

Биочипы: от академических изысканий к молекулярной медицине

А. Д. Мирзабеков,

академик РАН, директор Института молекулярной биологии РАН им. В. А. Энгельгардта, член Европейской академии наук, Германской академии Леопольдина, лауреат Государственной премии СССР, премии международного биохимического общества, награжден медалью Грегора Менделя, золотой медалью им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук



Т. Е. Семенов,

кандидат биол. наук, советник Аналитического управления Совета Федерации России

А. С. Заседателев,

профессор, доктор физ.-мат. наук, зам. директора института

В. Е. Барский,

доктор биол. наук, ведущий научный сотрудник

Ю. П. Лысов,

доктор физ.-мат. наук, заведующий лабораторией

Институт молекулярной биологии Российской академии наук им. В. А. Энгельгардта

Biochips equipped with a biochip reader and proper software is a promising diagnostic tool of the 21-st century which allows to analyze a biological sample simultaneously by many parameters.

The paper outlines the history of this new high-tech branch of biotechnology as viewed by one of the founders of this innovative approach. The EIMB's team led by academician Mirzabekov remains among the world's leaders in this important and fastly growing field. The versatile, flexible and inexpensive biochips developed in EIMB RAS have been successfully tested in a number of practical applications, and they are already used for fast and highly informative analysis in biology, medicine and some other areas of research and industry.

Создание биологических микрочипов (или биочипов) — одна из тех областей науки, где российским ученым принадлежит безусловное первенство. Впервые в мире они были изготовлены в 1989 году в лаборатории Андрея МИРЗАБЕКОВА, директора Института молекулярной биологии РАН им. В. А. Энгельгардта. Работа академика Мирзабекова и его сотрудников названа одним из главных научных достижений РАН последнего времени. И не случайно: сегодня биочипы становятся мощным инструментом современной молекулярной биологии — с их помощью можно проводить как сугубо фундаментальные исследования генома человека, так и медицинскую диагностику. За те трудные для российской науки годы, что миновали с момента создания первого биочипа, группе Мирзабекова удалось не только полностью сохранить свои позиции в мире, но и развить эту технологию.

Институт молекулярной биологии (ИМБ) РАН был создан в конце 1950-х годов выдающимся отечественным биохимиком Владимиром Александровичем Энгельгардтом. В те времена, когда слово биология можно было произносить лишь

с прилагательным «мичуринская», В. А. Энгельгардту удалось сделать, казалось бы, невозможное — создать институт, в котором биологи, химики и физики могли заниматься современными направлениями наук о жизни, причем без оглядки на высказывания и

деятельность академика Т. Д. Лысенко, определявшего отношение правительства к работам биологов. Самой крупной уступкой было то, что институт пришлось назвать Институтом радиационной и физико-химической биологии, и лишь после падения Т. Д. Лысенко он был переименован в Институт молекулярной биологии (ИМБ) (рис. 1). С момента создания и до настоящего времени ИМБ является одним из ведущих научных центров, занимающихся изучением молекулярных механизмов процессов, происходящих в живых организмах.

Среди самых известных достижений коллектива института — фундаментальные открытия в структуре хромосом, синтез нового эффективного препарата против СПИДа, получившего признание во многих странах, новых противовирусных лекарств, метод



Рис. 1. Здание Института молекулярной биологии РАН им. В. А. Энгельгардта

геномной дактилоскопии для идентификации личности, с помощью которого были идентифицированы останки царской семьи, выдающиеся достижения в клеточной биологии, химии ферментов, в создании биосенсоров и многое другое.

Программа «геном человека» — старт технологии биочипов

В 1989 году, благодаря инициативе и усилиям сотрудника ИМБ академика А. А. Баева, наша страна первая в мире приняла решение о начале работ по национальной программе «Геном человека». Вскоре после этого США и другие страны также объявили об организации своих национальных программ. Эти программы были нацелены на выявление всех генов человека и выяснение механизмов их функционирования. В дальнейшем национальные научные программы были объединены в рамках международного научного совета, в работе которого участвовали выдающиеся ученые различных стран, в том числе десятки лауреатов Нобелевской премии.

Международная программа «Геном человека» оказалась первым эффективным примером мирового со-

трудности на прорывных научных направлениях. Установление структуры генома человека, а затем многих бактерий, животных и растений явилось фундаментом для более глубокого понимания молекулярных процессов, происходящих в сложных многоклеточных организмах.

Результатом этих исследований явилось открытие десятков тысяч генов, небольшие изменения в которых ответственны за проявление генетических особенностей, за предрасположенность к различным обменным заболеваниям, за индивидуальную чувствительность к медицинским препаратам и т.д. В связи с этим возникла настоятельная необходимость анализа одних и тех же участков генома у разных индивидуумов. Для проведения таких анализов необходимо появление принципиально новых технологий, позволяющих с высокой эффективностью сравнивать гомологичные участки генома. Одной из таких технологий и является технология биологических микрочипов, которые подобно электронным микрочипам позволяют в достаточной мере простыми экспериментами собирать и обрабатывать огромные объемы биологической информации.

Материальным носителем наследственности живых организмов является ДНК, которая содержит всего четыре разных нуклеотида, условно называемых А, Т, G, С. Чередувание

числе предрасположенность к заболеваниям. Для определения нуклеотидной последовательности различных участков генома человека предполагалось широкомасштабное использование ранее разработанных методов. Вместе с тем, казалось логичным направить усилия на разработку и применение принципиально новых подходов, которые были бы способны резко ускорить получение необходимых результатов. Серия таких подходов, основанных на так называемом секвенировании гибридизацией, была предложена в 1988 г. одновременно нами, учеными из Югославии и из Англии.

Общепринятый метод определения нуклеотидной последовательности — это чтение текста «по буквам», одна за другой, а мы решили, что с помощью биочипов можно читать последовательность ДНК «по словам». Известно, что ДНК является двойной спиралью, причем нуклеотиды одной нити спирали образуют высокоспецифичные (комплементарные) пары с нуклеотидами другой спирали. Таким образом, имея набор всех возможных вариаций одной нити ДНК определенной длины, служащих словами-зондами, можно выявить в анализируемом растворе образца ДНК наличие участков, комплементарных используемым ДНК-зондам. А затем по списку прореагировавших зондов можно приступить к восстановлению всего текста.

ментарного нуклеотида. Если ДНК анализируемого образца содержит какую-либо метку, которая может выявляться с помощью соответствующего оборудования, то по величине сигнала можно судить о наличии и количестве образовавшихся двойных спиралей. Такой подход оказался весьма эффективным для анализа вариаций известных генов при различных заболеваниях, а также у разных организмов, принадлежащих к одному виду (полиморфизм генов) или к разным видам (анализ гомеологических генов).

Основы нашей технологической платформы сегодня

Базовая технологическая платформа, созданная учеными ИМБ, основана на том, что молекулы зондов находятся в толще трехмерных полусферических гелевых ячеек биочипа. Благодаря использованию объема удается закрепить существенно большее число молекул зонда в каждой ячейке, повысить специфичность взаимодействия, усилить регистрируемый сигнал, увеличивая тем самым надежность анализа. Молекулы зонда находятся в гомогенном водном окружении. Каждый элемент такого микрочипа объемом в доли нанолитра может использоваться как индивидуальная пробирка, в которой можно проводить химические и ферментативные реакции.

На рис. 2 изображен принцип работы нашего биочипа. В ячейках геля иммобилизованы молекулы различных зондов, которые специфически связываются с молекулами анализируемого образца. Каждая молекула образца «помечена» маленькой молекулой, способной светиться при возбуждающем освещении. В тех ячейках, в которых произошло связывание, наблюдается свечение, интенсивность которого пропорциональна специфичности взаимодействия зонда и образца. Картина распределения свечения ячеек микрочипа является индивидуальной характеристикой анализируемого образца.

В ячейках наших биочипов можно закрепить не только нити ДНК, но и многие другие молекулы. При этом биочип оказывается удобным инструментом для высокоспецифичной идентификации в анализируемом образце самых различных компонентов: фрагментов нуклеиновых кислот, белков, токсинов, гормонов, тяжелых металлов и т.д. В силу малых размеров ячеек небольшое количество зонда пригодно для изготовления большого количества биочипов. Поэтому после решения задачи автоматизации производства биочипов стоимость их приближается к стоимости подложки, на которой они изготовлены! А это

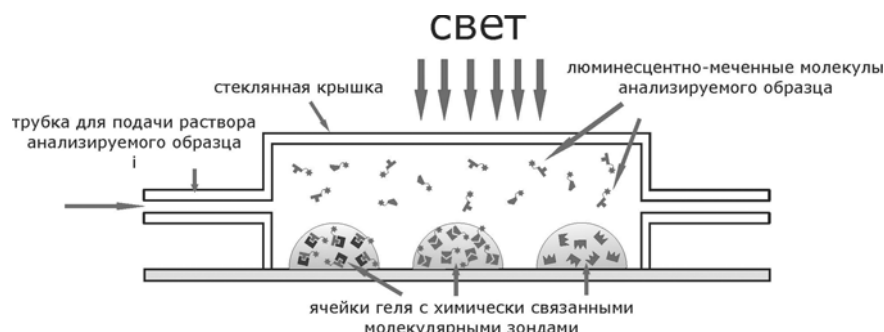


Рис. 2. Схема работы трехмерного биочипа

этих нуклеотидов образует длинные цепи ДНК, причем последовательность этого чередования специфична и кодирует генетическую информацию. Исследования генома человека были направлены, во-первых, на установление полной нуклеотидной последовательности генома (общая длина генома человека превышает 3 млрд нуклеотидов) и, во-вторых, на определение того, каким образом различия в некоторых участках этой последовательности влияют на особенности функционирования аналогичных генов у разных людей, обеспечивая их индивидуальное разнообразие, в том

Впервые в мире силами ученых разных подразделений института нам удалось изготовить биочипы и с их помощью продемонстрировать возможность использования этого подхода. На микроскопном стекле мы расположили ячейки биочипа. В ячейках закрепляли зонды: копии участков одной нити ДНК — в каждой ячейке свой участок, а в разных ячейках — разные. Каждый зонд взаимодействует с комплементарным участком ДНК, находящимся в растворе, образуя двойную спираль. Прочность спирали понижается при наличии в одной из взаимодействующих цепей некомпле-

означает, что такие изделия не просто дешевы в изготовлении, они доступны для массового потребителя.

При проведении экспериментов с помощью биочипов нами используются различные анализаторы. Для фундаментальных исследований, связанных с анализом механизма и кинетики взаимодействия зондов с образцом, применяются высокочувствительные исследовательские анализаторы, содержащие устройства для контроля за ходом реакции в каждой ячейке биочипа в реальном масштабе времени. Эти приборы позволяют работать с любыми красителями в разных спектральных областях, при разных температурах. Для серийных медико-генетических тестирований применяют дешевые, простые в эксплуатации высокопроизводительные клинические анализаторы, позволяющие проводить сотни анализов в день. Подбор зондов и условий их взаимодействия с образцом в этом случае осуществляют предварительно с помощью исследовательских анализаторов. Таким образом, исследовательские анализаторы должны использоваться в научных центрах, где ведутся новые разработки, а клинические анализаторы находят широкое применение в диагностических центрах (рис. 3 а, б).

Биочипы, изначально создававшиеся для решения задач программы «Геном человека», быстро распространяются во многие другие научные и социально значимые сферы деятельности человека. На рис. 4 схематично представлены некоторые наиболее явные сферы применения биочипов, которых с каждым днем становится все больше. Сейчас значимость проводимых нами работ уже ни у кого не вызывает сомнений.

Двустороннее партнерство Россия — США в развитии российской технологии. Главные уроки

Сначала в эту технологию не верили даже многие крупные ученые. На международной конференции, прошедшей в нашем институте осенью 1991 г., нам удалось продемонстрировать и изготовленные нами чипы, и оборудование для их анализа. По материалам конференции мы опубликовали совместную статью с одним из руководителей международной программы «Геном человека» Чарльзом Кантором, после чего началась настоящая гонка в этой области. Это было время, когда в России произошел полный обвал финансирования и закрытие многих программ. Но поскольку значимость наших работ уже стала очевидной, Министерство энергетики США и президиум РАН организовали совместный Центр по развитию тех-

нологии биологических микрочипов. При этом директор Института молекулярной биологии РАН (академик А. Д. Мирзабеков) являлся руководителем этого совместного Центра. Исследования проводились в ИМБ РАН и Арагонской национальной лаборатории. Оборудование в России и в США было идентичное, а ученые работали то в Москве, то в Чикаго «вахтовым методом». В результате такой организации труда за шесть неполных

лет существования с 1994 по 2000 г. на развитие этой технологии Центру было выделено более 20 млн долл., было опубликовано более 40 статей, оформлено 12 патентов. Американцы были поражены эффективностью такой работы и открыли нам «зеленую улицу». Через какое-то время мы взяли все в свои руки и могли приглашать в Центр любого ученого по нашему усмотрению из любого российского института.

Сотрудничество с США в то время обеспечило продолжение работы — в России финансирование прак-

тически отсутствовало, а в США оно было достаточным. Работа в Американской национальной лаборатории научила нас дисциплине, а также нацеленности на быстрое получение правовой защиты изобретений. Полученные уроки научили бороться за финансирование в условиях жесткого конкурсного отбора, взаимодействуя с коммерческими партнерами. Однако со временем стали возникать проблемы: как внешние, так и

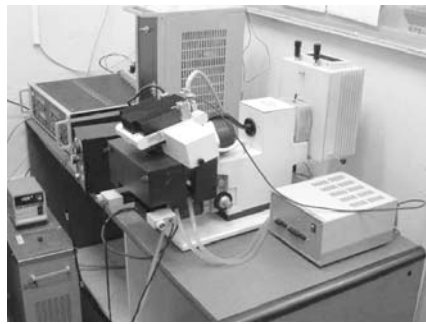


Рис. 3. Анализаторы: а) исследовательские и б) портативные

лет существования с 1994 по 2000 г. на развитие этой технологии Центру было выделено более 20 млн долл., было опубликовано более 40 статей, оформлено 12 патентов. Американцы были поражены эффективностью такой работы и открыли нам «зеленую улицу». Через какое-то время мы взяли все в свои руки и могли приглашать в Центр любого ученого по нашему усмотрению из любого российского института.

Сотрудничество с США в то время обеспечило продолжение работы — в России финансирование прак-

Новое поколение биочипов создано в России и для России

После того как мы расстались с американской лабораторией, стало ясно, что работать надо еще быстрее,



Рис. 4. Сферы применения биочипов

еще интенсивнее, и, кроме того, надо быть более нацеленными на практические применения разрабатываемых нами биочипов и, в первую очередь, в России.

Созрела концепция широкого диагностического применения отечественных биочипов в медицине. Произошла определенная смена приоритетов, продиктованная практикой и экономическими реалиями: от сложных чипов к простым вариантам, востребованным практикой и необъятными возможностями российского рынка.

В последние годы нами была разработана принципиально новая технология биочипов, защищенная патентом, принадлежащим лишь российской стороне. Эта технология обладает простотой, высокой воспроизводимостью и легкостью автоматизации при серийном производстве. Тесное сотрудничество с различными клиниками привело к созданию широкого набора специализированных и дешевых биочипов для диагностики различных заболеваний. Уже в настоящее время в Минздраве России заканчивается процесс сертификации наборов на базе биочипов для выявления различных форм туберкулеза. Эти наборы особенно важны в нашей стране, где во многих регионах распространение туберкулеза граничит с эпидемией, причем появляется все большее количество больных с опасными формами туберкулеза, устойчивыми к стандартно применяемым лекарствам. В настоящее время диагностика таких форм занимает 6-8 недель, за это время больной может заразить многих окружающих, а зачастую, и умереть, не получая

необходимых лекарств. Разработанная нами технология позволяет выявить лекарственно устойчивые формы туберкулеза менее, чем за сутки и оперативно начинать адекватный курс лечения. Мы надеемся, что после завершения сертификации эта технология найдет широкое применение не только в России, но и в других странах с большим количеством больных туберкулезом (рис. 6).

Нами подготовлены и в ближайшее время будут сертифицированы наборы для идентификации типов рака крови и для выявления в донорской крови возбудителей инфекционных заболеваний. Этот перечень может быть значительно расширен уже в ближайшие годы.

В последнее время большую опасность представляет угроза применения биологического оружия против мирного населения. Мы все помним, какая паника возникла в США, когда по почте стали приходить конверты, содержащие споры возбудителей сибирской язвы. Нами разработаны биочипы для выявления возбудителей си-

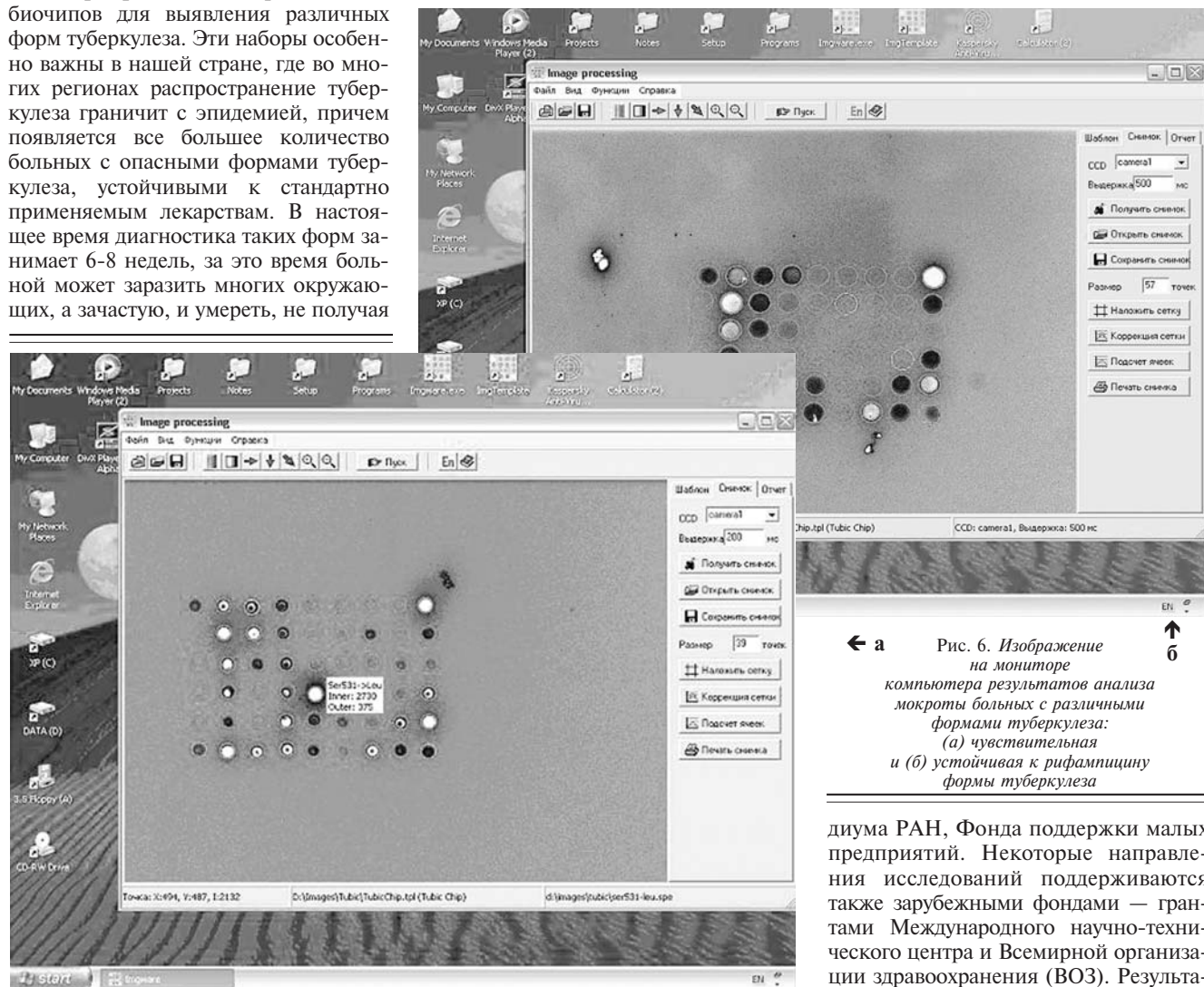
бирской язвы, оспы и ряда других особо опасных инфекций.

Внедрение технологии биочипов тесно связано с налаживанием серийного производства диагностических биочипов, приборов-анализаторов и наборов реактивов для анализа. Этим занимается созданная при институте фирма «Биочип-ИМБ».

Инновационная деятельность и новые механизмы партнерства

Разумеется, развитие новой технологии (а биочипы — это не просто новая технология, это будущая новая отрасль промышленности), кроме научных вопросов, заставляет решать и множество вопросов чисто практических — инженерных, организационных, наконец, коммерческих. Во всем мире доведением и отработкой технологии до состояния, пригодного в массовом применении, занимаются специализированные компании.

Наша научная деятельность поддерживается грантами Минпромнауки России, Российского фонда фундаментальных исследований, Прези-



← а Рис. 6. Изображение на мониторе компьютера результатов анализа мокроты больных с различными формами туберкулеза: (а) чувствительная и (б) устойчивая к рифампицину формы туберкулеза ↑ б

диума РАН, Фонда поддержки малых предприятий. Некоторые направления исследований поддерживаются также зарубежными фондами — грантами Международного научно-технического центра и Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). Результа-

ты наших исследований опубликованы в ведущих научных журналах (более 60 публикаций) и защищены патентами во многих странах (всего более 20 патентов).

Вместе с тем, самое сложное в российских условиях — создать работающий экономический механизм, когда готовая лабораторная разработка сможет привлечь «долгие деньги», не исчезающие где-то в «оффшорах», а обеспечивающие создание производства новой продукции с помощью высококвалифицированных инженеров и техников. Если потребитель в условиях весьма конкурентного рынка медицинских услуг и диагностики будет готов заплатить за новую продукцию, если государственные медицинские организации смогут при внедрении этой новой продукции в свою практику обеспечить менее затратное и более эффективное лечение больных — экономический механизм сработает. Потребитель оказывается в выигрыше, предприятие сможет развивать свои мощности и платить своим работникам высокую зарплату, ученые-разработчики получат свои гонорары и премии. А государство будет обладать новой отраслью, приносящей налоговые поступления, и одновременно достигнет экономии бюджетных средств для нашего небогатого здравоохранения.

Во всей этой схеме ключевым звеном является связь между интеллектуальной собственностью на результаты научной деятельности и развитием производства. Придуманной сотни лет назад механизм патентной защиты при передаче изобретения в промышленность прекрасно работает в развитых странах и — очень плохо в России. Коммерциализация технологий для нашего научного сообщества — это то самое «новое — хорошо забытое старое». Учиться приходится почти с нуля — до 1991 года проблема просто не возникала!

В рамках данной статьи не перечислить всех сложностей, сопряженных с созданием в России эффектив-

ного экономического механизма, при котором изобретения не уходят «в песок» и не продаются за гроши, а помогают «раскрутить» инновационное производство, да еще при этом обеспечивают финансовую поддержку новых изысканий разработчиков технологии. Ученые, инженеры и управленцы из ИМБ РАН пробуют сделать это локально — на примере биологических микрочипов и других достижений, которыми они обладают.

Созданная в 2002 году фирма «Биочип-ИМБ», частично управляемая сообществом ученых-разработчиков, частично — дирекцией института, — попытка создания такого экономического механизма, при котором институту выгодно передавать свои разработки в практику, а производителю и его коммерческим партнерам — выгодно поддерживать научные исследования.

Тандем института и коммерческой компании как нельзя лучше демонстрирует то, как научная разработка — биочипы — может быть применена во многих областях как в науке, так и на практике. По одним направлениям требуется сотрудничество с коллегами из академической или медицинской среды, по другим необходимы коммерческие партнеры как в России, так и за рубежом.

В настоящее время сотрудничество обоих типов быстро развивается по следующим направлениям: онкомаркеры и иммунология, фармацевтика (разработка и тестирование лекарственных средств), микрофлюидика (технологии работы с микрообъемами жидкостей, дополняющие биочипы в части подготовки биологической пробы для анализа), выявление мутаций в генах человека, а также в патогенных вирусах и организмах.

Понимая перспективность и необходимость широкого применения этой технологии в России, Академия наук приняла решение о создании в ИМБ Центра коллективного пользования биочипами. При этом Академия наук выделила деньги для оплаты

пилотных исследований, проводимых в Центре сотрудниками других учреждений. Эти исследования проводятся на основе взаимных усилий. Ученые Центра участвуют в расширении круга областей, в которых используются разработанные ими биочипы, а сотрудники других учреждений осваивают новую эффективную технологию, применяя ее для решения своих исследовательских или диагностических задач.

Подготовка молодых научных кадров

Большое значение для народного хозяйства имеет развитие тех направлений науки, которые дают результаты, обладающие высокой социальной значимостью и не требующие дорогостоящего заимствования зарубежной интеллектуальной собственности. Участие студентов и аспирантов в научно-исследовательских работах, находящихся в настоящий момент на подъеме, позволит будущим молодым специалистам приобрести опыт интенсивной научной работы. К таким направлениям, как мы считаем, безусловно, относится и технология биочипов, развиваемая нами с активным участием студентов и аспирантов разных вузов.

Основой подготовки молодых научных кадров стал Учебно-научный центр, созданный на базе ИМБ РАН с участием МФТИ и МГУ в рамках программы «Интеграция» и получающий дополнительное финансирование по программе РАН «Поддержка молодых ученых». Развитие технологии биочипов способствует активному вовлечению студентов и аспирантов в научно-исследовательскую работу и приобретению навыков доведения результатов НИР до практического применения в научных и медицинских центрах России.

Дополнительную информацию о технологии биочипов и о возможном сотрудничестве можно получить на сайте www.biochip.ru

ВЫСТАВКИ, КОНФЕРЕНЦИИ, СЕМИНАРЫ

Дата	Название события	Место проведения	Координаты организационного комитета
20.05.03— 23.05.03	ТЕХНОЛОГИЯ ИЗ РОССИИ 9-я научно-техническая выставка (отечественные инновационные проекты, прикладная наука, новейшие технологии)	Москва	Дирекция выставок «ЭКСПО РСПП», ГАО ВВЦ Тел.: (095) 748-3946 Факс: (095) 748-3459
27.05.03— 29.05.03	Конференция-выставка «ИНВЕСТИЦИИ В РОССИИ»	Москва	ИД «Рынок ценных бумаг», ЦМТ Москвы Тел.: (095) 105-5157 URL: http://congress.wtcmoscow.ru www.rcb.ru