

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА, ПОЛУЧЕННЫЕ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА (МАТ) КАК
ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

Антитела (Antibody)

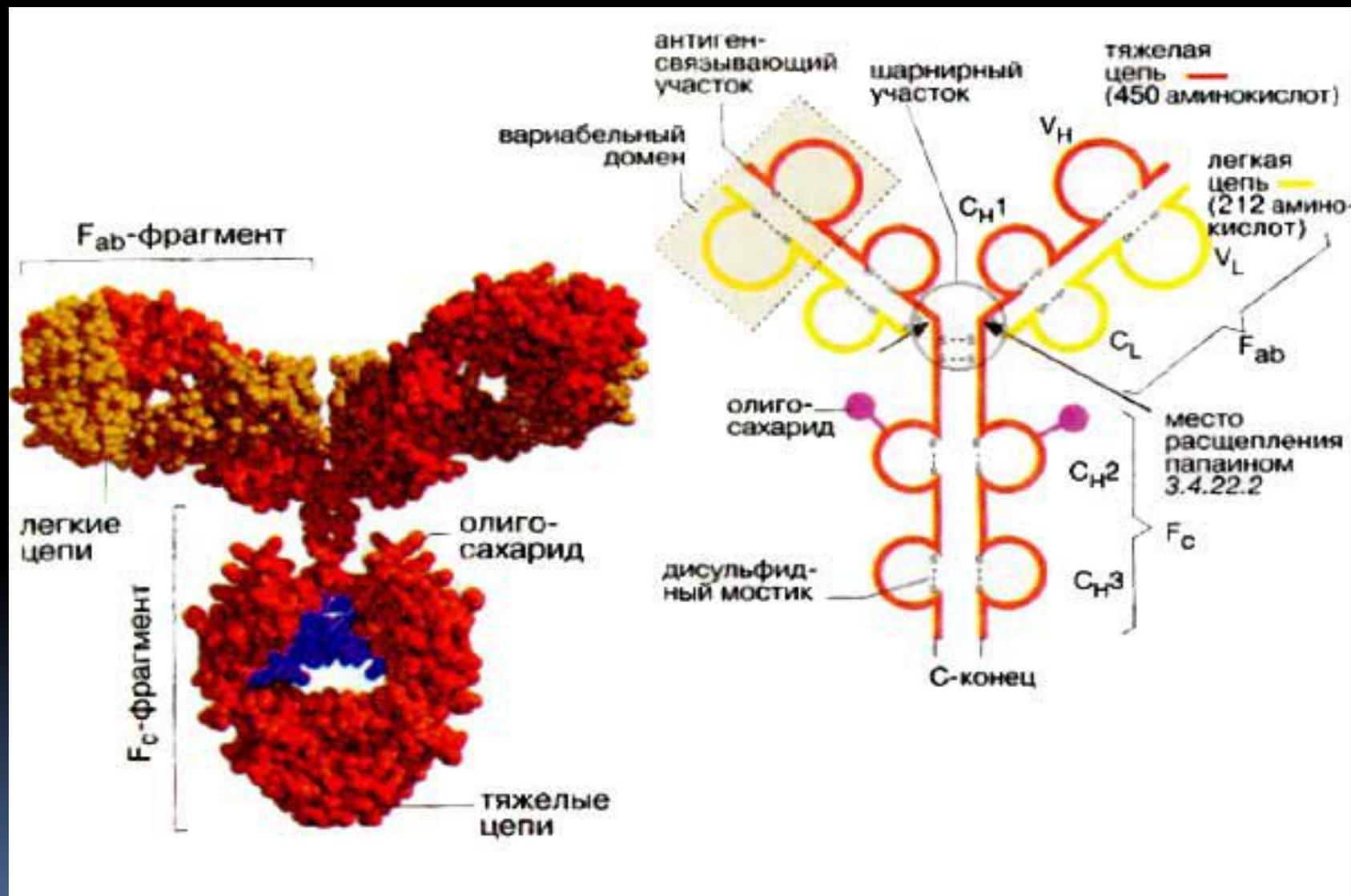
=ИММУНОГЛОБУЛИНЫ

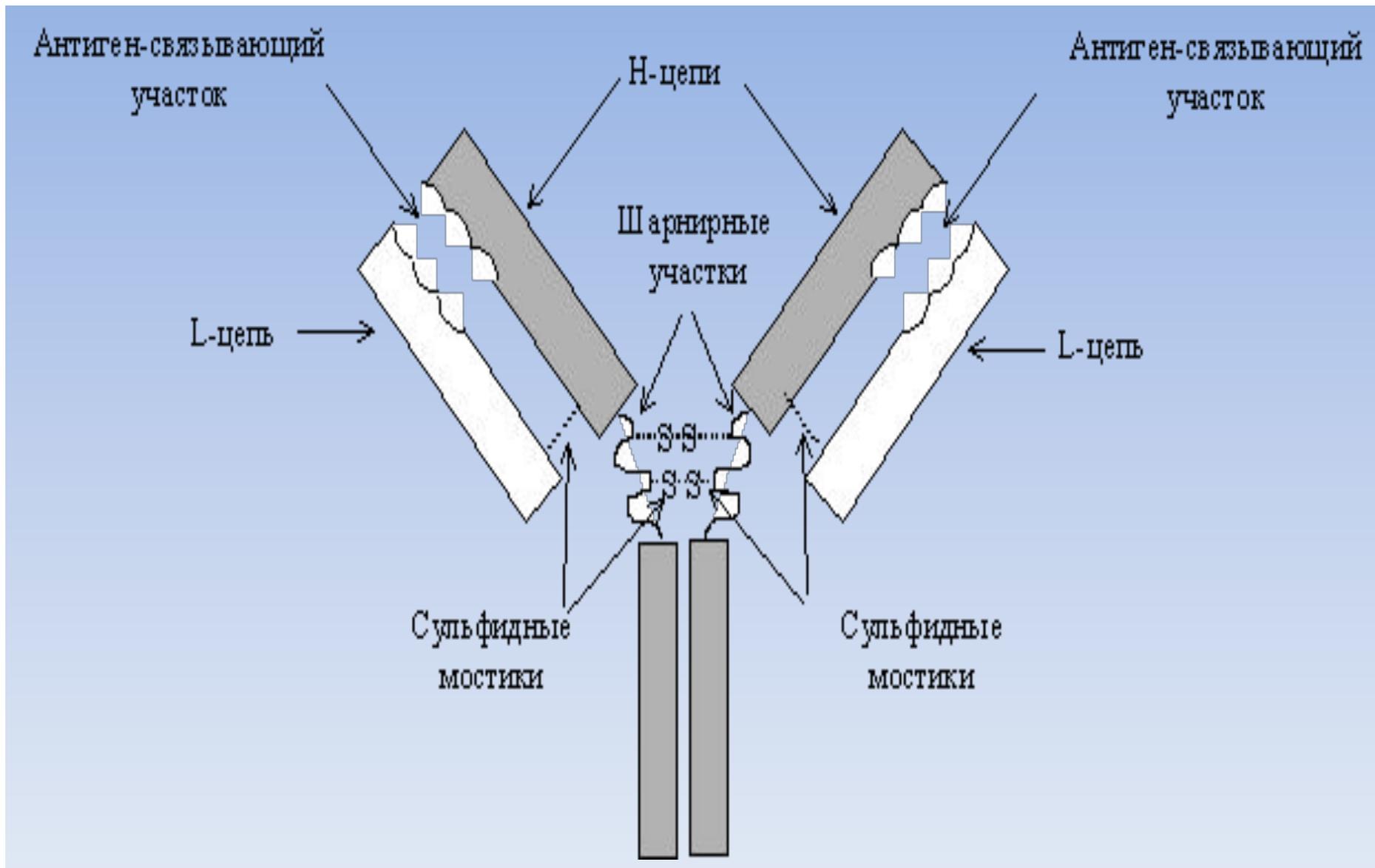
Белки макроорганизма, синтезируемые и экскретируемые ***В-лимфоцитами*** в ответ на попадание в организм различных антигенов и специфически с ними взаимодействующие

Антиген (Antigen) – вещество, воспринимаемое организмом как чужеродное и вызывающее специфический иммунный ответ – выработку антител

- бактерии
- вирусы
- чужеродные белки и токсины
- и т.д.

Структура антитела





Строение антитела.
Схема

Вариабельные области молекулы антитела

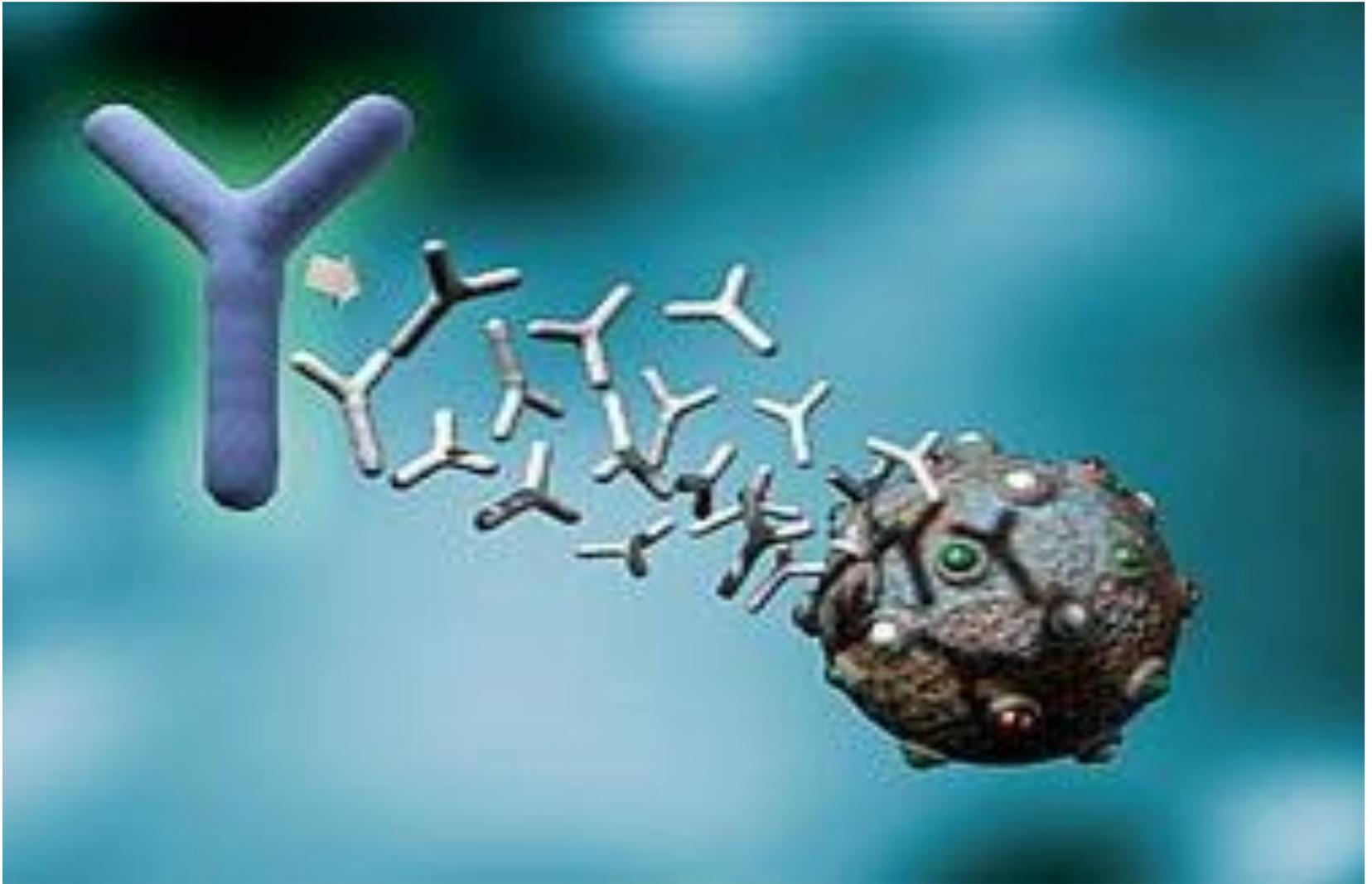
Состоят из трех участков каждая.

Определяют комплементарность антитела к антигену – антигенсвязывающие участки -

CDR1, CDR2 и CDR3 (англ. *Complementarity-determining regions*) . Эти участки образуют вариабельные области (**V_H** и **V_L**) на N-концах тяжелых и легких цепей. В совокупности они образуют **Fv-вариабельный домен** . Для CDR характерна очень высокая изменчивость последовательности аминокислот, что обеспечивает огромную вариабельность антител.

Константные области молекулы антитела

- Каждая L-цепь содержит одну постоянную (константную) область (C_L),
- Каждая H-цепь – три константных области (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3})
- Константные области молекулы антитела обеспечивают присоединение к собственным клеткам макроорганизма, обеспечивающим иммунную защиту (к фагоцитам, к эффекторным клеткам и т.д.) и активизируют их



Система **АНТИГЕН – АНТИТЕЛО**



Взаимодействие АТ с системами естественного иммунитета собственного организма

Опсонизация (от др.-греч. ὀψώνιον — снабжение пищей) — **процесс адсорбции опсопинов на поверхности антигенов (АГ), который стимулирует и облегчает фагоцитоз данных частиц.** Функцию опсопинов могут выполнять как антитела так и комплемент. Антитела связывают патоген фрагментами F_a и F_b , а фрагмент F_c может связываться со специфическими рецепторами **фагоцитов, лейкоцитов** (моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, естественные киллеры), которые синтезируют цитокины или выделяют токсичные вещества, убивающие опсонизированные клетки. Этот процесс вызывает воспаление и повреждает соседние здоровые клетки.

Система комплемента — комплекс белков, постоянно присутствующих в крови. Это каскадная система протеолитических ферментов, предназначенная для гуморальной защиты организма от действия чужеродных агентов. Она участвует в реализации иммунного ответа организма. Является важным компонентом как врождённого, так и приобретённого иммунитета.

Современные направления использования МАТ в фармакотерапии

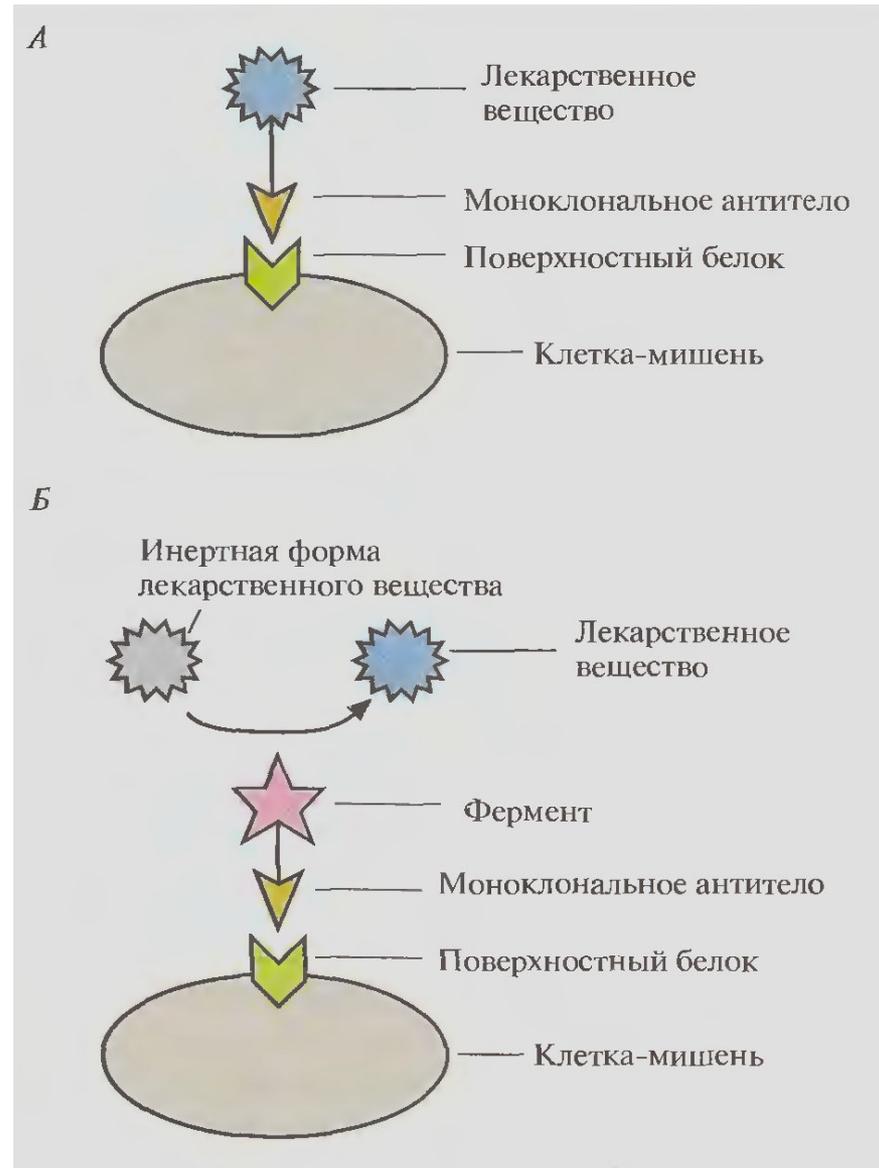
- - для нейтрализации токсинов,
- - для борьбы с бактериями, вирусами,
- - для лечения онкологических заболеваний,
- - для обеспечения направленной доставки ЛВ к мишеням

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАТ ДЛЯ
ДОСТАВКИ ЛВ К МИШЕНЯМ**

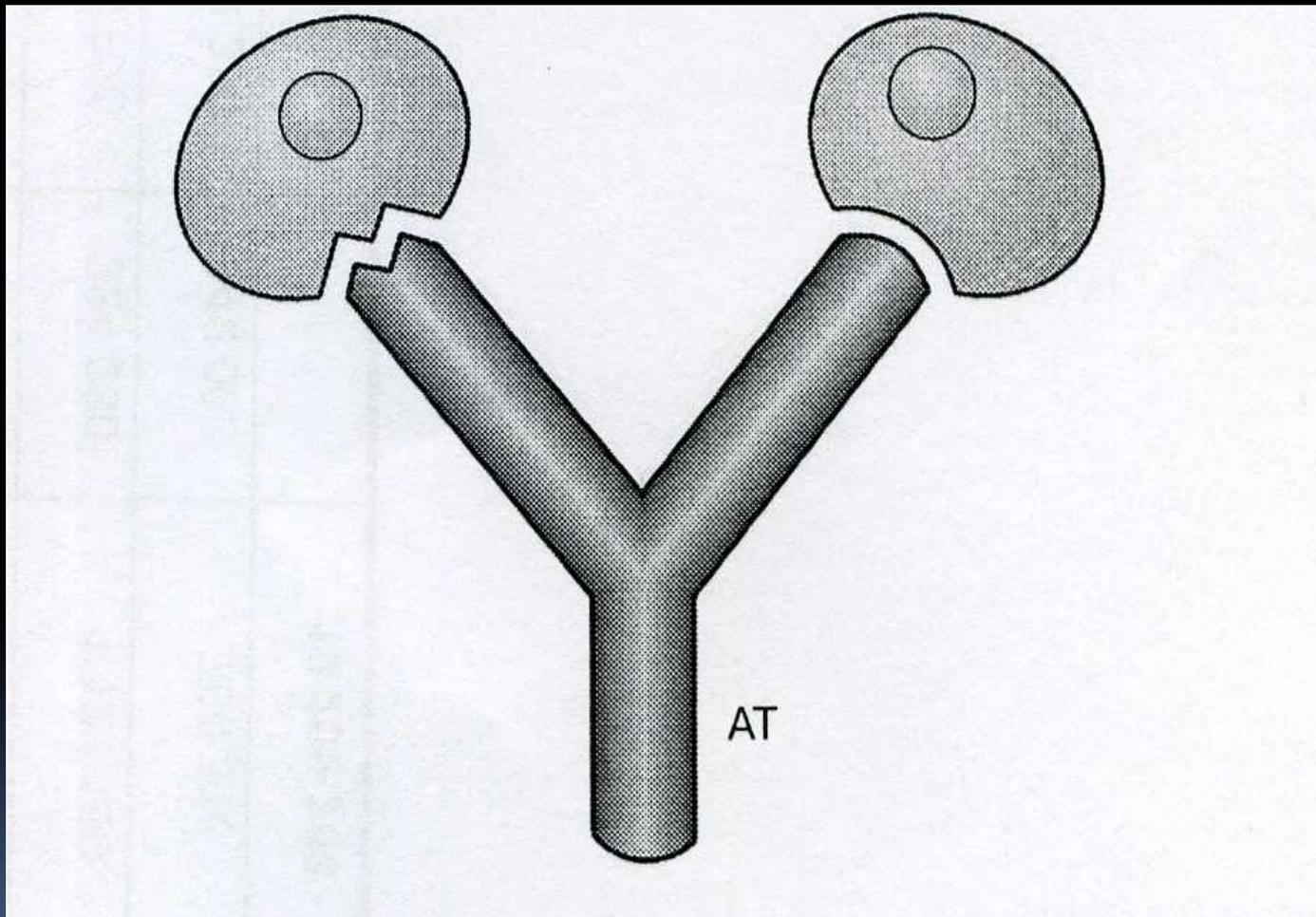
Технология «золотых пуль»

- А** - молекулы ЛВ присоединяют непосредственно к МАТ, специфичным по отношению к белкам, находящимся на поверхности строго определенных клеток мишеней, например раковых.
- Б** - в организм вводится ЛВ в неактивной форме. К МАТ присоединяют фермент, переводящий инертную форму ЛВ в активную только в непосредственной близости от клетки-мишени.

В обоих случаях МАТ связывается со специфическим белком на поверхности клетки-мишени.



Взаимодействие МАТ с клеткой мишенью



Авастин (бевацизумаб)



-Рекомбинантное МАТ (гуманизированное, приближённое к человеческому), которое **селективно связывается с фактором роста эндотелия сосудов (*vascular endothelial growth factor - VEGF*) опухоли и нейтрализует его.**



- В результате *VEGF* не связывается с его рецепторами (*Flt-1, KDR*) на поверхности эндотелиальных клеток, что приводит к угнетению роста опухоли

Тромболитики и антикоагулянты

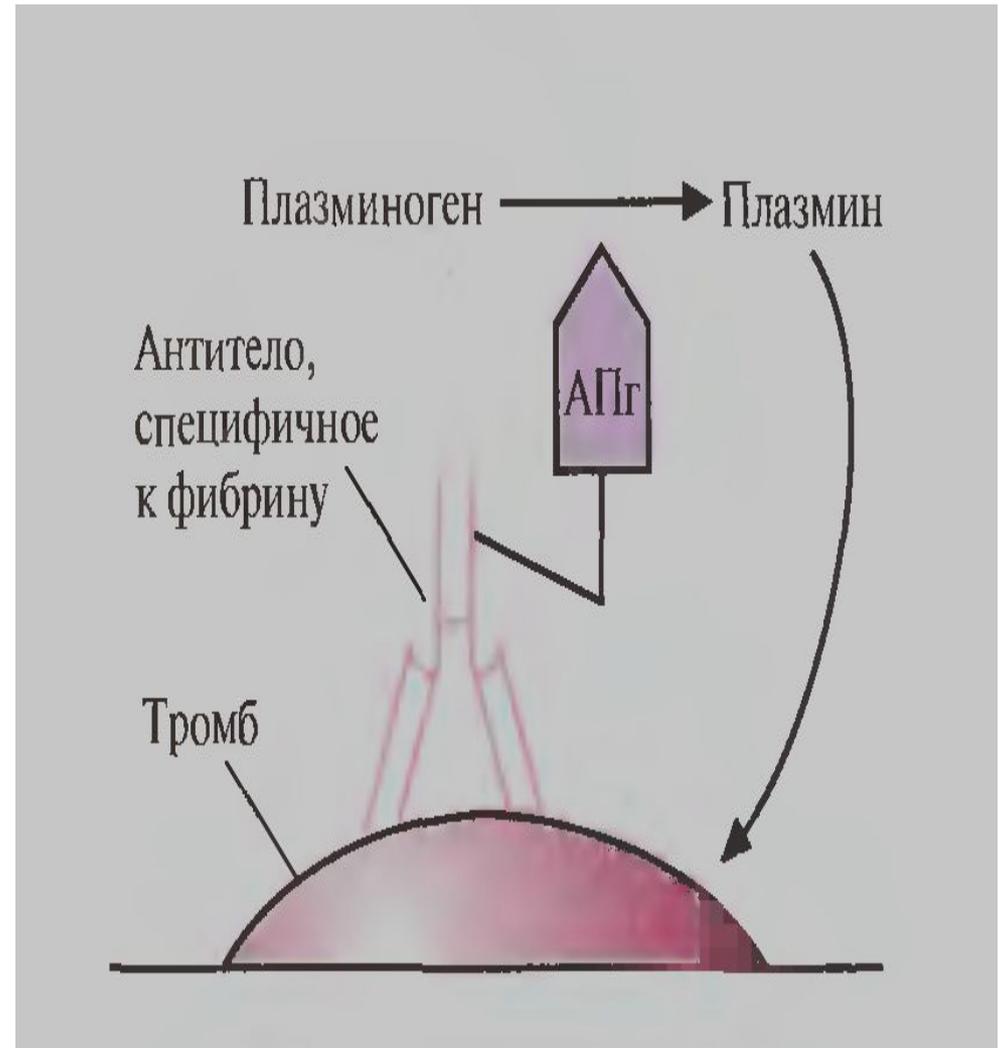
- Тромб состоит из молекул **фибрина**, образующих **сеть**. Сетчатая структура создается под влиянием **факторов свертывающей системы крови** в ответ на повреждение стенки кровеносного сосуда.
- В норме молекулы фибрина в образовавшемся тромбе расщепляются ферментом – **плазмином** сериновой протеиназы (**фибринолизин**). **Плазмин** образуется из **плазминогена** под действием **активатора**. Часто эта система работает неэффективно, что приводит к закупорке артерий.
- Для повышения уровня плазмينا в крови было предложено использовать **активатор плазминогена (АПг)** в качестве ЛС.
- Однако плазмин способен разрушать и фибриноген (предшественник фибрина). И если уровень фибриногена в результате применения АПг снизится слишком сильно, то могут произойти обширные внутренние кровотечения.



Тромболитические препараты, разрушающие фибрин только в образовавшемся тромбе

К АПг «пришили» МАТ, специфичное к фибрину (образовался ИТАПг – имунотерапевтический активатор плазминогена). «Сшитый» комплекс связывается только с фибрином, находящимся в тромбе, в результате АПг вызывает только локальное накопление плазмينا вблизи тромба и плазмин лизирует тромб. При этом значительного разрушения фибриногена в крови не происходит.

В сравнении с АПг вероятность обширных внутренних кровотечений при лечении ИТАПг резко снижается



Тромболитики первого поколения

Стрептокиназа (РУП Белмедпрепараты).

Активатор плазминогена. Получают из β -гемолитического стрептококка группы С. Это не прямой фибринолитик. Стимулирует перевод имеющегося в крови проактиватора в активатор плазминогена. Стрептокиназа проникает внутрь тромба и активирует фибринолиз внутри. Этим выгодно отличается от плазмина.

- Антитела к стрептокиназе исчезают в течение 6 месяцев, иммунологическая побочная реакция появляется лишь у пациентов, перенесших стрептококковую инфекцию.
- Ф. «Phillips Petroleum» (США) запатентовала метод экспрессии стрептокиназы в клетках дрожжей.
- Германия запатентовала получение плазмиды, содержащей ген стрептокиназы. Трансформация плазмиды в клетки стрептококка привела к повышению выхода продукта.

Стрептодеказа

- Пролонгированный препарат стрептокиназы, относящийся к группе иммобилизованных ферментов. Стрептокиназа нанесена на водорастворимую матрицу полисахаридной природы. Длительность действия возрастает до 72 часов после введения средней терапевтической дозы.

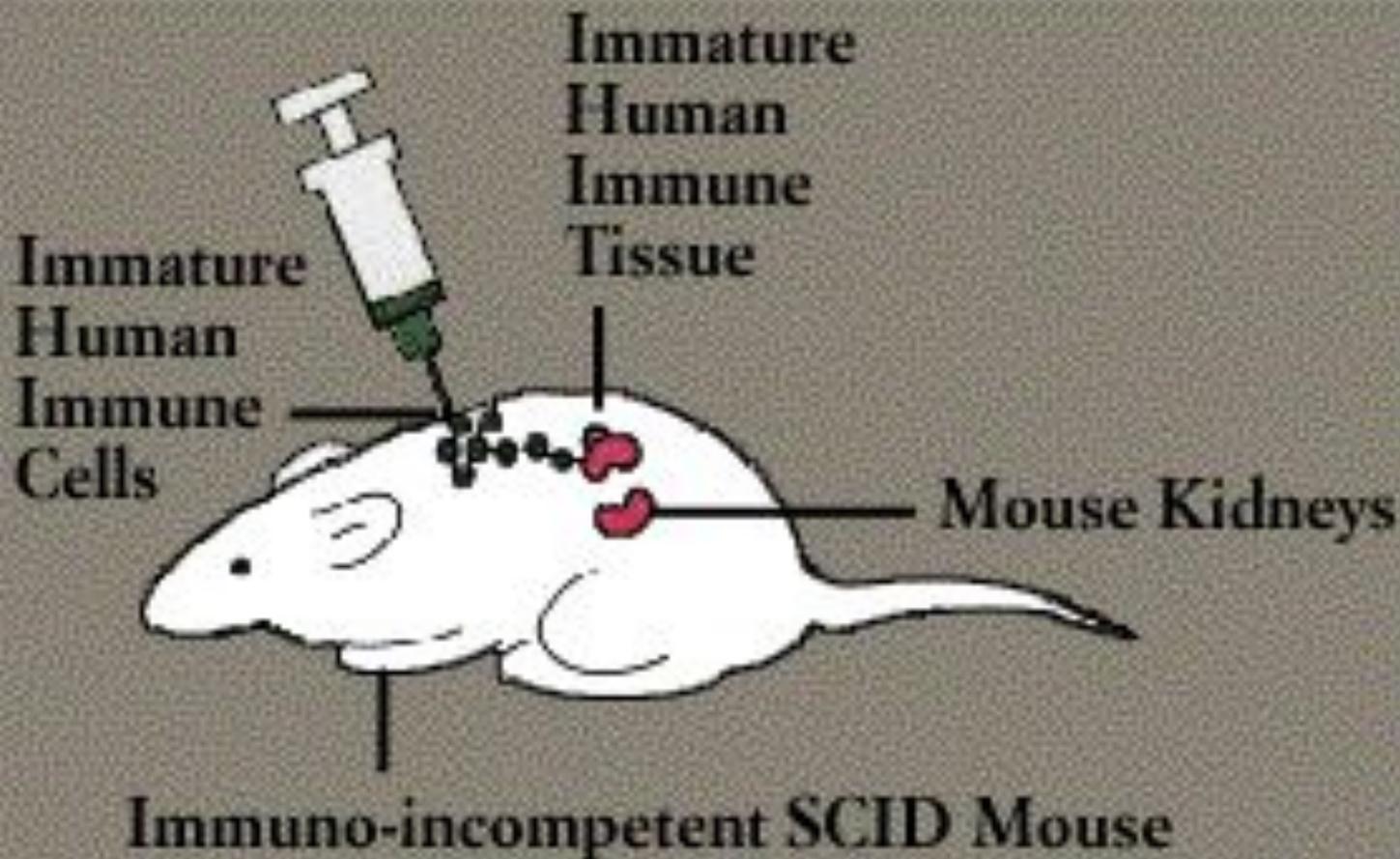
Активаторы плазминогена тканевого типа (тАПг)

- **тАПг** используется для тромболитической терапии острого инфаркта миокарда, закупорки мозговых и коронарных артерий, эмболии легких.
- Выделенный из различных органов и тканей тАПг различается по М.М.
- Ранее получали природный тАПг методом культивирования линии клеток меланомы человека. Очищают меланомный тАПг методом аффинной хроматографии с использованием пяти аффинных сорбентов (конканавалина А, п-аминобензамидина, имидинодиксусной кислоты, борной кислоты, лизина).
- В 80-х годах 20 века разработана **технология рекомбинантного тАПг**. Ген тАПг расположен у человека в хромосоме №8. Его клонирование и экспрессия в клетках *E. Coli* и дрожжевых клетках позволили получить тАПг в промышленных масштабах.
- Сравнительное изучение меланомного тАПг и рекомбинантного тАПг в отношении тромболизиса при инфаркте миокарда показало полную их идентичность.
- Лидеры производства ртАПг – фирмы «Genentech» и «Boehringer Ingelheim»
- Торговые названия соответственно – **activase** и **actilyse**

Активаторы плазминогена урокиназного типа

- Урокиназа – активатор плазминогена, содержащийся в моче человека. Состоит из двух полипептидных цепей, соединенных дисульфидным мостиком. Встречается в высоко- и низкомолекулярной форме, м.м. соответственно 55000 и 34000.
- Получают из культуры клеток почки эмбриона человека. Способна активировать фибринолиз внутри тромба (эндотромболизис) и на его поверхности (экзотромболизис). Урокиназа не обладает выраженными антигенными свойствами, поэтому при ее применении опасность аллергических реакций меньше и ее можно назначать повторно.
- В настоящее время также получают методом генной инженерии. Ген урокиназы локализуется в 10 хромосоме человека. Продукт экспрессии гена урокиназы, клонирован в *E. Coli*.
- Рекомбинантная урокиназа обладает лучшей тромбоселективностью и меньшим числом побочных явлений, в сравнении с природной урокиназой, выделенной из мочи.

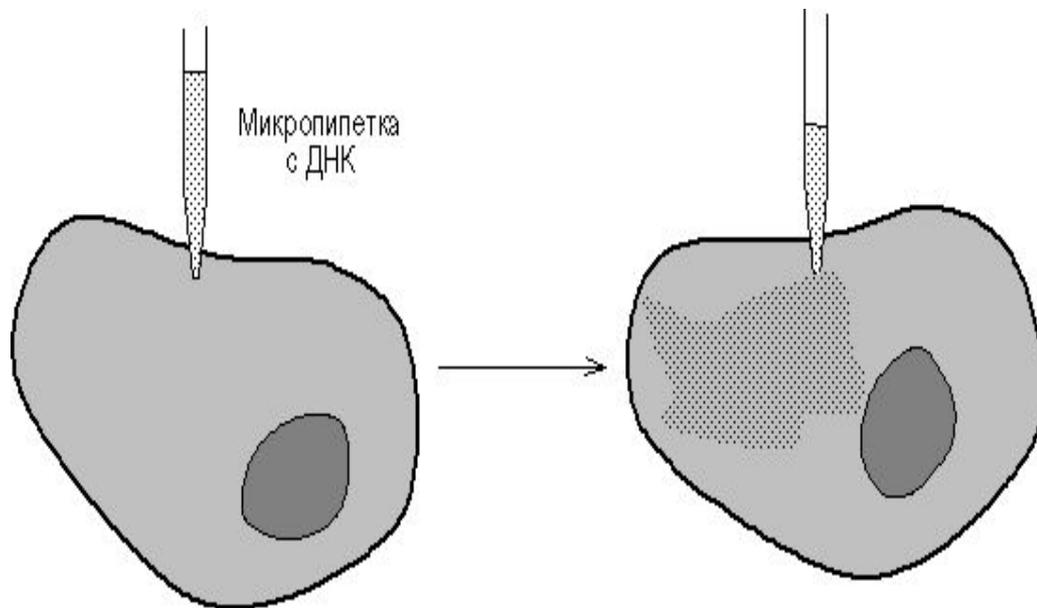
***ПОЛУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ
АНТИТЕЛ ЧЕЛОВЕКА***



Scid - Severe combined immunologic deficiency
генетическое заболевание,
которое характеризуется отсутствием или атипичной формой Т и В лимфоцитов (мыши-мутанты)

- Иммунные стволовые клетки человека трансплантируют Scid мышам, лишенным собственной иммунной системы. Клетки приживаются.

В ответ на введение АГ мыши вырабатывают АТ человека, которые далее собирают и используют как ЛС



2. Использование гибридных технологий.

Гены В-лимфоцитов человека вводят в зародышевые клетки мышей. Клетки имплантируют в матку мыши-матери → формируются трансгенные мыши. Рожденные мыши в ответ на введение АГ среди своих мышинных АТ вырабатывают и АТ человека.

Дифференцирование и отделение человеческих В-лимфоцитов осуществляется путем скрининга положительных клеточных линий (методы см. ранее). Такие лимфоциты культивируют на обогащенных ПС и собирают человеческие АТ специфические к определенному (введенному мышам) АГ

3. Генноинженерный метод (схема)

В **генах**, кодирующих L- и H-цепи иммуноглобулина **человека**, заменили участки, кодирующие переменные домены (V_L и V_H) на аналогичные участки ДНК, кодирующие V_L и V_H -домены антител **иммунизированной мыши**.

ДНК, кодирующие *химерные* цепи, встраивали в экспрессирующий вектор и трансформировали им подходящие клетки-хозяева - клетки культуры β -лимфоцитов.

Из культуры таких клеток и выделяли наработанные **МАТ**.

Химерные МАТ, обладают АГ-связывающей специфичностью мышинового АТ и эффекторными свойствами Fc фрагмента иммуноглобулина человека.

Используют как ЛВ

- Иммуногенность для человека у такого АТ низкая

