

Využití synchrotronového záření pro diagnostiku a vývoj nových léčiv

J. Hašek, ÚMCH AV ČR

Zisky farmaceutických společností a společností využívajících biotechnologie činící mnoha miliard dolarů ročně jsou silně závislé na patentové prioritě.

To je důvod, proč biotechnologické a farmaceutické firmy potřebují různé formy přístupu na synchrotron nezbytné pro výzkum s možností úspěšného patentu.

Obdobná situace je i v nejrůznějších průmyslových aplikacích - mycí prášky, zpracování potravin, ekologická likvidace produktů, výroba, živočišná výroba, dozrávání a uchování zemědělské produkce, atd.

Proč je pro biotechnologické a farmaceutické firmy přístup na synchrotronové zařízení tak důležitý ?

- **Je to jediná metoda umožňující prohlížet procesy probíhající v materiálu v 1 000 000 000 násobném zvětšení.**
- **Není závislá na složitosti ani komplexnosti stavby materiálu.**
- **Zobrazuje skutečný obraz makromolekulárních komplexů včetně jejich funčních pohybů.**
- **Dosahovaná přesnost ~pm je limitována už pouze tepelným pohybem a nedokonalostí materiálu.**
- **Umožňuje "snímkování" biochemické reakce v jejím průběhu ($\Delta t \sim 50$ ps).**
- **Množství materiálu potřebného ke kompletnímu zobrazení reálné struktury molekulárních komplexů je nepatrné (mikrocrystal s rozměry několik mikronů, tj. váha menší než 0,000 000 001 gramu).**

Obrazně řečeno je difrakce synchrotronového záření jedinou metodou, která nahrazuje oči odborníkům zkoumajícím složité molekulární procesy mikrosvěta.

Všechny další metody lze přirovnat k ostatním smyslovým orgánům (hmat, čich, atd.). Poskytují sice další potřebné informace, ale nezbytný reálný obraz skutečnosti vytváří pouze jako model, který neodporuje získaným bodovým hmatovým zkušenostem.

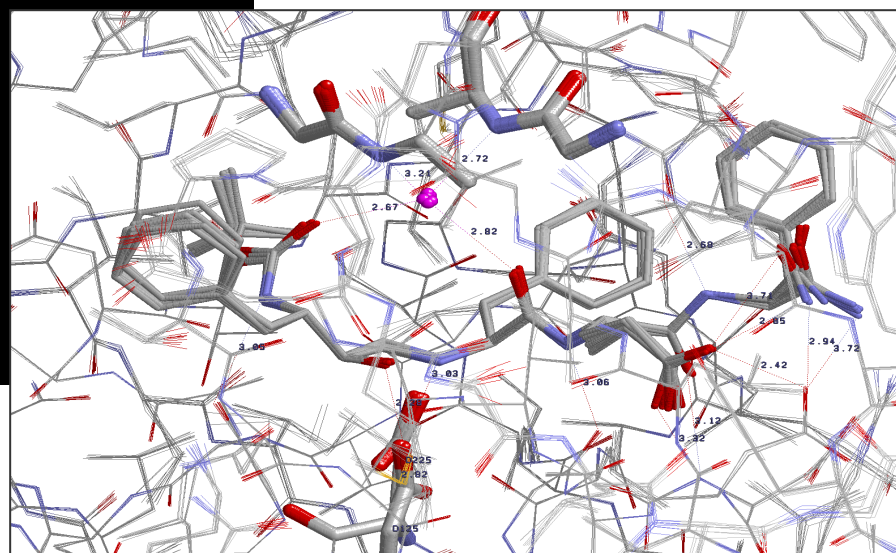
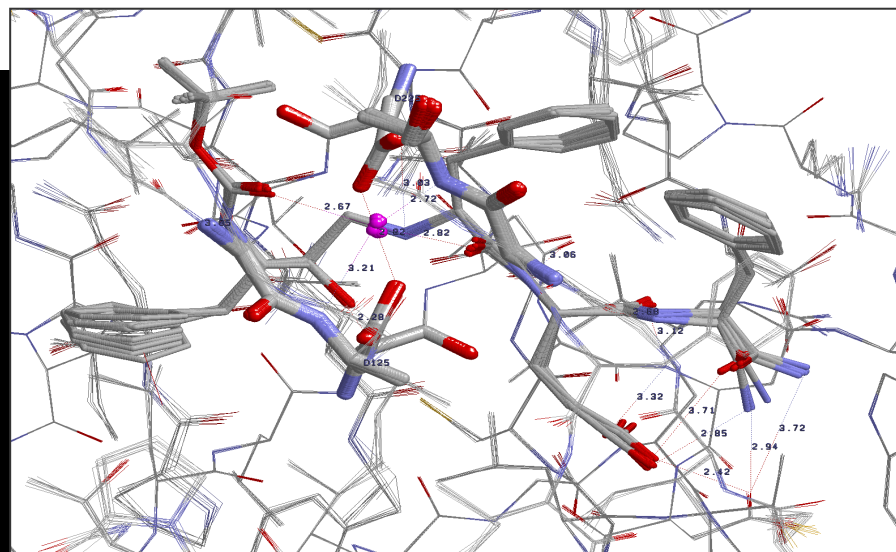
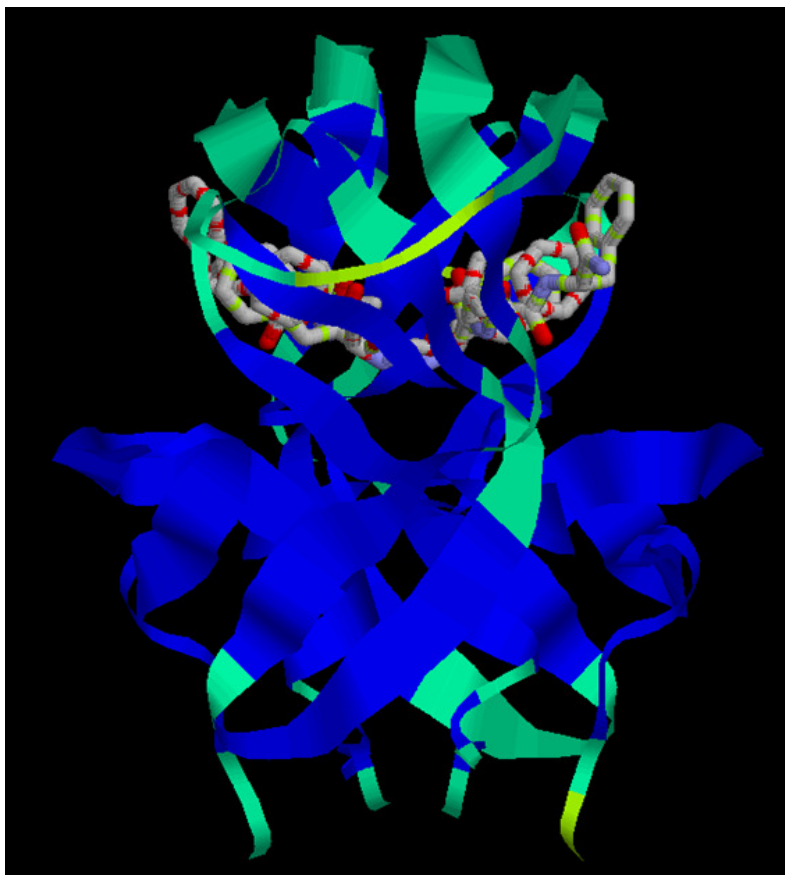
Tři příklady z naší laboratoře ukazují, že přesnost a úplnost pohledu na molekulární procesy je nutná pro pochopení biochemických a katalytických procesů.

Příklady využití synchrotronového záření v lékařství a při zpracování potravin

1. Návrh antivirálních léčiv (inhibitory HIV proteázy) ⇒ **farmacie**
2. Objasnění funkce léčiv v těle pro bezpečnější a účinnější léčbu ⇒ **lékařství**
3. Struktury enzymů použitelných při zpracování potravin za nízkých teplot, dietních potravin, atd. ⇒ **potravinářský průmysl**

1. Návrh antivirálních léčiv (inhibitory HIV proteázy)

Přesnost při určení kontaktů a zviditelnění pohybů molekulárních fragmentů jsou při objasňování mezimolekulárních interakcí nezbytné.



Závěr této studie

Účinný návrh nových léčiv vyžaduje:

- Stanovení struktury s vysokou přesností [pm],
- localizaci molekul vody uvnitř a kolem proteinu,
- stanovení mezimolekulárních interakcí,
- entropii vztaženou k pomalým vibračním modům inhibitoru v systému.

Pouze využití synchrotronového záření umožňuje splnit tyto požadavky na přesnost a spolehlivost experimentu

Příklad z oblasti lékařství

Cystathionine γ -lyáza (hCTH)

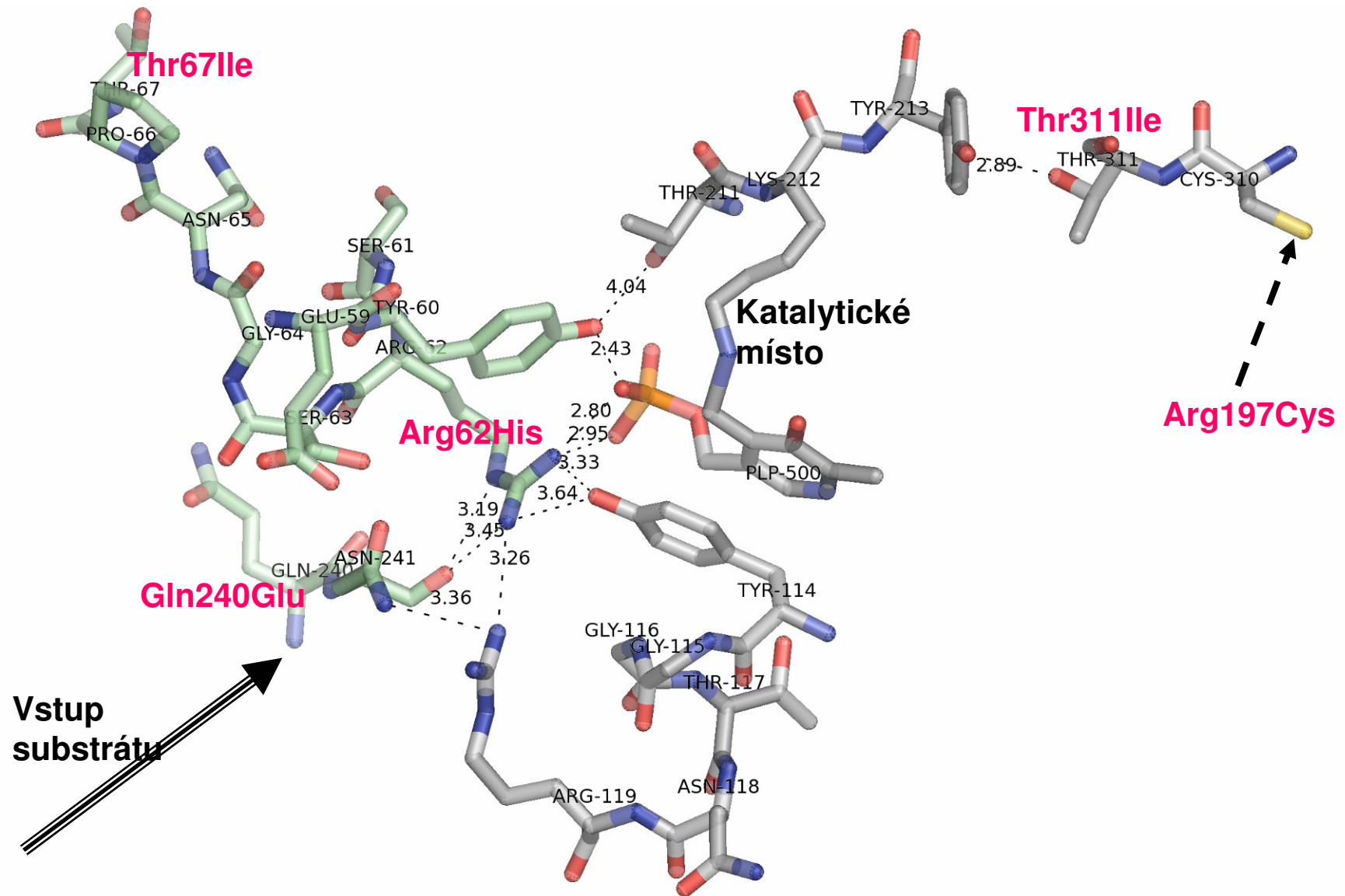
Strukturní, klinická, metabolická a genetická studie lidí s vrozenými mutacemi tohoto enzymu

Nedostatečná funkce CTH zvýší hladinu metabolitů v plazmě a vede k těžkým stavům mentální retardace.

Asi 40 % pacientů má příznivou odezvu na léčení kofaktorem (PLP) .

X-ray studie na zdroji synchrotronového záření umožnila klasifikaci pacientů na skupiny a správnou diagnózu léčby

Ještě bližší pohled do katalytické dutiny hCTH.
Katalytická reakce probíhá mezi PLP a Lys212



Závěr studie hCTH

Správné používání léčiv vyžaduje pochopení jejich molekulárního působení v organismu. V našem případě:

- Léčení pomocí PLP přináší pozitivní výsledky jen u pacientů, kteří zdělili mutace CTH v oblastech interagujících s PLP vazebným místem.
- Polymorfismus 403 ovlivňuje pouze dynamiku distribuce enzymu v organismu, na funkci samotnou nemá vliv.
- Mutace ovlivňující otevírání flapů nemají podstatnou odezvu na léčení pomocí PLP.

Výsledky proteinové strukturní analýzy s využitím synchrotronového záření jsou v plné shodě s výsledky experimentálního léčení dostupného vzorku pacientů v ČR, USA, Kanadě a v Australii.

Příklad aplikace synchrotronového záření při návrhu nových technologií výroby a zpracování potravin

Struktura β -galaktosidázy z půdní bakterie žijící v Antarktidě je příkladem enzymu, zachovávajícího katalytickou aktivitu při zpracování cukrů i za nízkých teplot.

Jde o hexamer molekul se šesti katalytickými místy.

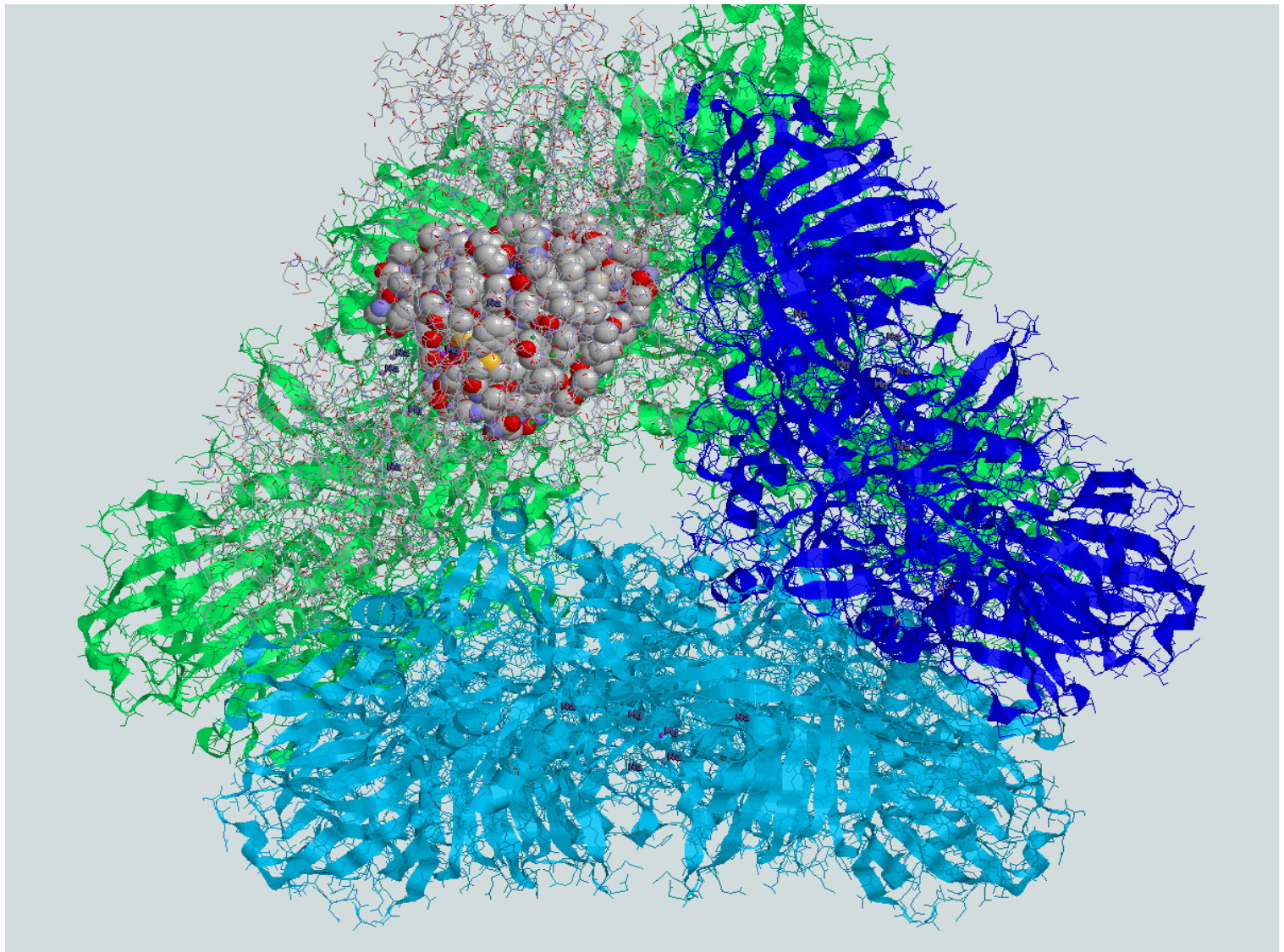
Uhlíkové atomy podjednotek jsou zbarveny různými barvami.

Vazebné místo v jedné podjednotce je znázorněno kuličkovým modelem.

Vstupní otvory do dvoustupňových vazebných míst jsou orientované dovnitř velkého prostoru uvnitř komplexu.

Závěr:

Příprava speciálních enzymů pro ekologické a bezpečné zpracování potravin



Privátní makromolekulární beamliny

Formy spolupráce provozovatelů synchrotronu APS se soukromým sektorem v USA

Sdružení SGX Pharmaceuticals provozuje společnou „beamline“ pro

- Lilly, Millennium Pharmaceuticals
- F. Hoffmann La Roche Ltd.
- Inc., Exelixis, Inc.
- Biogen Idec Inc.
- Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics, Inc
- NIH Protein Structure Initiative

Sdružení "Collaborative Access Team (SGX-CAT)"

nabízí „Makromolekulární beamline“ pro expresní krystalografii jako službu

Privátní sektor se dále podílí také na využití ostatních „beamline“

účast v týmech spolupracujících subjektů zaměřených na dosažení určitého výsledku.

Projekty akademických, univerzitních a privátních subjektů sponzorované grantovými agenturami. Zde je nutné zveřejnění dosažených výsledků.

Potřeba makromolekulárních beamline na zdroji synchrotronového záření

Makromolekulární „beamline“ v CESLab umožní i malým firmám (10-50 zaměstnanců) dosáhnout špičkových aplikačních výstupů s dopadem na ekonomiku ve všech oblastech, kde se využívá biologických materiálů, tj.

farmacie, lékařství, biotechnologie, potravinářství, čisticí prostředky, kosmetika, kriminalistika, zemědělství, životní prostředí, ochrana krajiny, atd.

P.S.

"Makromolekulární skupina" v CESLab řeší především strukturu a funkci komplexů biologických molekul a nové bio-katalytické technologie.

*Může ale řešit též kompletní strukturu **polymerních materiálů, organických a anorganických sloučenin, minerálů, kovů** v atomárním rozlišení.*

Potřebná váha vzorku 0,000 000 001 g.