

Ветинформатика

Поиск среди мишеней-киназ человека перспективных молекул-мишеней для животных



Описание проблемной ситуации

Современная разработка лекарств устроена весьма сложно, и единого универсального подхода, который гарантированно принесёт успех, нет. Если кратко описать процесс, то начинается он с поиска идей, а, точнее, молекул (как правило, белков), воздействуя на которые мы сможем достигнуть терапевтический эффект.

Например, если мы сможем подавить или полностью ингибировать работу некоторых ферментов, то получим таким образом необходимый терапевтический эффект. Точно так же можно **таргетно** воздействовать только на одну молекулу, сводя к минимуму нежелательные эффекты от такой терапии, а самое главное, упростив поиск и разработку такой молекулы. Поиск такой молекулы-мишени — задача крайне нетривиальная: должна быть понятна её роль в патологии, известны последовательность белка и гена и их кристаллические структуры. Тогда можно использовать современные подходы **драг дизайна**, начав подбор молекулы с помощью моделирования (докинга), сократив таким образом стоимость и сроки разработки.

Один из популярных классов таких мишеней — **белки киназы**.

Это ферменты, которые фосфорилируют белок-мишень по определённой аминокислоте (например, тирозинкиназы фосфорелируют тирозин) и часто играют ключевую роль в **сигналинге**, то есть в передаче сигнала внутри и снаружи клетки.

Всего у человека киназ не так много (порядка 500), и далеко не все из них **рассматриваются** как мишени для разработки малых молекул — ингибиторов. Тем не менее, это достаточно перспективная область для исследователя и привлекает **интерес** фармкомпаний. И хотя не каждый ингибитор превращается в лекарство,

такой подход привёл к появлению большого количества инновационных лекарственных препаратов. Например, **препарат иматиниб** — селективный ингибитор мутантной тирозинкиназы BCR-ABL. Эта киназа возникает в результате мутации, которая часто обнаруживается при хроническом миелолейкозе и остром лимфобластном лейкозе.

Ученые, разрабатывающие этот препарат, провели скрининг большого количества малых молекул и обнаружили среди них наиболее активные, то есть способные подавлять активность этой тирозинкиназы, а затем модифицировали молекулу так, чтобы она стала более безопасной и эффективной.

Иматиниб стал первым поколением препаратов против BCR-ABL.

Затем на его основе были разработаны другие молекулы с лучшими свойствами, полученные в том числе с применением рационального драг дизайна. После получения молекулы кандидата она должна пройти последующие стадии разработки лекарства, в том числе доклинические и клинические исследования, которые не факт, что закончатся успешно.

Это зависит от многих факторов, которые не всегда **возможно проработать**, тем не менее такие провалы стоят дорого, и многие компании заинтересованы в том, чтобы их избежать.

Для этого можно подойти к поиску мишени с другого конца: найти уже существующий препарат и сделать похожую молекулу, которая не будет попадать под патентные ограничения и будет немного лучше оригинала. Такой подход часто называют me to препарат, и, несмотря на очевидное упрощение процесса, это вполне работающий подход, который применяют многие

Описание проблемной ситуации

русские и зарубежные компании. Но, помимо очевидных ограничений, поиск мишени для разработки такого препарата тоже очень непростая задача: надо быть уверенным, что для данной мишени нет слишком много уже существующих ингибиторов, мы сможем синтезировать похожие молекулы, которые будут не хуже молекулы-прототипа.

Однако всё вышеописанное верно для человека, под мишенями имеются в виду белки человека, и интересны для разработки в первую очередь те мишени, которые связаны с заболеваниями человека, имеющими широкое распространение.

В ветеринарии такой подход используют не очень часто: разработка оригинального препарата стоит очень дорого, и имеет все риски разработки препаратов для человека. Мало кто готов вложиться в это без гарантии успеха. Несмотря на то, что регистрация ветеринарного препарата проще и не требует длительных и дорогих доклинических и клинических испытаний, для животных (особенно домашних) часто назначают препараты человека, которые хорошо проявляют себя на практике.

Тем не менее, существуют подходы, позволяющие рационализировать и структурировать этот процесс, определить, какие препараты подходят для назначения животным (с максимальной эффективностью и минимальными побочными эффектами).

Для этого даже придуман специальный термин [vetinformatics](#), или ветинформатика, то есть совокупность *in silico* методов, направленных на улучшение этого подхода.



1 задание

Как правило, препараты в процессе разработки проходят целый ряд исследований. Перед испытаниями на животных тестируют на культуре клеток.

Главное — определить их эффективность и безопасность. Ветеринарные препараты также можно тестировать на клетках соответствующего вида животных.

[По ссылке приведены данные тестирования](#) на клетках прототипов препарата по сравнению с молекулой сравнения, в тесте определяли жизнеспособность клеток (в процентах от контроля).

[Определите IC50](#) для каждого препарата (**доза**, при которой наблюдается половина эффекта).

Какой из этих препаратов стоит взять на следующий этап? Какие ещё исследования надо провести, прежде чем передавать его на эксперимент с животными?



2 задание

Вам необходимо проанализировать список препаратов — малых молекул, ингибиторов киназ.

Таких препаратов очень много, начать можно [с этого списка](#), но необязательно ограничиваться только им.

Какие из этих препаратов и как используются для животных? Какие [из нозологий](#) (это не совсем верное применение термина, тем не менее часто под нозологией имеют в виду, для терапии какой именно патологии используют этот препарат) могут подходить для ветеринарного применения?

Для каких животных это может быть актуальным?

Составьте приоритизированный список из 5-ти самых перспективных существующих препаратов с видами и нозологиями, в которых их возможно применить.



3 задание

Вам предстоит определить, какие киназы-мишени, рассматриваемые для человека, могут быть интересны с точки зрения ветеринарии.

Сначала предстоит определить топ (5,10 или другой — решать вам) мишеней киназ у человека. В помощь: [публикация 1](#) | [публикация 2](#).

Вам предстоит определить, какие из этих мишеней подходят для дальнейшей проработки в животных (их список определяете вы).

Насколько эти мишени похожи у человека и животных? Это стоит определить как с точки зрения структуры белка, так и с точки зрения сходства процессов, в которых они принимают участие.

Сравнить последовательность белка можно с помощью алгоритмов множественного выравнивания и построения филогенетических деревьев (BLAST, UCENE, MSA, [Mega](#) или ПО Ugene).

В этом вам помогут различные базы данных

- [UniProt](#) содержит данные по различным белкам, где в том числе представлены данные по структуре белка. Дело в том, что малая молекула связывается не со всем белком, а, как правило, [с активным центром](#), то есть той частью белка, которая непосредственно выполняет киназную роль;
- [BLAST](#) от NCBI позволяет провести поиск и выравнивание последовательностей по очень большой базе разных видов;
- [Multiple Sequence Alignment](#) позволяет проводить выравнивание множества последовательностей с помощью различных алгоритмов;
- [Conservative Domains Database](#) — база данных консервативных доменов в белках;
- [DrugCentral](#) — большая база данных по лекарствам, в том числе одобренных в ветеринарии;
- [DrugBank](#) — база данных лекарств;
- [KinaseNET](#) — устаревшая база данных киназ человека.

Вы можете использовать эти или любые другие удобные вам инструменты ([здесь можно подробнее узнать](#), как работают подобные подходы).

Не забывайте, что все базы данных составляют люди и там могут быть ошибки.



Бактериофаги

Предотвратить потери из-за заражения бактериофагами промышленных культур молочнокислых бактерий

Описание проблемной ситуации

Бактериофаги, или просто фаги (вирусы, заражающие бактерии), распространены повсеместно. В настоящее время они признаны наиболее распространёнными биологическими образованиями на нашей планете. В одной капле морской воды можно обнаружить до 10⁸ фагов.

Фаги являются облигатными паразитами, и большая часть цикла размножения фагов заканчивается лизисом клеток и высвобождением сотен новых вирионов, готовых инфицировать соседние клетки.

Одна из ключевых ролей фагов заключается в поддержании баланса бактериальной популяции. Однако фаги могут превратить профессиональную жизнь промышленного микробиолога в кошмар! Биотехнологический процесс, основанный на использовании бактерий для получения продукта, может быть нарушен фагами.

Ферментированные виды пищевой продукции (кисломолочные продукты, сыры, сырокопченые колбасы и др.) играют важную роль в питании населения, оказывают положительное влияние на организм человека и пользуются популярностью у многих людей. Производство качественной и безопасной продукции — важнейшая задача пищевых предприятий.

Однако на предприятиях могут возникать факторы, приводящие к нарушению биотехнологического процесса ферментированной продукции и увеличивающие риск снижения её качества. К важнейшим микробиологическим причинам, влияющим на процесс ферментации сырья, относят лизис бактериофагами молочнокислых бактерий, которые входят в состав заквасок для кисломолочной продукции.

Закваски представляют собой комбинацию различных молочнокислых бактерий (LAB), обычно штаммов *Lactococcus*

lactis, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc sp.* и/или *Lactobacillus sp.*

Учитывая, что для производства 1 тонны продукта требуется 10¹⁴ бактериальных клеток, очевидно, что LAB представляют значительный интерес для молочной промышленности. В нестерильной среде сырого или термически обработанного молока добавленные лабораторные клетки вступают в контакт с вирулентными фагами, обнаруженными в молоке. Хотя концентрация фагов в молоке обычно низкая, специфическая популяция фагов может быстро увеличиваться, если в закваске присутствуют чувствительные к фагам клетки.

Последующий лизис большого количества чувствительных клеток задержит или даже остановит процесс ферментации молока, что приведёт к получению некачественных продуктов.

Хорошо известно, что молочнокислые бактерии развили системы защиты от бактериофагов, которые позволяют им выживать в среде, полной хищников.

Эти антифаговые системы были разделены на пять групп в зависимости от способа их действия: (i) ингибирование адсорбции фага, (ii) блокирование инъекции фаговой ДНК, (iii) системы рестрикционной модификации, (iv) абортная инфекция фага, системы и, наконец, самая недавно описанная система (v) системы CRISPR/cas. Знания о природных механизмах устойчивости к фагам вместе с набором генетических инструментов были также применены для разработки (vi) инженерных защитных систем, которые обеспечивают более высокие уровни устойчивости и/или более широкую фаговую специфичность. [Подробнее](#).

Описание проблемной ситуации

Штаммы *L. lactis*, используемые в молочной промышленности, принадлежат к одному из двух подвидов, а именно *L. lactis ssp. lactis* или *L. lactis ssp. cremoris*. В то время как разнообразие штаммов лактококков может быть ограничено, их инфицирующие фаги доказали свою геномную эластичность и эволюционные возможности, позволяющие выживать и избегать гигиенических мер, условий обработки и механизмов устойчивости к фагам, кодируемых хозяином. В значительной степени эта коэволюция в сочетании с интенсивностью производства поддерживала постоянно растущее генетическое разнообразие этих фагов. [Подробнее](#).

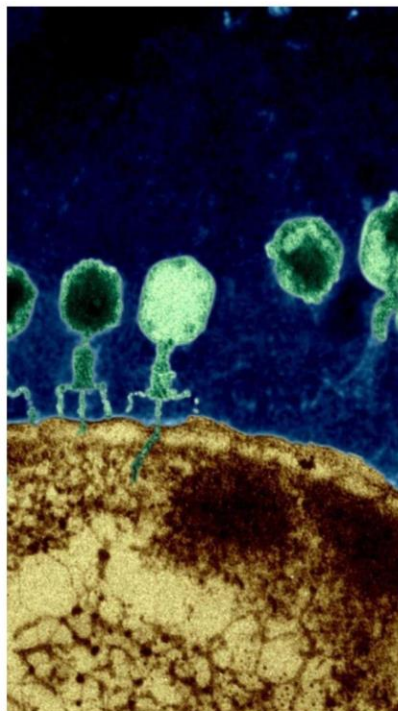
В дополнение к мониторингу вирулентных фагов, представляющих прямую угрозу для ферментации, активизировалось изучение фагов, потенциально способных выступать в качестве агентов биоконтроля порчи продуктов питания или напитков, а также возможности использования фагов в пробиотических целях для подавления патогенной микрофлоры.

Материалы для изучения

[Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations](#)

[Исследование бактериофагов, лизирующих молочнокислые бактерии.](#)

[Lactic Acid Bacteria Resistance to Bacteriophage and Prevention Techniques to Lower Phage Contamination in Dairy Fermentation](#)



1 задание

Проведите сравнительный анализ методов, с помощью которых можно выявлять зараженные закваски бактериофагами.

Учитывайте сложность метода, его надёжность и доступность.

Какой из них, на ваш взгляд, рационально использовать на производстве, а какой - в домашних условиях?



2

задание

Вам даны нуклеотидные последовательности фагов, которые были получены методом NGS из образцов заражённых заквасок ([данные](#)).

Сделайте выравнивание этих последовательностей (вы можете воспользоваться бесплатными программами [Mega](#) или Ugene или другой программой), постройте филогенетическое дерево. Опишите его и сделайте выводы о родстве найденных фагов.

Предложите систему праймеров для тестирования будущих заквасок на заражённость методом ПЦР.

Обоснуйте выбор количества пар праймеров для тест-системы, метод ПЦР-тестирования, выбор места для «посадки» праймеров, количество букв в праймерах.

Качество подбора нуклеотидной последовательности праймеров оцениваться не будет.



3

задание

Как можно снизить заражённость молочнокислых культур бактериофагами? Какие из этих методов можно применять в домашних условиях? Зачем?



Еда из пробирки

Оптимизация технологий выращивания культур клеток млекопитающих для создания коммерчески привлекательных заменителей мяса



Описание проблемной ситуации

В последние годы возрос интерес исследователей и общества к разработке альтернативных методов производства продуктов питания, которые бы решали проблемы, связанные с голодом и дефицитом пищи для растущей мировой популяции, интенсивностью животноводства (потребление воды, низкая продовольственная эффективность, выделение парниковых газов), этическими вопросами, а также безопасностью пищевой продукции (минимизируется риск инфекций).

В таком контексте одним из наиболее перспективных и инновационных направлений стало создание искусственного мяса.

Искусственное мясо, известное также как клеточное мясо или *in vitro* мясо, стало одной из самых инновационных и обсуждаемых тем в области продуктов питания и экологической устойчивости. Это новаторское решение, которое предлагает альтернативу традиционному животноводству, начало своё развития в лабораториях и научных исследованиях, приведя к перспективе революции в пищевой индустрии.

Искусственное мясо представляет собой новаторский подход к производству мясной продукции, основанный на выращивании отдельных клеток животных в контролируемой культуральной среде. Вместо традиционного животноводства, которое часто связано с этическими, экологическими и экономическими проблемами, искусственное мясо может предложить более эффективное и рациональное решение для получения белка животного происхождения в будущем ([статья 1](#) | [статья 2](#)).

Идея искусственного мяса имеет свои корни в начале 20 века, когда учёные начали исследовать культивацию живых животных клеток в лабораторных условиях. Первые эксперименты проводились на клетках животных, таких как куры и кролики. Эти исследования позволили разрабатывать

методы для выращивания мышечных клеток в [Petri-подставках](#).

Следующим важным шагом было развитие методов биоинженерии и биотехнологии, которые позволили учёным манипулировать клетками, стимулировать их деление и дифференциацию в мышечные клетки. Одним из первых культурных мясных продуктов стало культивированное [индюшачье мясо](#), представленное в 2002 году.

Следующие десятилетия принесли ряд прорывов в разработке искусственного мяса. В 2013 году Марк Пост, голландский учёный, представил первый культурный говяжий бифштекс после 2-х лет своих разработок. [Это событие](#) стало историческим моментом, признанным многими революцией в пищевой индустрии. Однако стоит добавить, что цена такого ноу-хау составляла 300 000\$.

Искусственное мясо вызывает интерес не только благодаря своей технологической сложности, но и из-за его потенциала снижения воздействия животноводства на окружающую среду.

Оно требует значительно меньше земельных ресурсов и воды, не приводит к выделению метана и не предполагает бесчеловечное обращение с животными.

Таким образом, искусственное мясо может быть ответом на вызовы экологической устойчивости и этических вопросов, связанных с пищевой промышленностью.

Описание проблемной ситуации

В будущем искусственное мясо, вероятно, будет играть всё более важную роль в мировом рационе. Перед этой инновацией стоят вызовы, такие как снижение стоимости производства, улучшение вкусовых характеристик и получение регулирующих одобрений. Тем не менее рост интереса к этой технологии и вложения в неё делают её будущее обещающим.

Искусственное мясо — это результат совместных усилий учёных, инженеров и предпринимателей, история которого только начинается.

В этой истории объединяются биология, биотехнология, экология и многие другие области, чтобы предложить инновационное решение для нашей пищевой системы и окружающей среды.



1 задание

Одна из главных **проблем** в выращивании клеток для такого мяса — наличие подходящей среды. Обычные **среды** для роста содержат ЭБС (эмбриональная сыворотка коров).

Это достаточно дорогой компонент, к тому же он получается из животных, что немного противоречит самой концепции.

Поэтому для выращивания мяса в пробирке используют **бессывороточные** среды. Но они не всегда способны обеспечить необходимые условия роста, не содержат необходимые ростовые факторы и к тому же достаточно дорогие.

Таким образом, выбор среды для культивирования — непростой этап разработки и накладывает большие ограничения.

Сравните между собой существующие для выращивания мяса среды.

Опишите их плюсы и минусы. Какие из этих сред можно купить в России? Какие есть аналоги?

Какие ещё могут быть применения у бессывороточных культур?



2

задание

Вторая важная проблема — источник таких клеток. Различные компании используют клетки курицы, коровы, козы и других животных.

Используются как клетки, выращенные из стволовых, так и первичные культуры [клеток](#).

Проанализируйте [Российскую коллекцию](#) клеточных культур.

Какие из этих клеток можно потенциально использовать для создания «еды из пробирки»?

Какие анализы надо провести с клетками, полученными из этой коллекции, прежде чем начать разработку такого продукта?

Составьте алгоритм приёмки новой клеточной культуры в лаборатории.



3

задание

[На картинке](#) — результат ПЦР-анализа (кривые плавления) на [микоплазму](#) в соответствии [с инструкцией производителя](#) нескольких образцов клеток, пришедших из соседней лаборатории, которые планируется использовать для дальнейшей работы.

С какими из этих линий можно работать?

