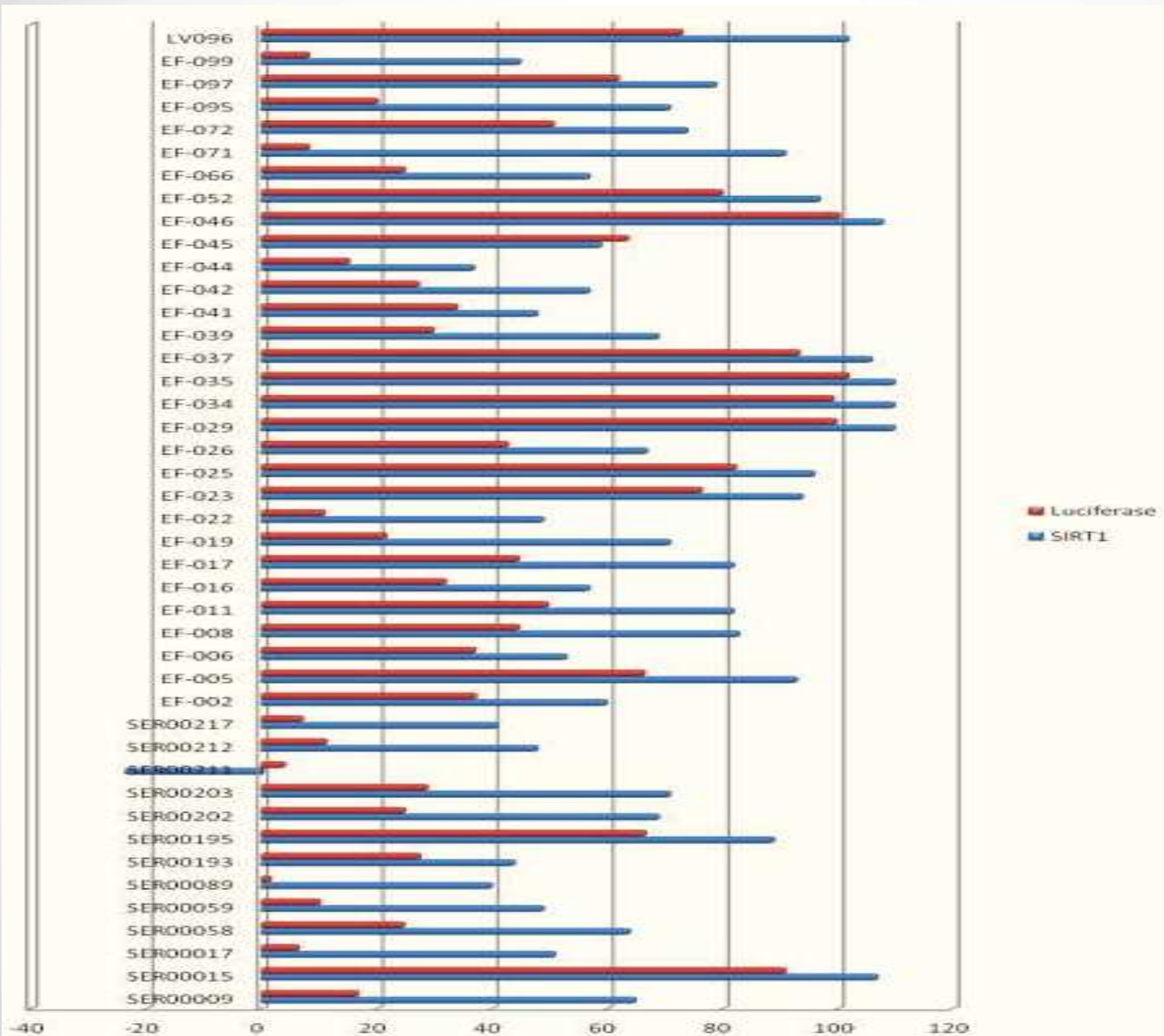


**SIRT1 (Silent Information Regulation 2 proteins) – НАД<sup>+</sup> -залежна гістонова деацетилаза**

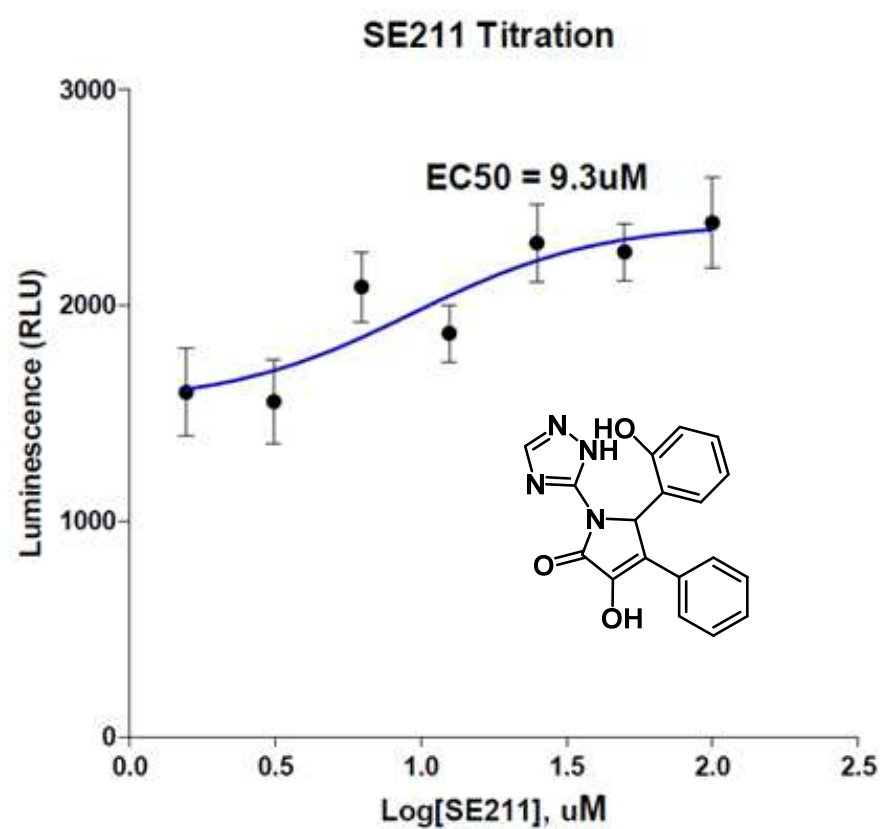
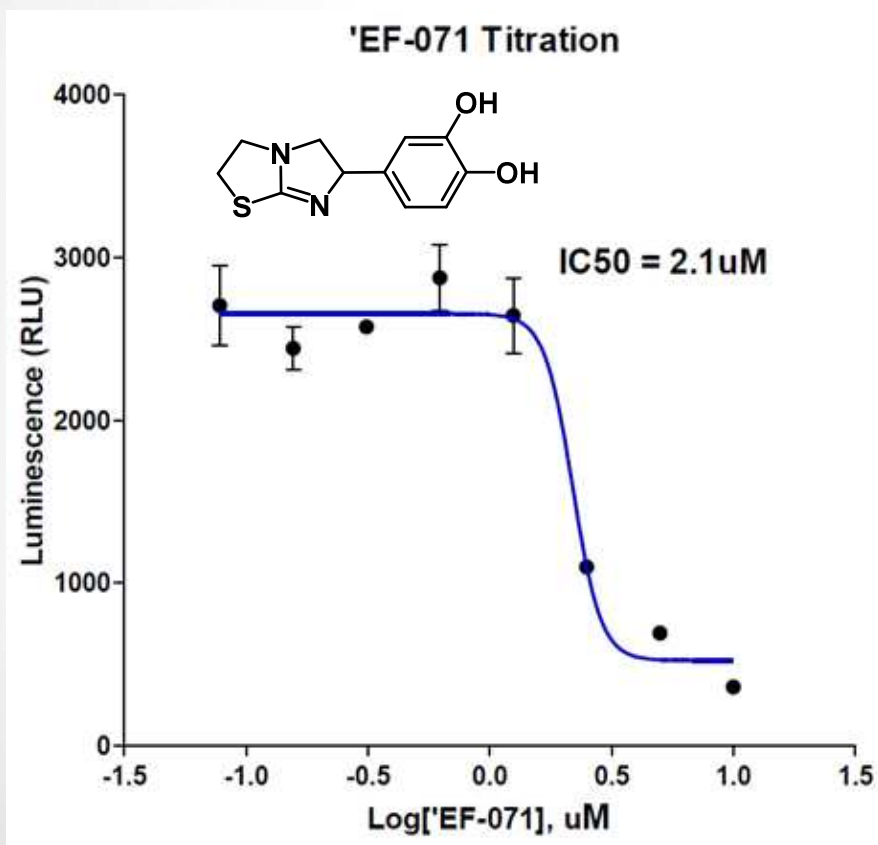


## Результати скринінгу

13



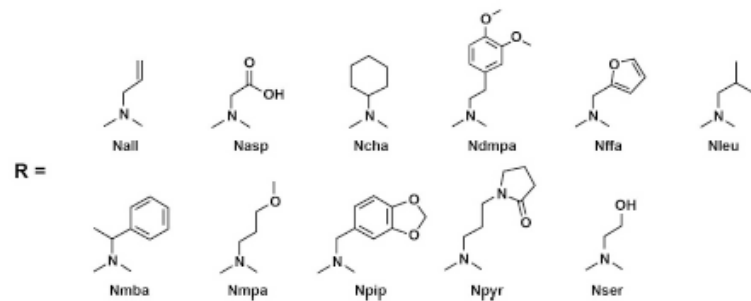
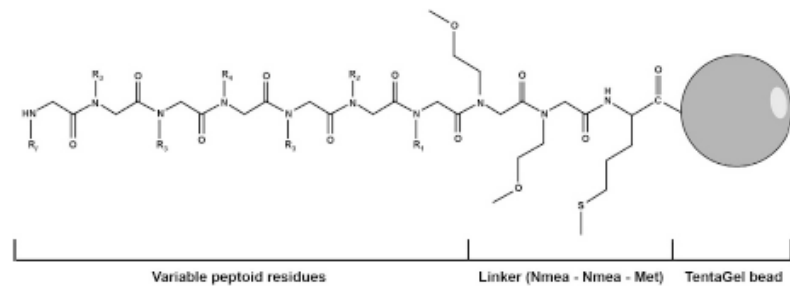
## Залежність “доза – відповідь” для інгібітора та активатора SIRT1



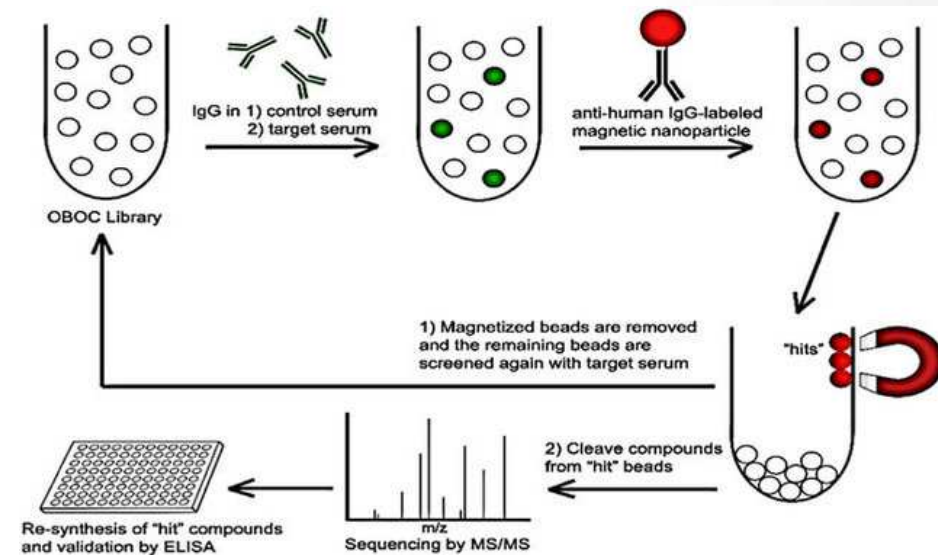
# On-bead magnetic screening

## A Search for Blood Biomarkers for Autism: Peptoids

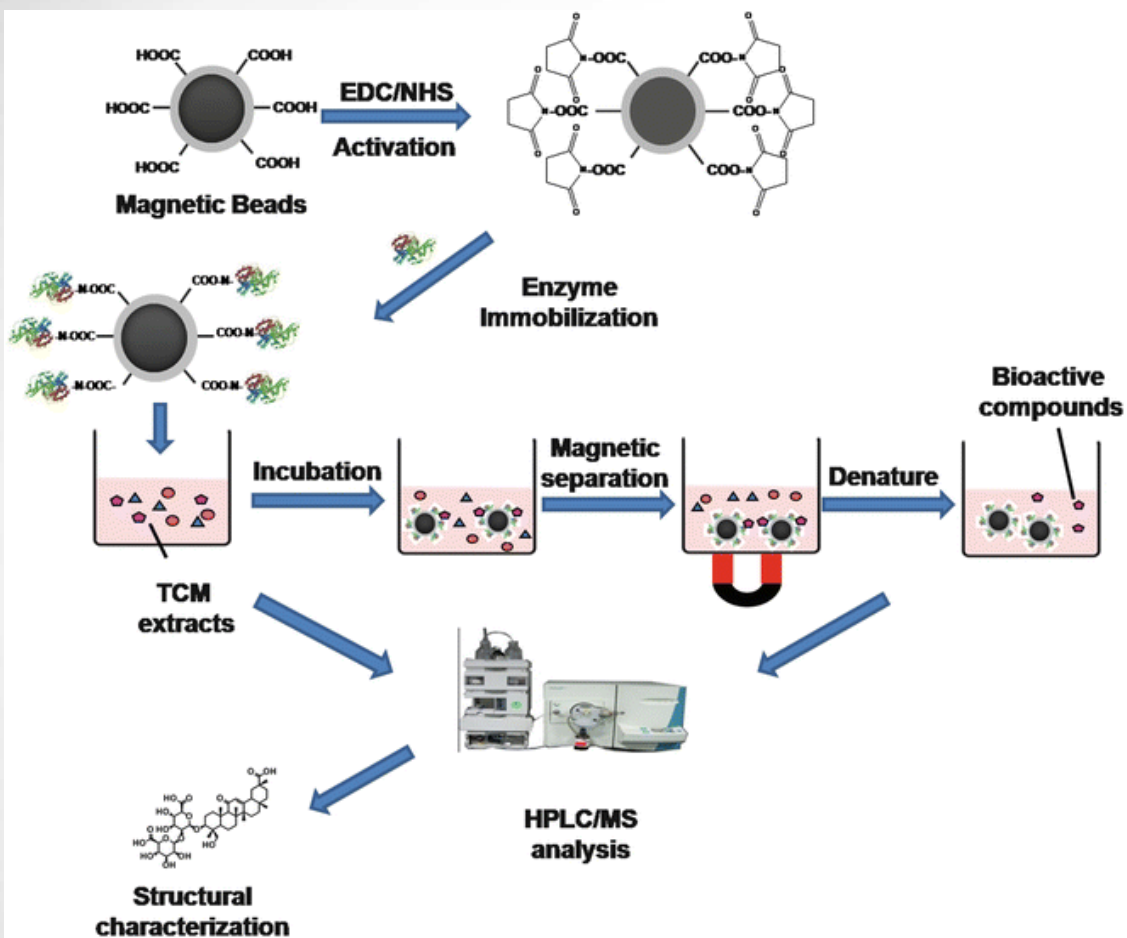
/ Sayed Zaman et al. [www.nature.com/scientificreports](http://www.nature.com/scientificreports) DOI: 10.1038/srep19164/



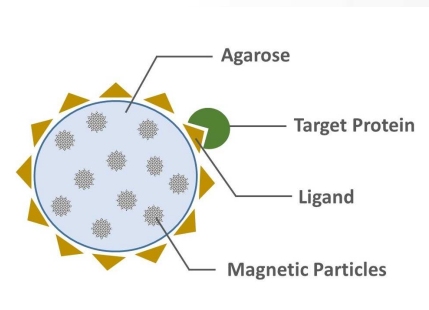
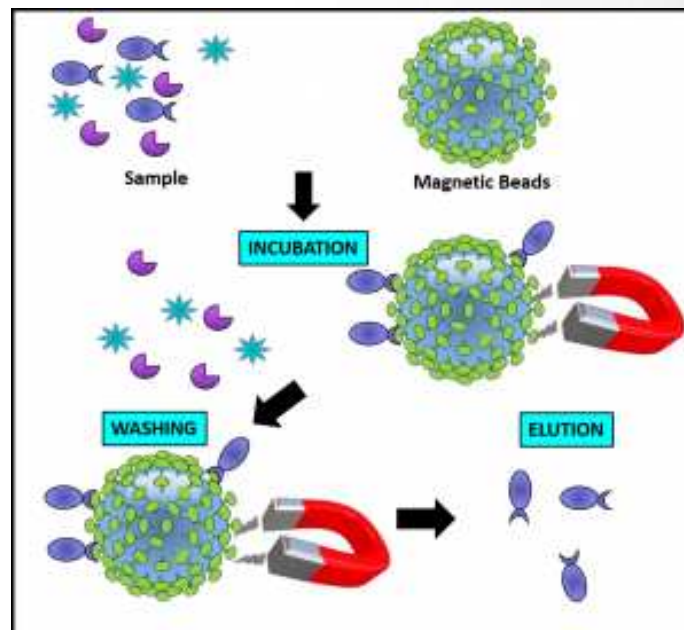
### Peptoid library



# On-bead magnetic screening

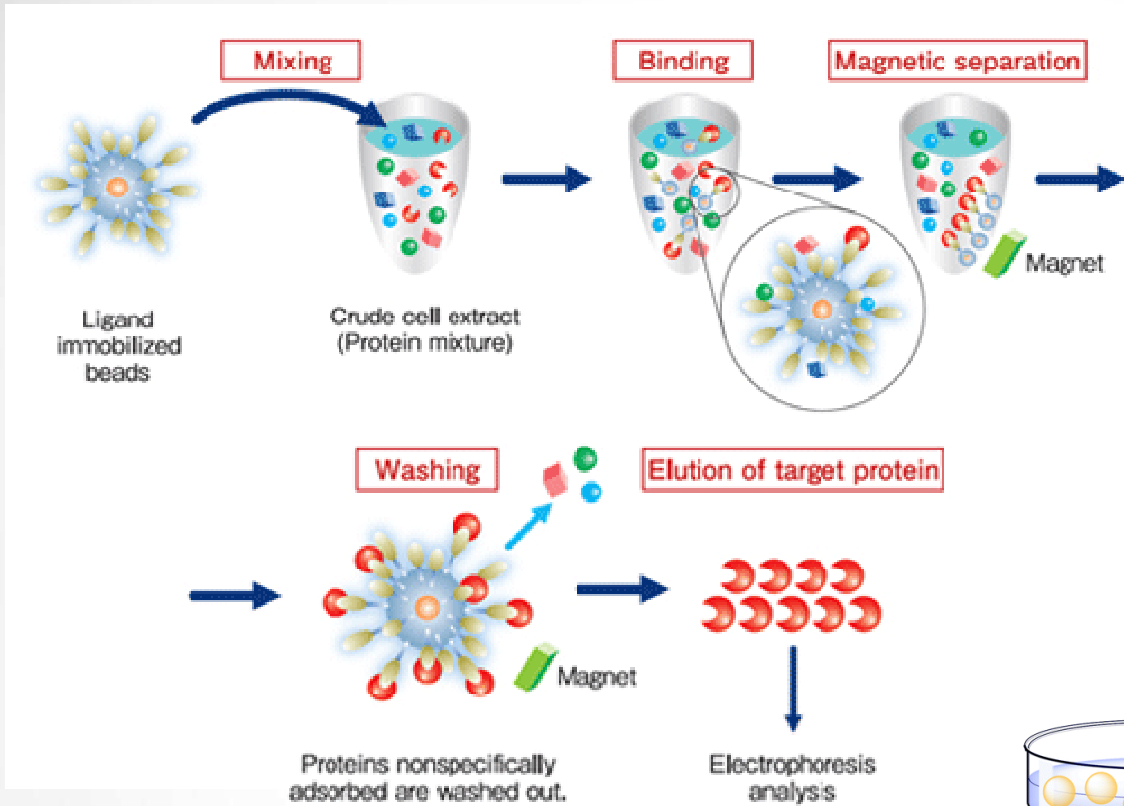


## How to easily purify your protein with adapted magnetic beads

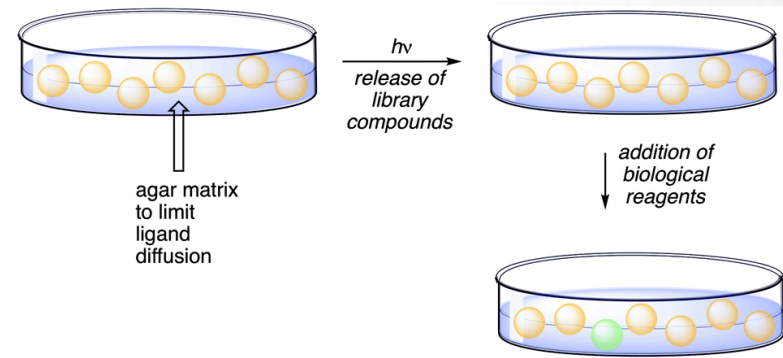




# On-bead magnetic screening

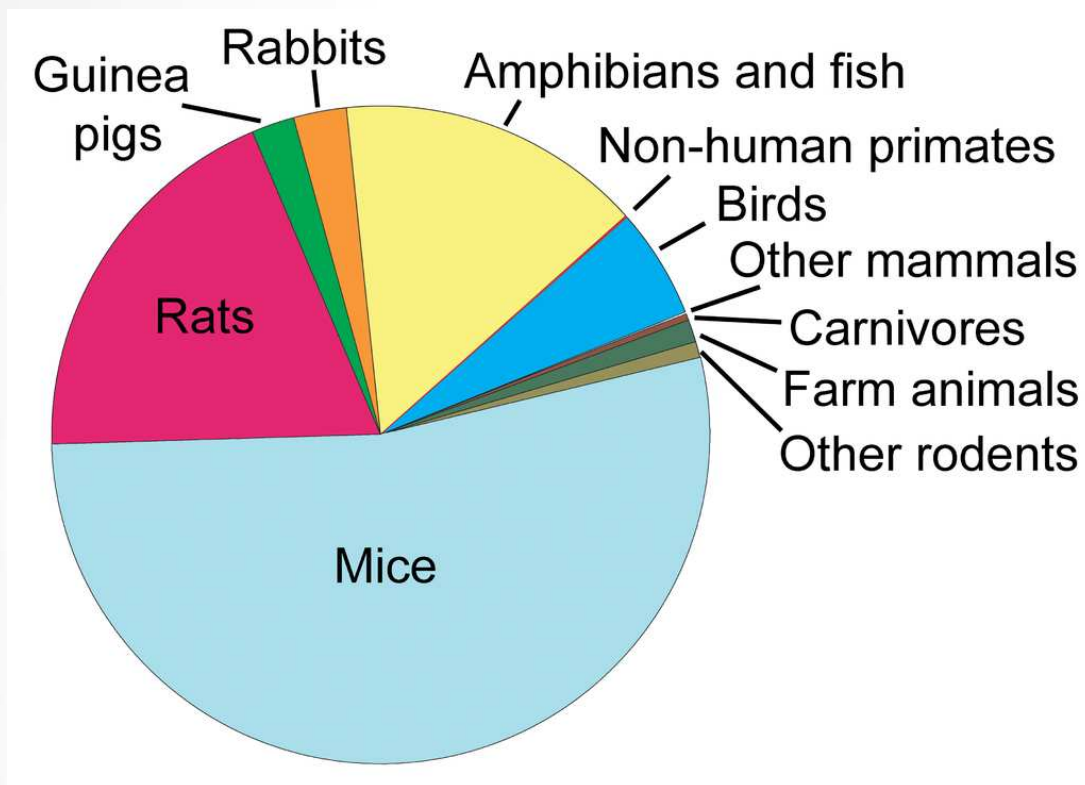


## Off-bead-дослідження



## Дослідження на лабораторних тваринах

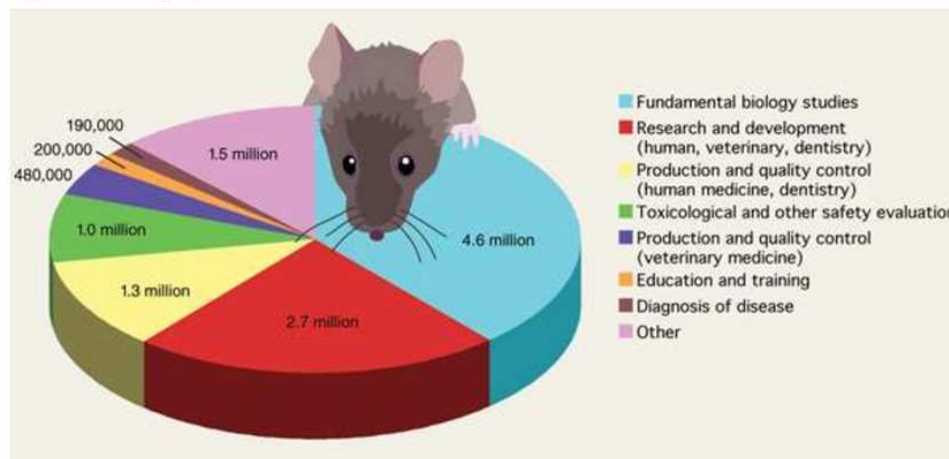
18



Кількість хребетних, які були використані у дослідженнях в Європі у 2005 р. (всього більш ніж 12 млн тварин)



## Эксперименты на животных проводятся в 4 основных областях:



- 65 % - тестирование лекарств
- 26 % - научные исследования
- 8 % - косметика
- 1 % - учебный процесс

## *Дослідження на анестезованих тваринах*

**Переваги:** дозволяють вивчати різні шляхи введення БАР;  
вимірювати велику кількість параметрів;  
створювати за необхідності великі експериментальні групи

**Недоліки:** неможливість оцінити поведінкові реакції;  
тривала анестезія може вплинути на властивості БАР

Вивчають залежність “доза – відповідь” для агоніста при різних режимах введення до одержання відтворюваного результату

## *Дослідження на інтактних тваринах та на тваринах з моделями захворювань*

На інтактних тваринах вивчають специфічну дію сполуки-лідера та проводять токсикологічні дослідження.

Моделі захворювань відтворюють з метою вивчення специфічної дії сполук. Моделі бувають генетично детерміновані або хімічно індуковані.

НПЗС – “ацетатні корчі”, “карагеніновий набряк”, наркотичні анальгетики – “гаряча платівка”

# Трансгенна модель метаболічного синдрому та ЦД 2 типу

## Fatty rat

- Zucker fatty rat
- Most widely used
- Autosomal recessive
- Fa/fa homozygous
- Obese by 3-5 weeks age



**Спостерігається:** гіперліпідемія; гіперхолестеринемія; інтолерантність до глюкози; гіперінсулінемія

