

UMAN HEALTH

ENVIRONMENTAL HEALTH

始
于
表型筛选
的药物研发

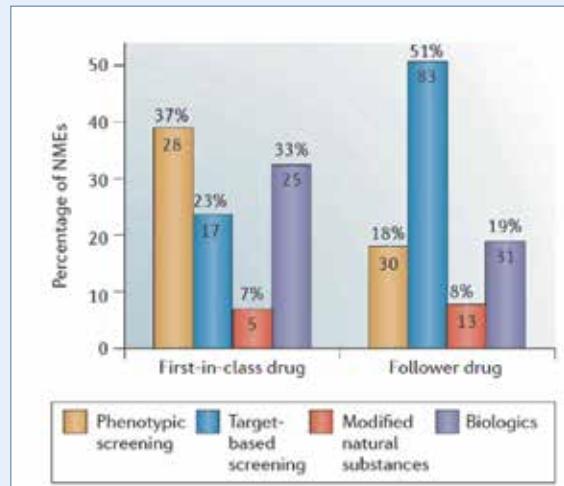


PerkinElmer生命科学微信服务号

PerkinElmer®
For the Better

高通量药物研发

科学家的药物研发脚步从未放缓。在过去20年中基于分子靶点的筛选成为药物早期研发的主要方法。研发流程经历：靶点确定→方法建立→化合物高通量筛选→先导化合物优化→细胞实验→动物水平验证，最后转至临床阶段。整个过程历时10年以上，耗费数十亿美元，然而只有极个别的化合物能通过整个流程最终上市成为治疗疾病的药物。基于靶点研究方法的局限性在于无法预见化合物对于细胞整体信号通路的影响，因此近10年来，科学家将早期药物研发的起点转移至了表型研究，分析1999至2008间被FDA批准的第一类小分子药物，其中28个($>1/3$)是利用表型筛选方法发现的。



The distribution of new drugs discovered between 1999 and 2008, according to the discovery strategy. David C. Swinney and Jason Anthony, NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY VOLUME 10 | JULY 2011.

始于表型筛选的高通量药物研发一般思路是通过筛选大型化合物库(百万级)，确定对细胞有影响的先导化合物再进入靶点研究，在不同阶段的细胞实验中，辅以高速的细胞水平成像手段，提供更多的正交相关信息。这一流程可以大大缩短研发周期，节省经费。

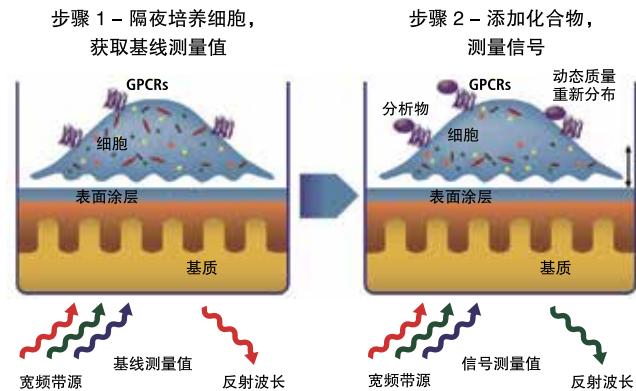


始于表型筛选的高通量药物研发一般流程

始于 表型筛选

表型筛选的方法和应用

表型药物研发通过检测活体的功能或形态学改变寻找不依赖于特定靶点或是单一生理过程的新药。表型研究模型往往是利用细胞、组织或生物体评估大量的化合物。越来越多的证据表明表型研究是发现创新药物的有效方法(Eder et al., J. Nat. Rev. Drug Discov. 13, 577-587, 2014)。正因如此，越来越多科学家使用表型研究辅助靶点研究，以期望在研究早期获得与更多生理学相关的信息。



细胞无标记检测

Epic® 细胞无标记技术测量细胞内动态质量重分布(DMR)导致出射光的波长改变，这种改变来自于细胞整体对于某些信号分子或刺激的响应，而不依赖于某一特定靶点或信号通路。通过波长变化来检测这种细胞表型的改变。无标记技术用于重组或是内源性表达靶点时，具有卓越的灵敏度，可以提供大量与表型相关的信息。

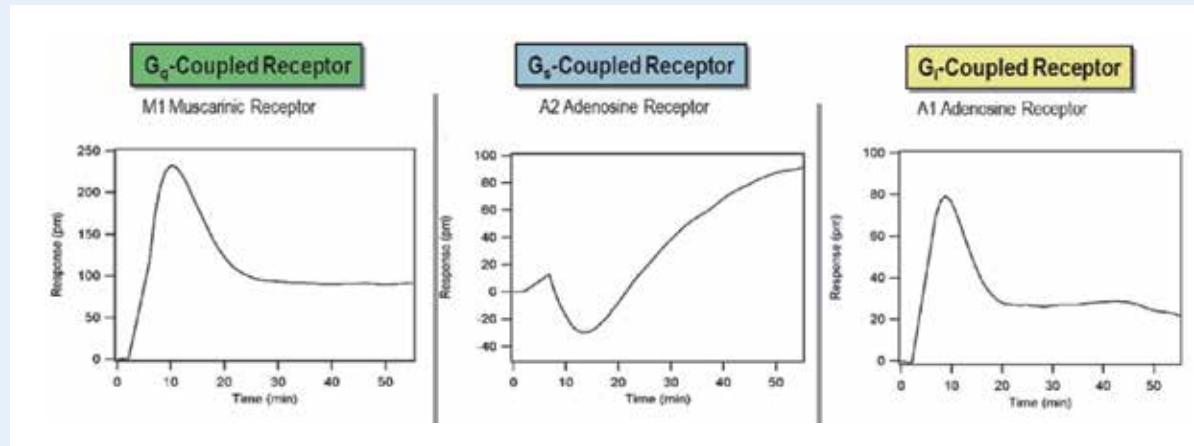
典型的细胞无标记检测包括：

- 受体生物学
- 表型检测
- 细胞毒性
- 离子通道

应用1 无标记技术研究GPCR

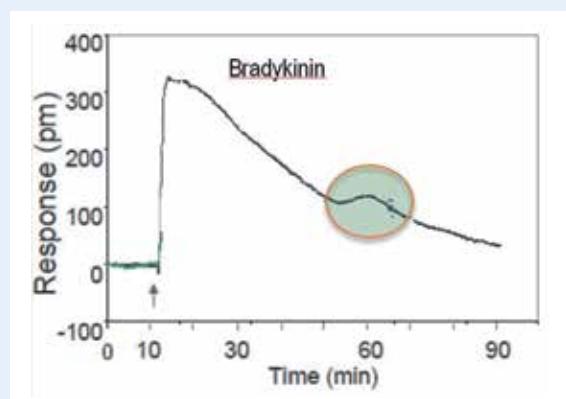
GPCR是药物研发中一个相当重要的靶点，利用无标记技术对GPCR靶点的研究可以分为调控分子的筛选和定性。

GPCR通路调控分子的筛选：研究表明GPCR受体关联的通路可以分为Gs, Gi和Gq三种。三种通路对于调控分子的响应存在特异性曲线(如图)。在药物研发前期对待筛化合物进行通路识别，将无标记检测所得到的响应曲线与标准曲线进行比较，即可知道效应分子是哪(几)条通路的调控分子。

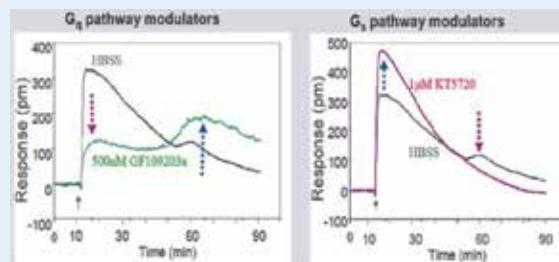


调控分子对G_q, G_s和G_i单一通路的特异性响应曲线

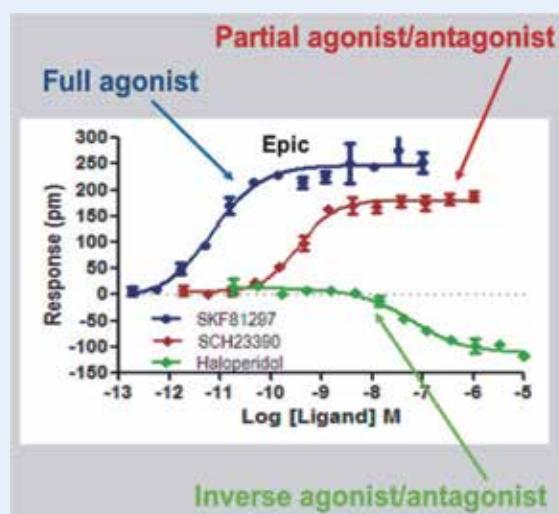
GPCR通路调控分子的定性: 调控分子是激动剂(Agonist)还是拮抗剂(Antagonist)? 如果是激动剂, 是Full Agonist、Partial Agonist还是Reverse Agonist? 不同的信号通路之间是否存在相互调节的作用? 这些问题通过无标记检测可以非常方便地得到答案。



缓激肽(Bradykinin)受体关联了G_q和G_s双通路



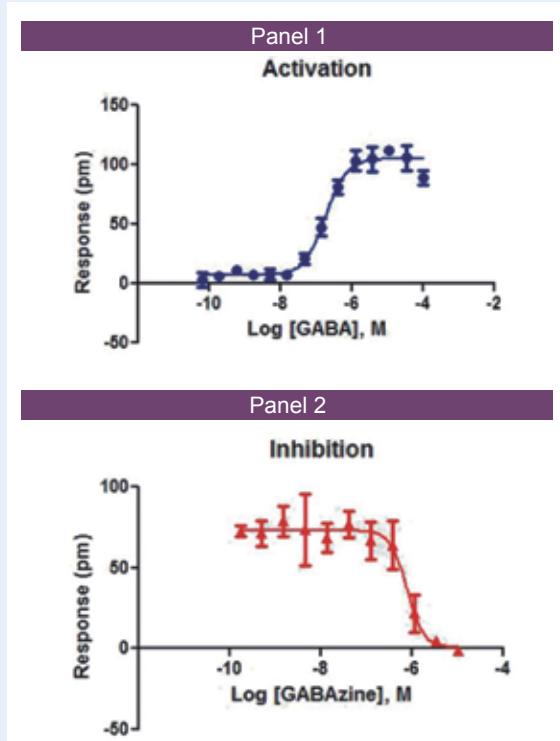
缓激肽 (Bradykinin) 受体通路相互调节
G_q抑制剂GF109203x能使G_s通路上调;
G_s抑制剂KIT5720能使G_q通路上调。



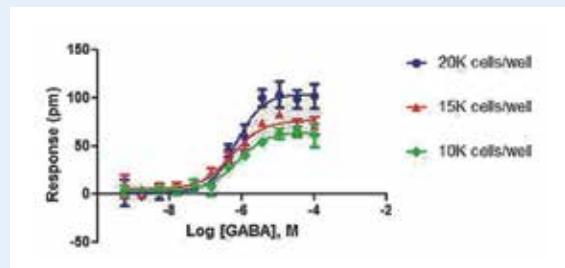
多巴胺(Dopamine D1)受体调控分子鉴定

应用2 无标记检测对离子通道的研究

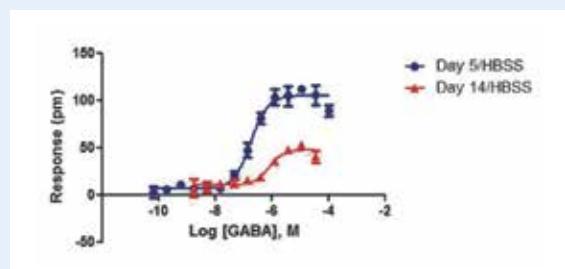
随着全球人口老龄化的加剧，神经退行性疾病发病率也在逐年增加。科学家们在积极寻找治疗亨廷顿(Huntington's disease)、帕金森(Parkinson's disease)和阿尔海默氏(Alzheimer's disease)的药物。通过无标记的方法，我们可以非常方便地构建iCell®神经细胞的离子通道受体GABA筛选模型。



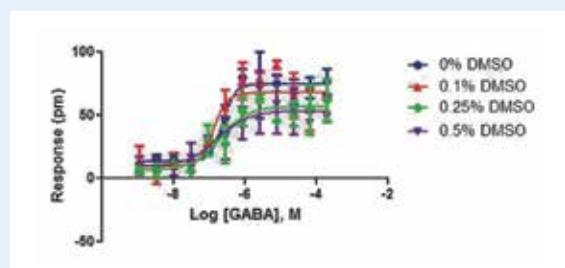
对照激动剂和抑制剂的响应曲线



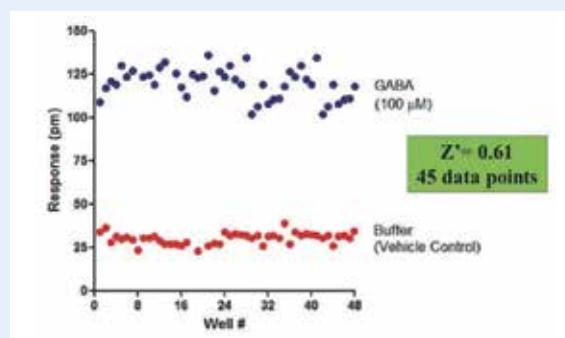
不同iCell®神经细胞接种数目的响应曲线



不同培养天数的响应曲线



DMSO耐受性



iCell® 神经细胞筛选模型稳定性 (Z')

靶点验证



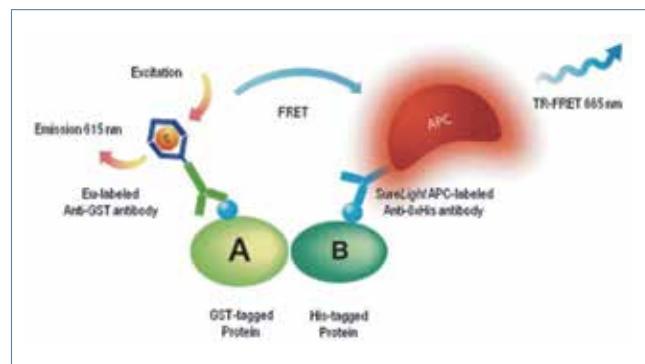
当药物研发进入靶点验证阶段，需要深入研究药物对已知靶点的作用(机理)。靶点验证阶段的实验包括体外实验，细胞实验，动物实验等。通过不同的多标记检测手段获得更多的实验数据，辅以无标记或细胞成像技术实现正交分析，减少假阳性数据，提高结果的可靠性。

基于时间分辨荧光(TRF)的标记检测： LANCE和DELFIA

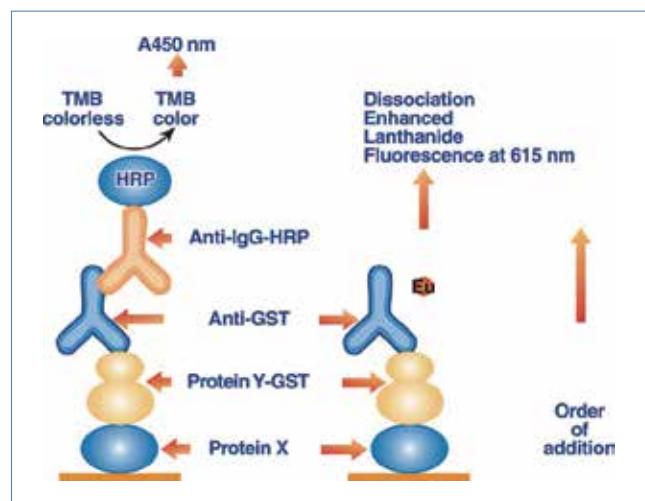
LANCE技术将时间分辨(TR)和荧光共振能量转移(FRET)原理的优势结合到了一起。当两个荧光团标记相互趋近时，能量将从供体转移到受体。因此，当两者相互极为靠近时($7\text{nm}\sim 10\text{nm}$)，供体荧光的激发将导致受体荧光的发射。受体荧光的发光级别与供体受体络合物形成的程度成比例。根据受体染料不同分为普通LANCE[®]和LANCE Ultra。主要应用于：激酶检测、GPCR检测、表观遗传学、蛋白-蛋白相互作用等。原理见图：

DELFIA是需要洗脱的免疫分析技术。除了其为镧系元素标记，并且检测方式为荧光外，其它步骤与广泛使用的ELISA相同，但灵敏度和检测范围远高于ELISA，最大可达 10^{-18} M ，并且不需依赖时间的信号检测或添加终止液，是一种理想的ELISA替代技术。原理见图：

应用范围：免疫分析、结合分析(蛋白/蛋白、蛋白/多肽、蛋白/DNA、配体/受体)、激酶分析、杂交分析、粘附细胞分析、细胞粘附分析、细胞毒性分析、功能细胞分析等。

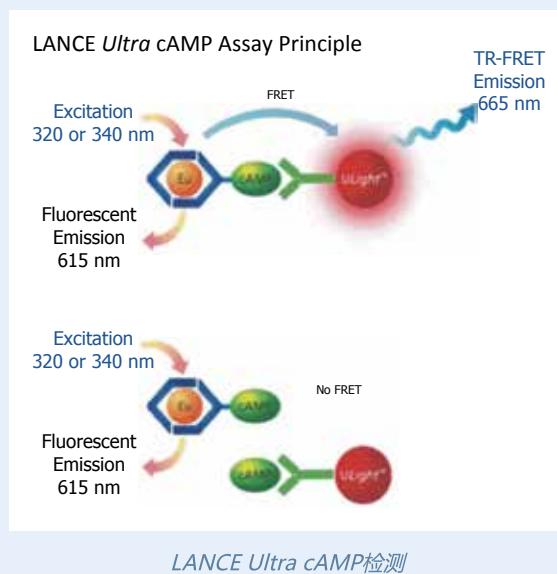
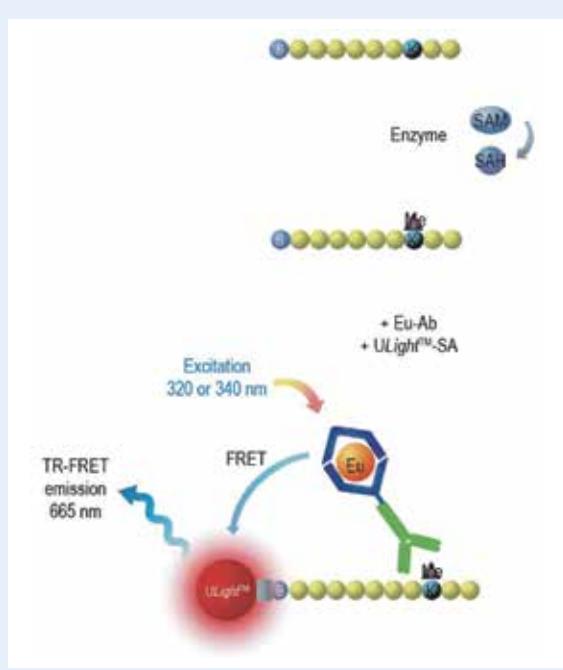
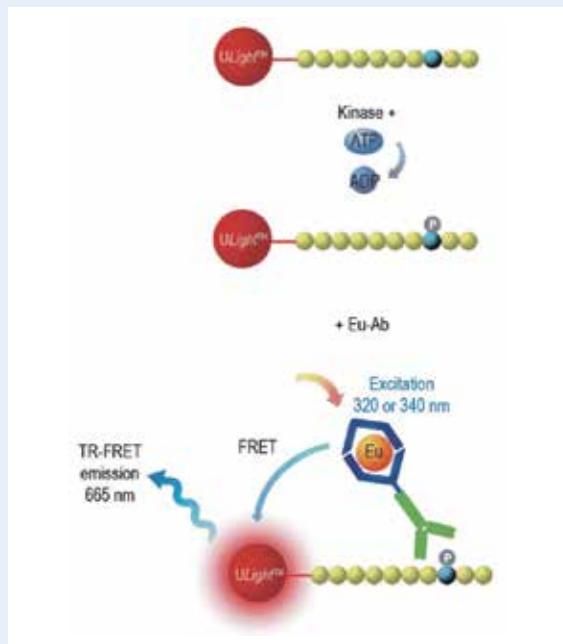
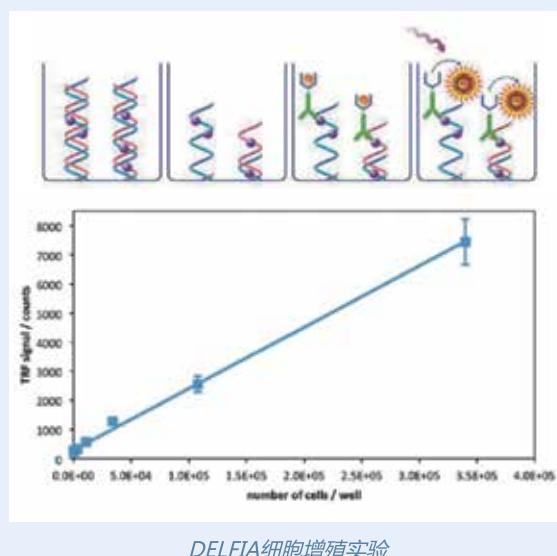


LANCE原理图



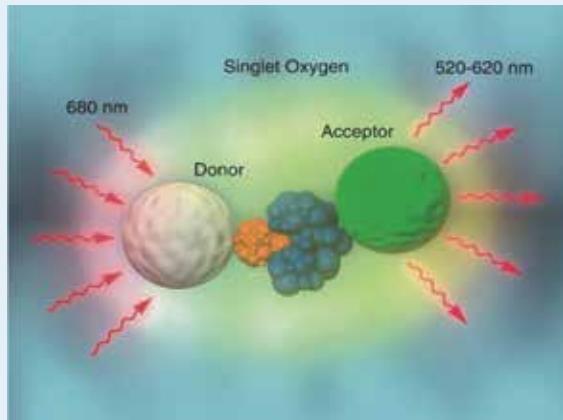
DELFIA原理图

PerkinElmer的表观遗传学分子学检测试剂盒产品主要针对生物素化的组蛋白肽段或天然核小体多聚体为底物而开发。检测原理是铕标记抗体(**Ab**)特异性的识别并结合生物素化的底物，链霉亲和素(**SA**)标记的ULight也同时结合生物素化底物，使铕供体和ULight受体染料分子相互趋近。经过320或340 nm波长光的照射后，铕供体的能量将转移到ULight受体染料中，并生成波长为665 nm的光。光的发射强度与底物修饰的水平成比例。

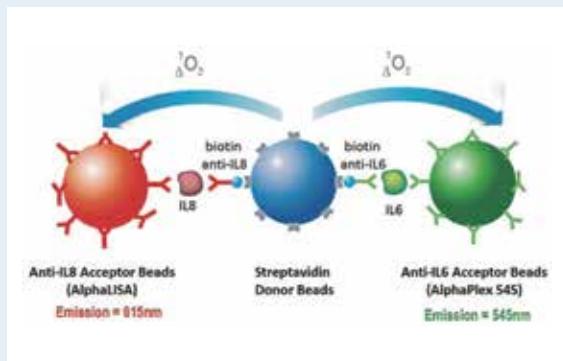


基于化学发光的标记检测：AlphaScreen、AlphaLISA和AlphaPlex

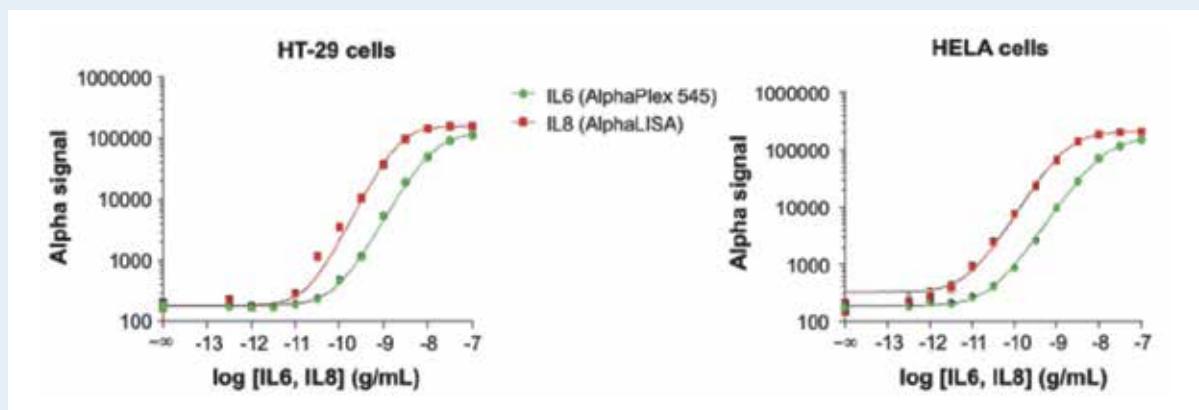
ALPHA技术是基于两个微珠的技术，供体微珠和受体微珠分别包含不同的化学物质，当两个微珠相互靠近时，用680nm的光去激发供体微珠，其内部的光敏剂发生一系列化学反应产生的能量会将周围反应体系中的氧气分子转变为激发态的单体氧，单体氧在反应体系中扩散，将能量传递给受体微珠，受体微珠最终产生520-620nm(AlphaScreen)、615nm(AlphaLISA)或者545nm(AlphaPlex)的发射光。



Alpha技术非常灵活，可进行多种形式的实验，包括竞争性实验、结合实验、解聚实验、检测实验等。可以使用直接检测的方式，也可以选择间接检测的方式。应用范围：酶检测、相互作用检测(包括受体/配体、蛋白/蛋白、蛋白/DNA等)、免疫检测、GPCR功能检测。



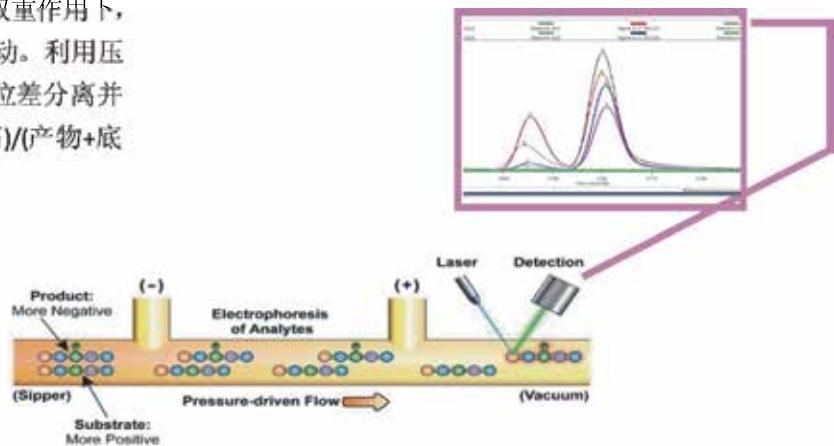
在AlphaPlex检测中，用户可在同一孔中同时检测两个独立的通路信号，获得可以相互验证的结果。





基于微流体芯片技术的标记检测：MSA

迁移率变化检测(MSA)技术依托微流体芯片，结合毛细管电泳的基本原理，在微流体环境下分析终止状态或动态过程的酶促反应。在压力差和电位差双重作用下，酶促反应的液滴在微流体芯片的微管路中移动。利用压力差将微量液滴吸入芯片；在管路中施加电位差分离并检测荧光标记的底物和产物。通过 $(\text{产物峰高})/(\text{产物} + \text{底物峰高})$ 来计算酶促反应的转化率。

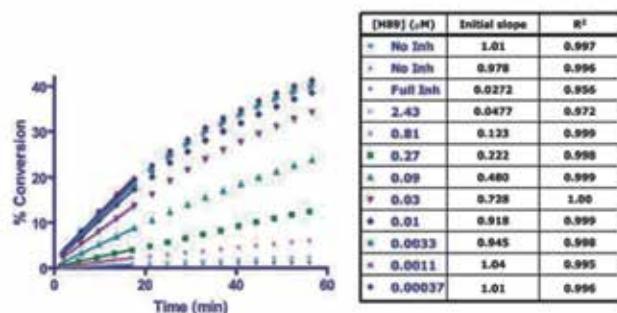


应用范围

MSA技术适用于所有能引起底物电荷改变的酶免反应，包括：

- a. 激酶 Kinases
- b. 磷酸酶 Phosphatases
- c. 脂质激酶 Lipid Kinases
- d. 蛋白酶 Proteases
- e. 磷酸二酯酶 PDEs
- f. DNA/RNA 结合蛋白
- g. 乙酰化酶 HATs
- h. 去乙酰化酶 HDACs
- i. 甲基化酶 Methyl Transferases
- j. 去甲基化酶 Demethylases

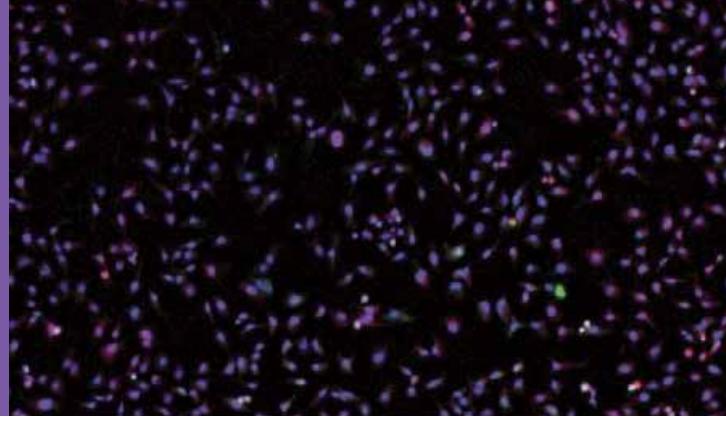
相对传统的标记技术，MSA技术特别合适进行动力学检测。利用该技术得到的动力学参数是最接近真实酶学反应的。



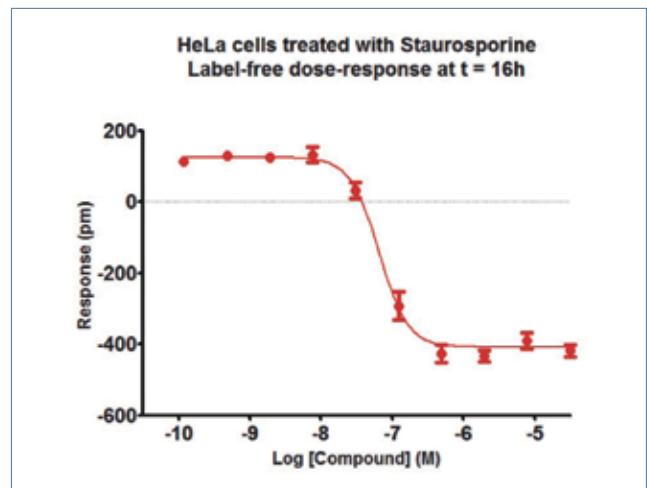
不同抑制剂浓度下，酶学反应初速度检测

利用这个技术，用户还可以方便的进行整个酶谱的动力学活性检测，大大提高研究的效率和数据质量。

细胞成像 带来更多相关性信息

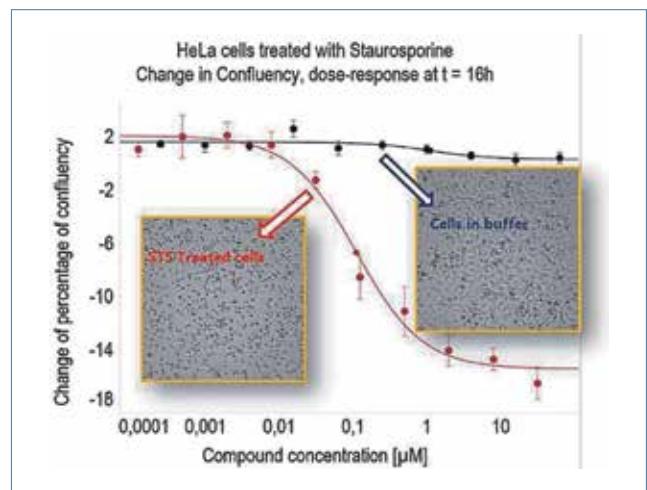


在药物研发的细胞实验中，观察细胞可以获得最直接的信息。利用高速的微孔成像技术可以快捷方便地生成细胞图像数据，无论是固定细胞还是活细胞，进行终点检测还是随时间推移的动力学检测。根据细胞形状或数量将成像数据与无标记检测或标记检测数据进行关联获得更好的预测性结果。



细胞成像与无标记检测信 号关联

图像分析结果与无标记计算结果相似，可以相互校验。在研究中，用户甚至可以使用同一批细胞样品，同时实现EPIC无标记检测，细胞成像分析与体外检测实验。这些结果互为验证，相互启发，是提高科学效率的重要方法。



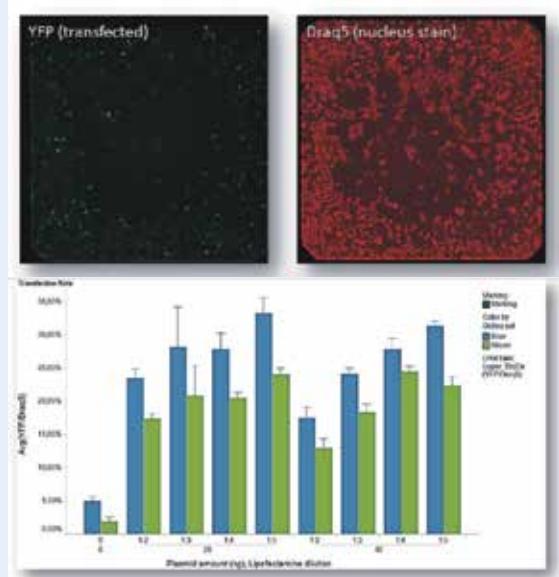
细胞成像与化学发光检 测关联

可以分析哪些化合物是导致细胞死亡的毒性化合物，哪些仅仅影响细胞ATP合成，而不改变细胞形态。



分析细胞传染效率

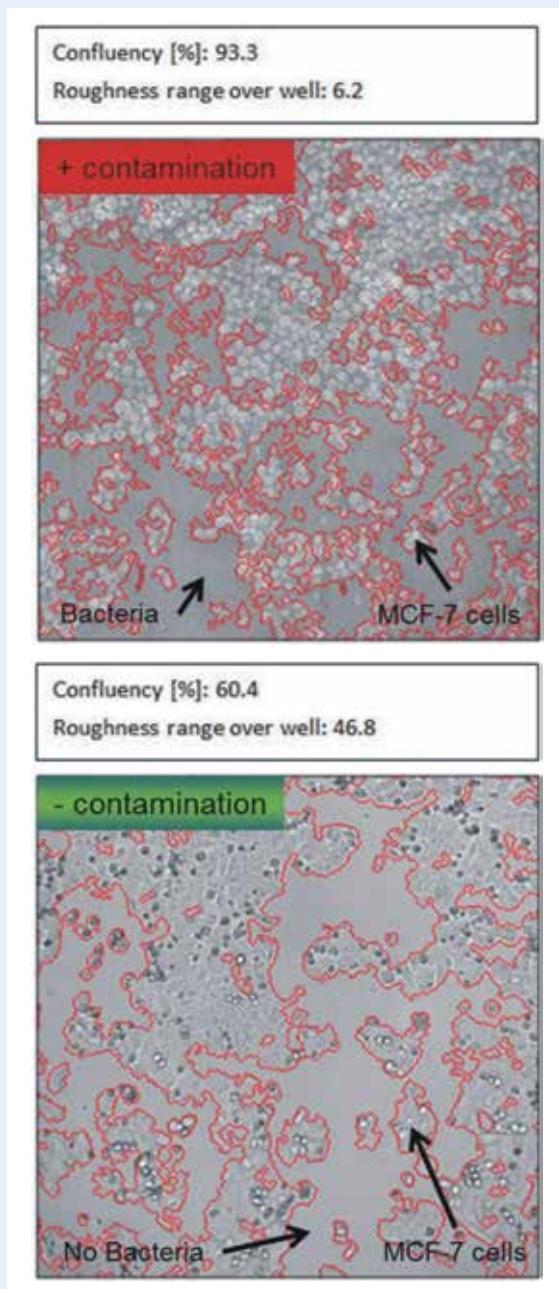
分别计数YFP和Draq5通道的细胞数，计算两者比值，可以知道转染效率。



通过图像分析对实验结果进行质控和数据的归一化，是获得正确结果的策略。

细胞实验质控学

当实验结果变得扑朔迷离时，细胞成像分析或许可以给你提供更多的细节信息。通过软件分析，可以清楚地知道哪些微孔存在细菌污染，对细胞操作进行质控。



结束语

药物研发已经进入到一个崭新的时代，如何在更短的研发周期中获得更多有效的数据，是每个科学家无法回避的问题。从表型筛选迈出药物研发的第一步，我们为您提供了各种技术方法加速您的研究步伐。每个人的应用需求都有所不同。为了方便您的研究，PerkinElmer始终致力于为您提供最新最成熟的技术和最合适的应用解决方案。我们将与您并肩合作，克服药物研发中遇到的各种挑战。



珀金埃尔默企业管理（上海）有限公司

上海总公司

地址：上海浦东新区张江高科
技园区张衡路1670号
电话：+86 21-6064 5888
传真：+86 21-6064 5999
邮编：201203

北京分公司

地址：北京朝阳区酒仙桥路14号院
兆维工业园甲2号楼1层东侧单元
电话：+86 10 8434 8999
传真：+86 10 8434 8988
邮编：100015

成都分公司

地址：成都市高新区西芯大道5号
汇都总部园6栋3楼
电话：+86 28-8785 7220
传真：+86 28-8785 7221
邮编：610016

武汉分公司

地址：武汉市武昌区临江大道96号
武汉万达中心写字楼1808-1809室
电话：+86 27-8891 3055
传真：+86 27-8891 3380
邮编：430062

西安分公司

地址：陕西省西安市高新区锦业路69号
创业研发园A座1009室
电话：+86 029-8129 2671
传真：+86 029-8129 2126
邮编：710077

广州分公司

地址：广州市荔湾区芳村大道
下市直街1号信义会馆12号
电话：+86 20-3789 1888
传真：+86 20-3789 1899
邮编：510370

中文网址：www.perkinelmer.com.cn
客户服务电话：[800 820 5046](tel:8008205046)

要获取全球办事处的完整列表，请访问 www.perkinelmer.com>ContactUs

版权所有 ©2016 PerkinElmer, Inc. 保留所有权利。PerkinElmer® 是 PerkinElmer, Inc. 的注册商标。所有其它商标均为其各自所有者的财产。

160501

所有数据仅供参考，PerkinElmer 拥有最终解释权。

