

**РЕКОМБИНАТНЫЕ БЕЛКИ И  
ПОЛИПЕПТИДЫ. ИНСУЛИН.  
ИНТЕРФЕРОНЫ. ГОРМОН РОСТА.  
ЭРИТРОПОЭТИН. ВАКЦИНЫ.  
РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВАКЦИНЫ.  
СЫВОРОТКИ. ТРАДИЦИОННЫЕ И ГЕННО-  
ИНЖЕНЕРНЫЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ.  
ОСОБЕННОСТИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА.**

**Лектор к.б.н., Караева Альбина Маирбековна**

## План лекции:

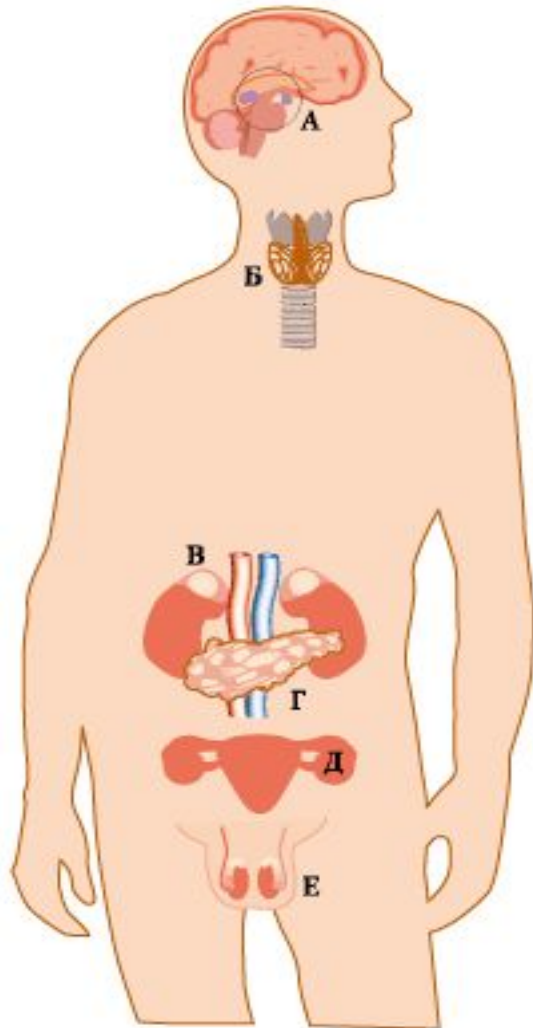
1. Спектр биотехнологического производства рекомбинантных белков
2. Требования к микроорганизмам в производстве рекомбинантных белков
3. Правила безопасности в работе с рекомбинантными белками
4. Промышленное производство рекомбинантного инсулина
  - 4.1 Схема получения рекомбинантного инсулина (фирма Eli Lilly – США)
  - 4.2. Контроль концентрации инсулина в крови человека
5. Интерфероны
6. Гормоны роста человека
7. Вакцины
8. Противоопухолевые антибиотики.

- **Гормоны** (греч. hormaō приводит в движение, побуждать) — вырабатываемые эндокринными клетками биоорганические соединения, отличающиеся высокой специфической биологической активностью.

**Гормональные средства** (praeparata hormonalia) — лекарственные средства, представляющие собой природные гормоны или их синтетические аналоги.

# Эндокринная система

(греч. endon внутри + krinō отделять, выделять)



□ система желез внутренней секреции, а также специализированных структур, локализованных в центральной нервной системе, различных органах и тканях

## Основные эндокринные железы

А - гипофиз

Б - щитовидная, парашитовидная железа

В - надпочечник

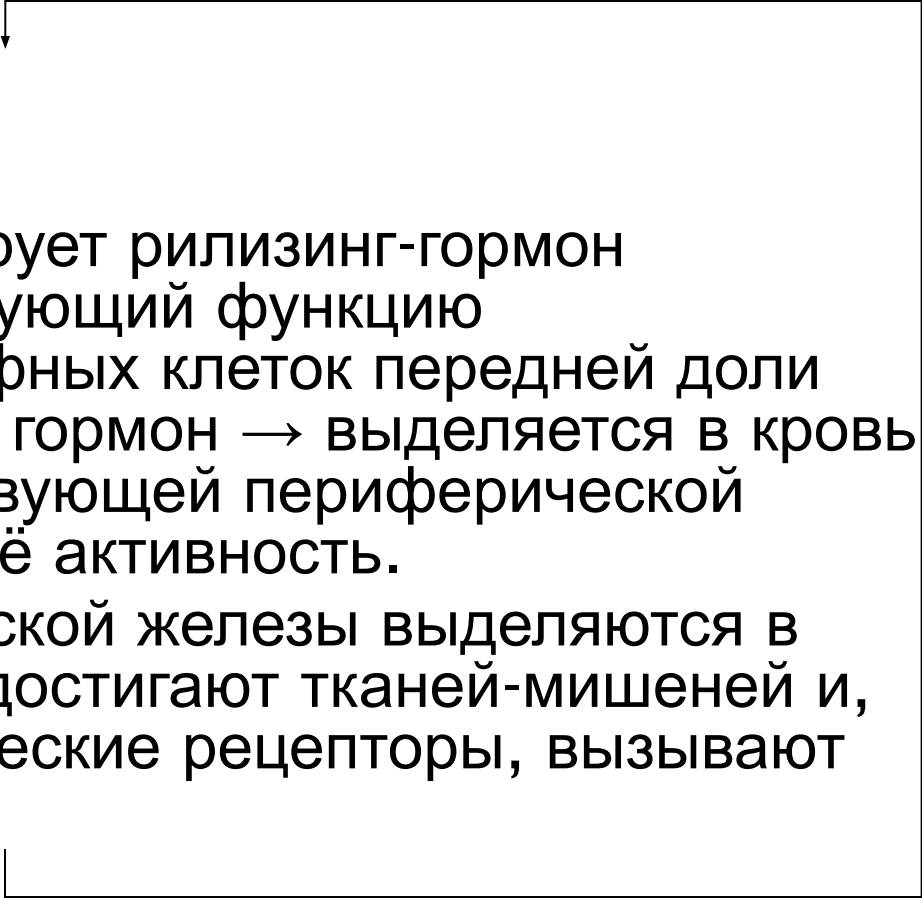
Г - поджелудочная железа

Д - половые железы женщины

Е - половые железы мужчины

- Центральным звеном эндокринной системы являются секреторные ядра гипоталамуса, которые получают информацию из ц.н.с. и переключают ее на аденогипофиз, непосредственно участвующий в регуляции зависимых от него эндокринных органов.
- Периферическое звено эндокринной системы составляют
  - железы, зависимые от аденогипофиза
    - щитовидная железа,
    - кора надпочечников,
    - яичники и тестикулы,
  - железы, не зависимые от аденогипофиза
    - мозговое вещество надпочечников,
    - паращитовидные железы,
    - околофолликулярные клетки щитовидной железы,
    - β-клетки островкового аппарата поджелудочной железы,
    - гормонпродуцирующие клетки желудочно-кишечного тракта
    - вилочковая железа.

# Гипоталамо-гипофизарная система

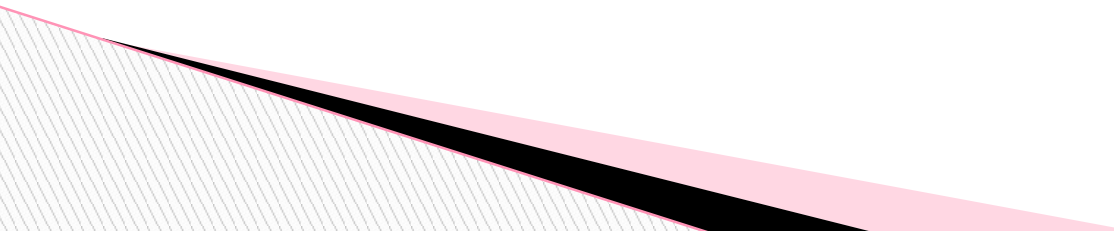
- 
- Гипоталамус продуцирует рилизинг-гормон (либерины), стимулирующий функцию соответствующих трофных клеток передней доли гипофиза, → тропный гормон → выделяется в кровь и достигает соответствующей периферической железы, стимулируя её активность.
  - Гормоны периферической железы выделяются в системный кровоток, достигают тканей-мишеней и, стимулируя специфические рецепторы, вызывают изменения в них.

↓продукции рилизинг-  
гормонов гипоталамуса

# Связь между гипоталамическими, гипофизарными гормонами и гормонами желез-мишеней

Гипоталамический гормон	Гипофизарный гормон	Орган-мишень	Гормоны органа-мишени
<b>Соматотропин-рилизинг-гормон СТРГ ⊕</b>	Гормон роста (соматотропин) СТГ	Печень	Соматомедины
<b>Соматотропин-ингибирующий гормон СТИГ ⊖</b>			
<b>Кортикотропин-рилизинг-гормон КТРГ ⊕</b>	Адренокортикотропин (АКТГ) ⊕	Кора надпочечников	ГКС, минералокортикоиды, андрогены
<b>Тиреотропин-рилизинг-гормон ТТГ ⊕</b>	Тиротропин (ТТГ) ⊕	Щитовидная железа	Тироксин (Т <sub>4</sub> ), трийодтиронин (Т <sub>3</sub> )
<b>Гонадотропин-рилизинг-гормон ГРГ ⊕</b>	Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) ⊕	Половые железы	Эстроген, прогестерон, тестостерон
	Лютеинизирующий гормон (ЛГ) ⊕		
<b>Пролактин-рилизинг-гормон ⊕</b>	Пролактин (ПЛ) ⊕	Лимфоциты	Лимфокины
<b>Пролактин-ингибирующий гормон ⊖</b>		Молочные железы	

# С целью коррекции эндокринных расстройств применяют

- Препараты естественных гормонов
  - Синтетические аналоги естественных гормонов
  - Вещества с гормоноподобным действием
  - Антагонисты гормонов (блокаторы специфических рецепторов, антигормоны)
- 



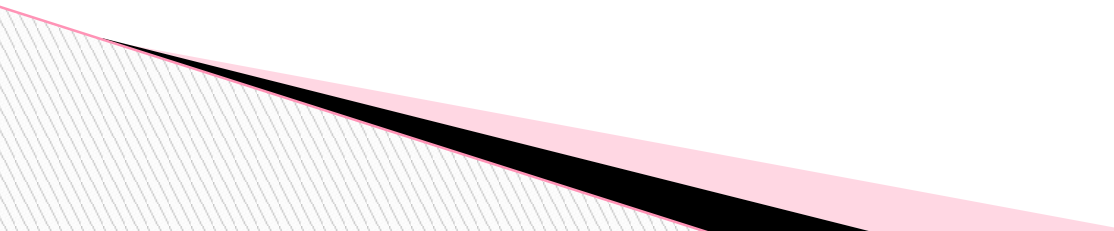
# Общие принципы применения гормональных и антигормональных препаратов следующие

- ▣ **Заместительная терапия** – введение извне препарата гормона при недостаточной его продукции (инсулинотерапия при сахарном диабете, поддерживающие дозы глюкокортикоидов при атрофии коры надпочечников)
- ▣ **Стимуляция** функции периферических желез –
  - применение препаратов гормонов передней доли гипофиза (кортикотропин при атрофии коры надпочечников);
  - применение блокаторов специфических рецепторов гипоталамо-гипофизарной системы, что приводит к активации выделения рилизинг-гормонов гипоталамусом и тропных гормонов передней доли гипофиза (кломифен при ановуляторном бесплодии)
- ▣ **Подавление** функции периферических желез –
  - угнетение синтеза гормона в самой железе (тиамазол при гипертиреозе);
  - Стимуляция специфических рецепторов гипоталамо-гипофизарной системы, что приводит к угнетению выделения рилизинг-гормонов гипоталамусом и тропных гормонов передней доли гипофиза (комбинированные противозачаточные средства для приема внутрь, даназол)

# По химической структуре гормоны могут быть:

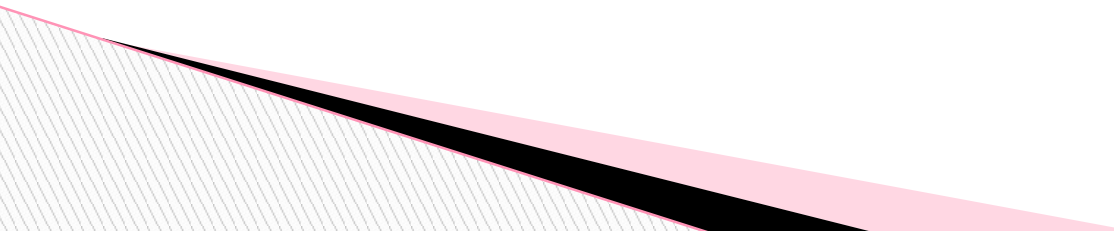
- производными аминокислот - (гормоны щитовидной железы – тироксин, трийодтиронин)
- белкового или пептидного строения
  - небольшими пептидами (например, вазопрессин, окситоцин, соматостатин, ренин),
  - белками (например, инсулин, глюкагон, пролактин, паратгормон (**Паратиреоидный гормон**)),
  - гликопротеинами (например, лютеинизирующий гормон, хорионический гонадотропин),
- стероидами (например, эстрогены, прогестерон, тестостерон, альдостерон),
- аминами (например адреналин, дофамин, мелатонин),
- производными жирных кислот (например, простагландины, лейкотриены) и др.

# По месту образования гормонов в железах внутренней секреции различают

- гипоталамические нейрогормоны,
  - гипофизарные гормоны,
  - кортикостероидные гормоны,
  - половые гормоны и др.
- 

# **Биотехнология рекомбинантных белков**

## **охватывает производство:**

- **гормонов (инсулина)**
  - **вакцин (против гепатита В)**
  - **пептидных факторов роста тканей**
  - **рекомбинантных интерферонов (они представляют неспецифическую защиту клетки от вирусов и злокачественных образований).**
- 

На первом месте среди них по значению стоит рекомбинантный инсулин, составляющий около 30% от всего рынка рекомбинантной продукции. В проблеме производства рекомбинантных белков очень важно, чтобы используемые в этом случае микроорганизмы, в которые вносят чужеродные гены, удовлетворяли бы следующим свойствам:

1. Метаболизм микроорганизма должен быть хорошо изучен, поэтому в качестве продуцентов рекомбинантных белков используют именно такие микроорганизмы: это *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Микроорганизмы должны быть не патогенны.
3. Микроорганизмы должны хорошо и интенсивно размножаться в условиях ферментера.
4. Желательно, чтобы микроорганизм был способен выделять секретируемый им чужеродный белок в среду. Это можно достичь, если ввести в клетку реципиента ген, который синтезирует рекомбинантный белок с дополнительной аминокислотной последовательностью, состоящий из гидрофобных аминокислот. Роль гидрофобных аминокислот состоит в том, что они перетаскивают белок в липидную мембрану, в которой с помощью определенных ферментов (сигнальных протеаз), гидрофобная последовательность отщепляется и образуется нужный целевой продукт – это рекомбинантный белок, выходящий в среду.
5. Должна быть возможность сделать клетки микроорганизмов компетентными для того, чтобы их клеточная стенка была бы проницаема для плазмид.

**Правила безопасности при работе с рекомбинантными микроорганизмами:**

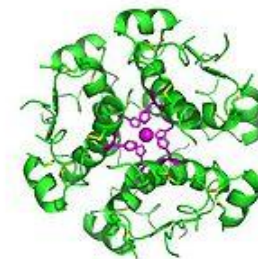
**1. Системы выброса оснащаются фильтрами, задерживающими микробные клетки.**

**2. После завершения процесса производится стерилизация оборудования, но не должно быть разъедания материалов (коррозия), из которых изготовлено оборудование.**

**3. В ферментере понижается давление на несколько миллиметров ртутного столба.**

**4. В клетку продуцента вставляется генетический дефект. Дефект заключается в том, что стираются несколько генов путем делеции, то есть избирательно удаляют гены, продуцирующие какую либо аминокислоту или фермент, синтезирующий витамин. Микроорганизм становится более капризным и уязвимым в случае изменения этой среды и соответственно не жизнеспособным.**

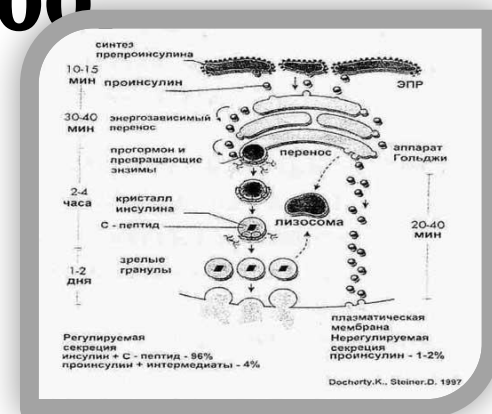
**В среде должна быть обязательно для нормального функционирования микроорганизма именно эта аминокислота или витамин, иначе микроорганизм размножаться не будет и мы не будем иметь целевой продукт.**





# Биосинтез инсулина

- Инсулин синтезируется в базофильных инссулоцитах островков Лангерганса поджелудочной железы из своего предшественника – проинсулина . Проинсулин-одноцепочный полипептид с относительной молекулярной массой около 10000 содержащий более 80 аминокислотных остатков.





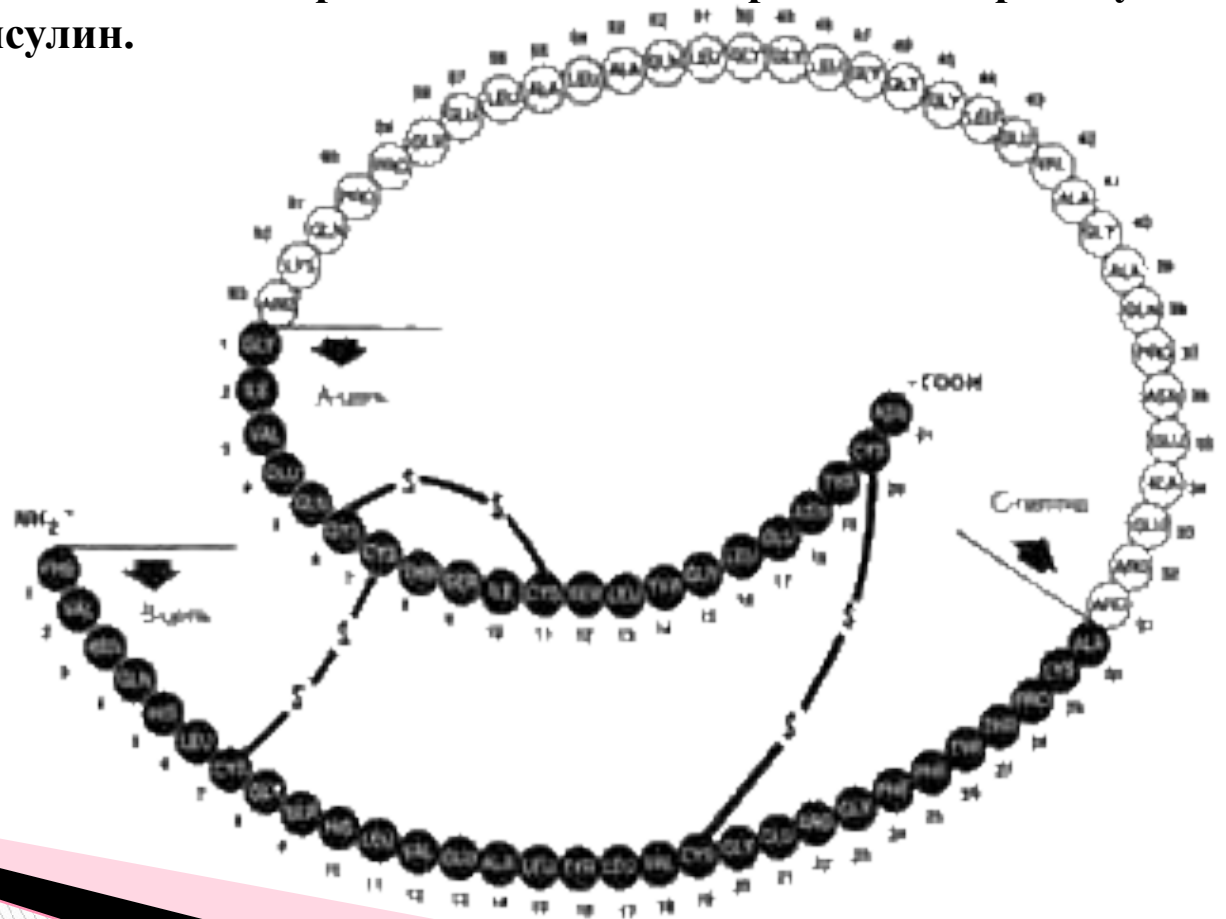
**Итак, инсулин это пептидный гормон, состоящий из двух пептидных цепей:**

**А-цепь состоит из 21 аминокислотных остатков.**

**В-цепь состоит из 30 аминокислотных остатков**

**Эти две цепи связаны бисульфидными SS связями, которые обеспечивают пространственную структуру белка инсулина. При синтезе инсулина в поджелудочной железе вначале образуется предшественник инсулина, так называемый проинсулин. Этот проинсулин состоит из А-цепи, В-цепи и С-пептида, состоящего из 35 аминокислотных остатков.**

**С-пептид отщепляется под действием карбоксипептидазы и трипсина и проинсулин переходит в активный инсулин.**



**Есть разные способы получения инсулина. Мы остановимся на получении инсулина биосинтетическим путем, с точки зрения преимущества этого метода.**

### **Преимущества получения инсулина биосинтетическим путем.**

**До внедрения в промышленность метода получения инсулина с использованием рекомбинантных микроорганизмов существовал только один способ получения инсулина – из поджелудочных желез крупного рогатого скота и свиней. Инсулин, получаемый из поджелудочной железы крупного рогатого скота отличается от инсулина человека на 3 аминокислотных остатка, а инсулин, получаемый из железы свиньи, только на один аминокислотный остаток, то есть он ближе к человеческому инсулину. Тем не менее, при введении белков, отличающихся по структуре от белков человека даже в таком незначительном выражении, возможно возникновение аллергических реакций. Такой инсулин, как чужеродный белок, также может и инактивироваться в крови образующимися антителами.**

**Кроме того, для получения 1 килограмма инсулина требуется 35 тысяч голов свиней (если известно, что годовая потребность в инсулине -1 тонна препарата). С другой стороны, биосинтетическим путем можно получить такое же количество инсулина, проведя биосинтез в 25 кубовом ферментере, используя рекомбинантный микроорганизм *Escherichia coli*.**

Биосинтетический метод получения инсулина стал применяться в начале 80-х годов. Остановимся на схеме получения рекомбинантного инсулина (фирма Eli Lilly- Эли-Лилли, Соединенные Штаты Америки):

**1. этап** Путем химического синтеза были созданы последовательности нуклеотидов, которые кодируют образование А и В цепей, то есть были созданы синтетические гены.

**2. этап.** Каждый из синтетических генов вводят в плазмиды (в одну плазмиду вводят ген, синтезирующий цепь А, в другую плазмиду вводят ген, синтезирующий цепь В).

**3. этап.** Вводят ген, кодирующий образование фермента бетагалактозидазы. Этот ген включают в каждую плазмиду для того, чтобы добиться бурной репликации плазмид.

**4. этап.** Вводят плазмиды в клетку *Escherichia coli* – кишечной палочки и получают две культуры продуцента, одна культура синтезирует А-цепь, вторая В-цепь.

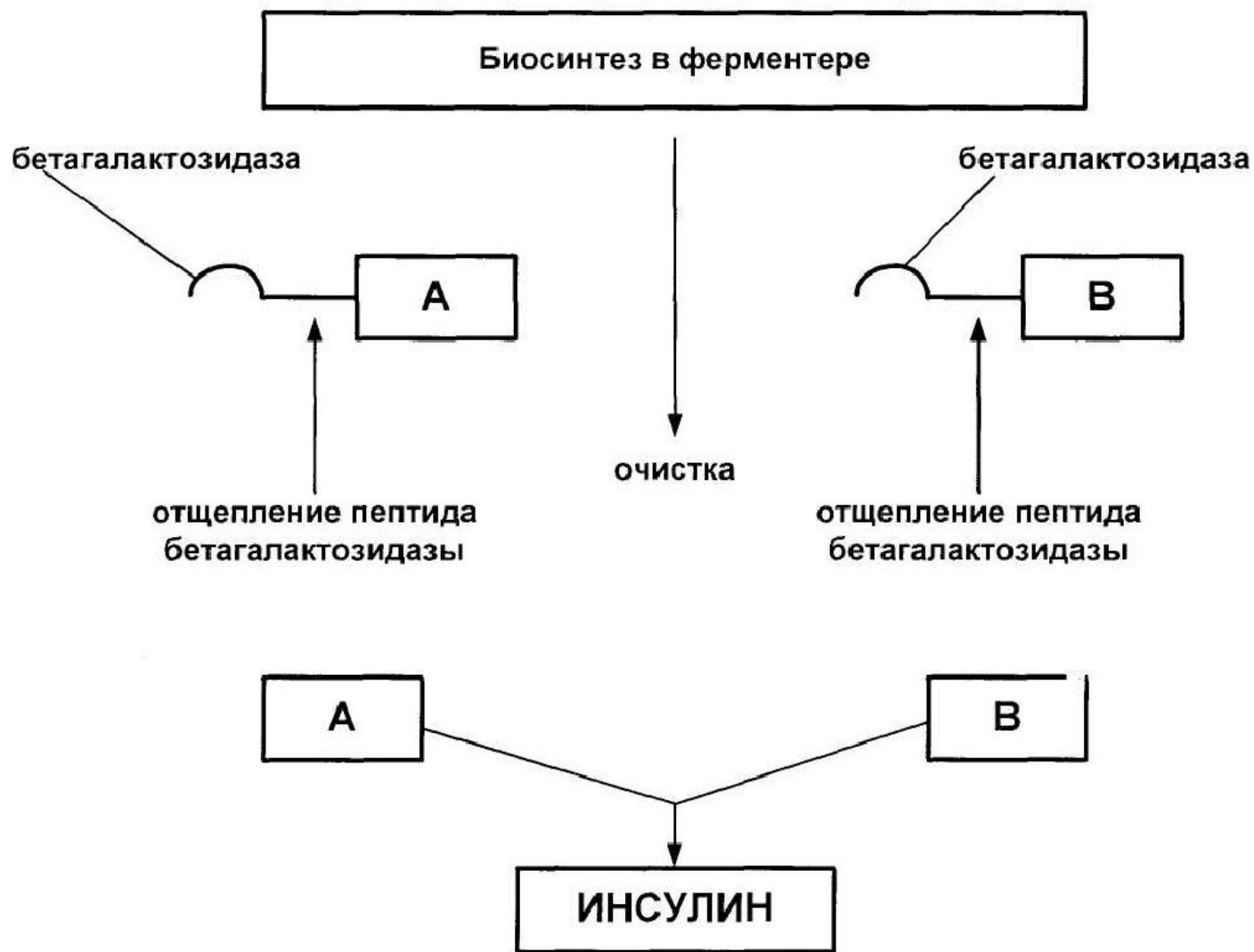
**5. этап.** Помещают две культуры в ферментер. В среду добавляют галактозу, которая индуцирует образование фермента бетагалактозидазы. При этом плазмиды активно реплицируются, образуя много копий плазмид и, следовательно, много генов, синтезирующих А и В цепи.

**6. этап.** Клетки лизируют, выделяют А и В цепи, которые связаны с бетагалактозидазой. Все это обрабатывают бромцианом и отщепляют А и В-цепи от бетагалактозидазы. Затем производят дальнейшую очистку и выделение А и В цепей.

**7. этап.** Окисляют остатки цистеина, связывают и получают инсулин.

Рис.1

## Схема биосинтеза инсулина



Инсулин, полученный этим путем является человеческим инсулином по своей структуре. Применение современных методов очистки исключает наличие в инсулине эндотоксинов и пирогенных примесей.

# Препараты инсулина

- Активность инсулина определяют биологическим путем (по способности понижать содержание сахара в крови у здоровых кроликов).



# Группы препаратов

Короткого действия  
6 часов

Инсулин свиной и КРС

Средней  
продолжительности  
10-12 часов

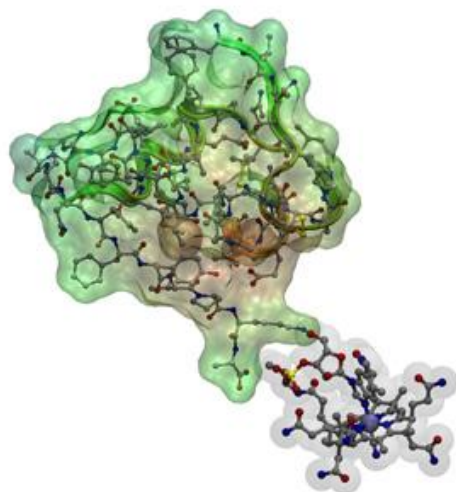
Суспензия цинк-инсулина  
аморфного

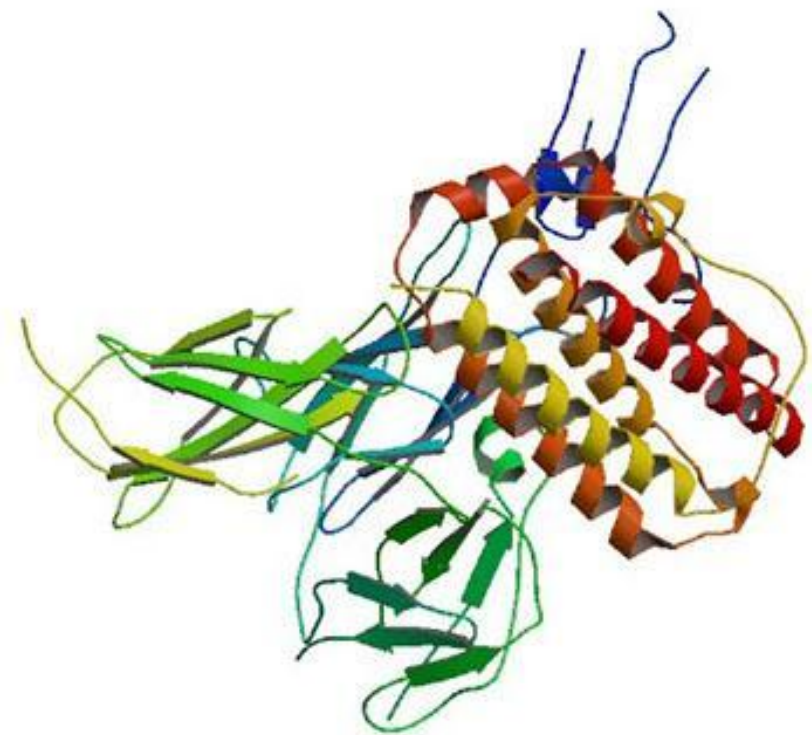
Длительного действия

Протамин-цинк-инсулин  
16-20 часов

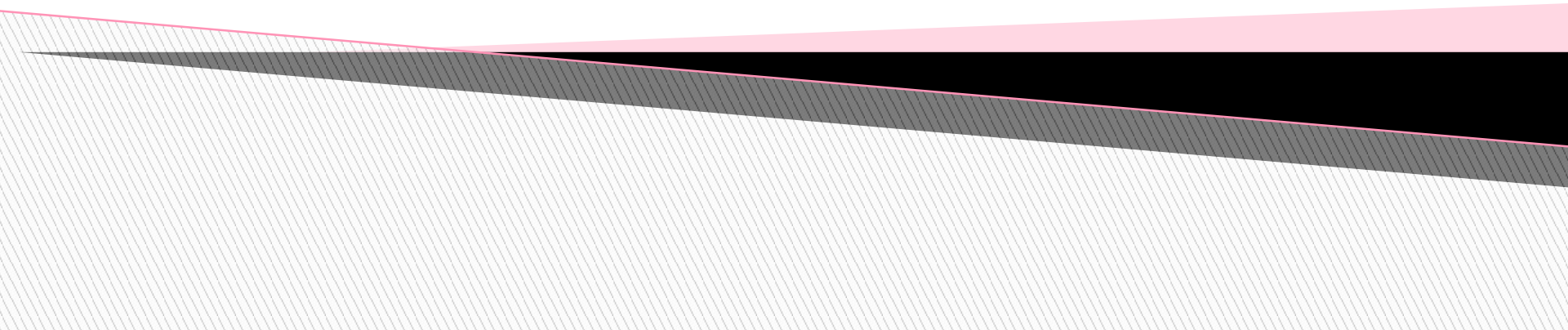
Суспензия цинк-инсулина  
18-24 часа

Суспензия цинк-инсулина  
кристаллического  
30-36 часов





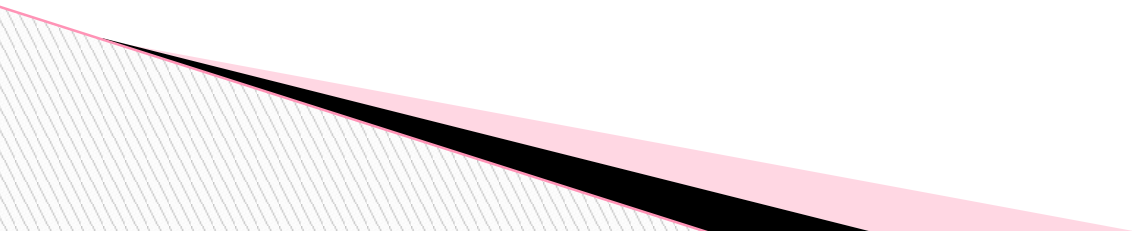
# Интерфероны



▣ **Интерферон** относится к важным защитным белкам иммунной системы. Открыт в 1957 г. А. Айзексом и Ж. Линдеманом при изучении интерференции вирусов (лат. *inter* — между и *ferens* — несущий), т. е. явления, когда животные или культуры клеток, инфицированные одним вирусом, становились нечувствительными к заражению другим вирусом. Оказалось, что интерференция обусловлена образующимся при этом белком, обладающим защитным противовирусным свойством. Этот белок назвали интерфероном. В настоящее время интерферон достаточно хорошо изучен, известны его структура и свойства, и он широко используется в медицине как лечебное и профилактическое средство



**□ Интерферон представляет собой семейство белков-гликопротеидов с молекулярной массой от 15 до 70 кДа, которые синтезируются клетками иммунной системы и соединительной ткани. В зависимости от того, какими клетками синтезируется интерферон, выделяют три типа:  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -интерфероны**



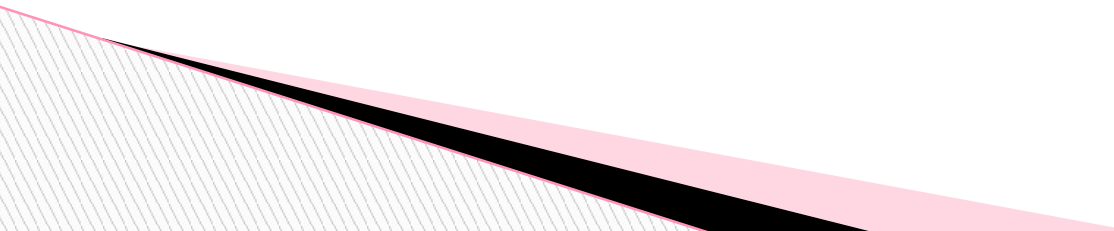
- **Альфа-интерферон** вырабатывается лейкоцитами и он получил название лейкоцитарного;
- **Бета-интерферон** называют фибробластным, поскольку он синтезируется фибробластами — клетками соединительной ткани.
- **гамма-интерферон** — иммунным, так как он вырабатывается активированными Т-лимфоцитами, макрофагами, естественными киллерами, т.е. иммунными клетками.

□ Интерферон синтезируется в организме постоянно, и его концентрация в крови держится на уровне примерно 2 МЕ/мл. Выработка интерферона резко возрастает при инфицировании вирусами, а также при воздействии индукторов интерферона, например РНК, ДНК, сложных полимеров. Такие индукторы интерферона получили название *интерфероногенов*.

1 ЦПД<sub>50</sub> — доза вируса, вызывающая цитопатический эффект у 50 % зараженных культур клеток (обычно пробирок с культурами клеток).

(1 международная единица — МЕ — это количество интерферона, защищающее культуру клеток от 1 ЦПД<sub>50</sub> вируса).

□ ***Механизм действия*** интерферона сложен. Интерферон непосредственно на вирус вне клетки не действует, а связывается со специальными рецепторами клеток и оказывает влияние на процесс репродукции вируса внутри клетки на стадии синтеза белков. Действие интерферона тем эффективнее, чем раньше он начинает синтезироваться или поступать в организм извне. Поэтому его используют с профилактической целью при многих вирусных инфекциях, например гриппе, а также с лечебной целью при хронических вирусных инфекциях, таких как парентеральные гепатиты (В, С, D), герпес, рассеянный склероз и др.

- **Интерферон дает положительные результаты при лечении злокачественных опухолей и заболеваний, связанных с иммунодефицитами. Интерфероны обладают видоспецифичностью, т. е. интерферон человека менее эффективен для животных и наоборот. Однако эта видоспецифичность относительна.**
- 

## Получают интерферон двумя способами:

- ▣ а) путем инфицирования лейкоцитов или лимфоцитов крови человека безопасным вирусом, в результате чего инфицированные клетки синтезируют интерферон, который затем выделяют и конструируют из него препараты интерферона;
- ▣ б) генно-инженерным способом — путем выращивания в производственных условиях рекомбинантных штаммов бактерий, способных продуцировать интерферон.

**В настоящее время как в России, так и за рубежом выпускаются коммерческие препараты: человеческий лейкоцитарный, лимфобластный «Велферон», фибробластный (Ферон); рекомбинантные альфа-(Реаферон, Реальдерон, Виферон, Гриппферон), бета- и гамма-интерферон (Гаммаферон).**

**Рекомбинантные интерфероны нашли широкое применение в медицине как профилактические и лечебные средства при вирусных инфекциях, новообразованиях и при иммунодефицитах.**





Человеческий лейкоцитарный интерферон во флаконах



# Индукторы интерферона

- **Индукторы интерферона — это вещества природного или синтетического происхождения, стимулирующие в организме человека продукцию собственного интерферона, который способствует формированию защитного барьера, препятствующего инфицированию организма вирусами и бактериями, а также регулирует состояние иммунной системы и ингибирует рост злокачественных клеток.**
- **Перспективными интерферогенами являются низкомолекулярные производные акридонуксусной кислоты (карбоксиметилакридон - СМА), а также различные производные флуоренонов. Примером известнейших лекарственных препаратов-индукторов интерферона являются циклоферон и тилорон.**

# Интерлейкины

- **Интерлейкины** — группа цитокинов, синтезируемая в основном лейкоцитами (по этой причине было выбрано окончание «-лейкин»). Также производятся мононуклеарными фагоцитами и другими тканевыми клетками. Интерлейкины являются частью иммунной системы.
- Интерлейкины (ИЛ) - цитокины, ответственные за межклеточные взаимодействия между лейкоцитами. Описано около 20 интерлейкинов.

# Гормоны роста человека

Гормон роста человека, или соматотропин, синтезируется в головном мозге человека в передней доли гипофиза.

Впервые он был выделен из трупного материала и очищен в 1963 г. При недостатке соматотропина развивается гипофизарная карликовость, частота встречаемости которой оценивается от 7 до 10 случаев на миллион человек. Гормон обладает видовой специфичностью, т. е. в отличие от инсулина гормоны роста животных не имеют активности в организме человека. Следовательно, единственным средством излечения гипофизарной карликовости является гормон гипофиза, который выделяли из трупов. Исследования показали, что при внутримышечном введении соматотропина в дозах 10 мг на 1 кг массы в течение года по три инъекции в неделю дает увеличение роста примерно на 8–18 см в год. Больные дети четырех–пяти лет при непрерывном лечении догоняли в росте своих сверстников к половой зрелости (14–16 лет). Если учесть тот факт, что из одного трупа можно получить 4–6 мг соматотропина, то можно понять, что лечение этого заболевания природным соматотропином – дело совершенно безнадежное. Помимо недостатка препарата возникли и другие проблемы, связанные с гетерогенностью гормона, выделяемого из трупного материала. Существовала также опасность, что гипофизарный материал заражен медленно развивающимися вирусами. Такие вирусы обладают необычайно длительным инкубационным периодом, поэтому дети, получавшие препарат, нуждались в многолетнем медицинском наблюдении

**Гормон роста человека, синтезированный в специально сконструированных клетках бактерий, имеет очевидные преимущества: он доступен в больших количествах, его препараты являются биохимически чистыми и свободны от вирусных загрязнений.**

**Биосинтез соматотропина (состоящего из 191-го аминокислотного остатка) специально сконструированными бактериями на основе кишечной палочки был осуществлен фирмой «Генентек». Поскольку при синтезе ДНК на и-РНК получается ген, кодирующий предшественник соматотропина, не расщепляющийся в бактериальных клетках с образованием активного гормона, то поступили следующим образом:**

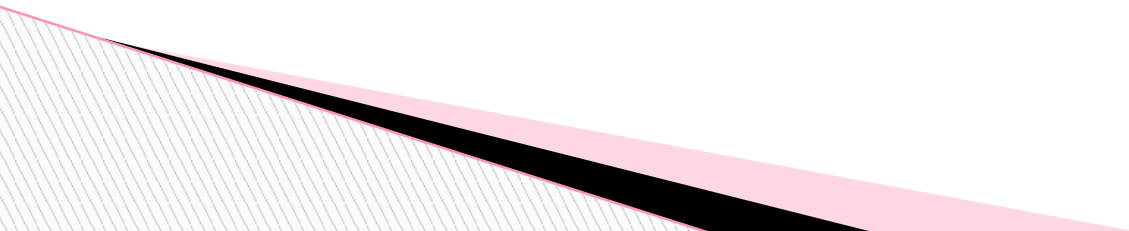
**на 1 этапе клонировали двунитевую ДНК-копию и-РНК и расщеплением рестрикционными эндонуклеазами получили последовательность, которая кодирует всю аминокислотную последовательность гормона, кроме 23-х первых аминокислот.**

**Затем клонировали синтетический полинуклеотид, соответствующий аминокислотам от 1-й до 23-й. Далее два фрагмента объединили вместе и «подстроили» в плазмиду *E. coli*, после чего клетки бактерии начали синтезировать этот гормон.**

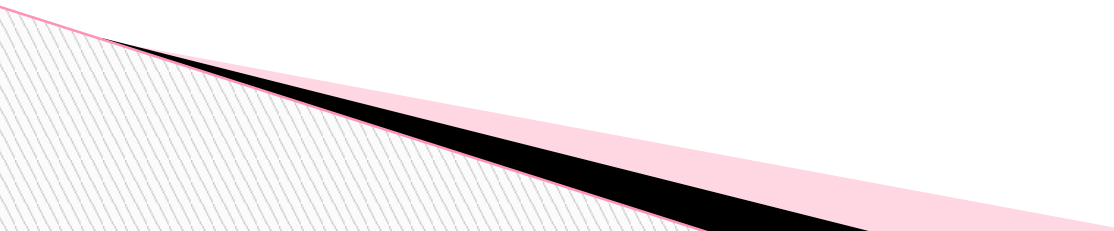
**К 1980 г. были закончены клинические испытания препарата и тесты на токсичность и были начаты массовые эксперименты на детях, близких по возрасту к половой зрелости. Результаты были обнадеживающими, и полусинтетический соматотропин с 1982 г. начал производиться в промышленном масштабе.**

**Еще один гормон, в-эндорфин – опиат мозга, состоящий из 31-й аминокислоты, – был синтезирован в генетически сконструированных клетках кишечной палочки. В 1980 г. австралийский ученый Шайн и американские ученые Феттес, Лэн и Бакстер успешно клонировали ДНК, кодирующую в-эндорфин, в клетках *E. coli* и получили этот полипептид в виде слитного белка с ферментом в-галактозидазой. На первом этапе они клонировали фрагмент ДНК, полученный в результате обратной транскрипции и-РНК, кодирующей в-эндорфин, и далее встраивали его в плазмиду *E. coli* за геном в-галактозидазы, при этом получили гибридный белок, состоящий из в-галактозидазы и в-эндорфина; далее ферментативно отщепляли в-галактозидазу, получая биологически активный в-эндорфин.**

# Препараты гормонов гипоталамуса и гипофиза



# Серморелин (соматотропин-рилизинг-гормон)

- Синтетический аналог эндогенного рилизинг-фактора гормона роста человека полипептидной структуры.
  - Стимулирует продукцию и секрецию гормона роста клетками передней доли гипофиза
  - Показания к применению – диагностика при подозрении на недостаточность гормона роста у малорослых детей
- 

# Соматостатин (Стиламин)

- Синтетический аналог соматостатина
  - подавляет продукцию гормона роста передней доли гипофиза (препарат не применяют при акромегалии из-за короткой длительности действия и отсутствия специфичности)
  - ↓ содержание инсулина в крови и
  - ↓ способность тиреотропинрилизинг-гормона высвобождать тиротропин
  - Соматостатин может синтезироваться D-клетками в периферических тканях (слизистой желудка, поджелудочной железе), где подавляет выделение глюкагона, инсулина и гастрина



# Соматостатин (Стиламин)

- Соматостатин снижает кровоток в чревных артериях и уменьшает объем кровотока во внутренних органах, не вызывая значительных колебаний системного АД (применение – для остановки кровотечений из варикозно-расширенных вен пищевода и для профилактики послеоперационных осложнений при хирургических операциях на поджелудочной железе, кишечнике и желчных протоках).
- Короткая продолжительность действия –  $t_{1/2} = 2-6$  мин
- В/в капельно
- Побочные эффекты: головокружение, ощущение приливов крови к лицу, брадикардия, тошнота, рвота

# Октреотид (Сандостатин)

- Синтетический аналог соматостатина
- В 45 раз активнее соматостатина ингибирует высвобождение гормона роста и только в 2 раза активнее подавляет секрецию инсулина
- В отличие от соматостатина –  $t_{1/2} = 80-100$  мин и действует около 12 ч.
- В/в и п/к в дозе 50-100 мкг через 12 час; per os – 24 мг в день
- Показания к применению:
  - Акромегалия (октреотид подавляет выработку гормона роста)
  - Язвенная болезнь, секреторные опухоли (гастриномы, глюкагономы - подавляет секрецию железистой ткани)
  - Остановка и профилактика кровотечений из варикозно-расширенных вен пищевода у больных циррозом печени
- Побочные эффекты: в начале лечения – преходящее снижение толерантности к глюкозе, тошнота, рвота, рези в животе, газообразование, диарея, нарушение функции печени, при длительном применении (после 6 мес) у 18% пациентов – холестаза, образование и рост желчных камней

# Ланреотид

- Действует аналогично октреотиду, но более продолжительно
- $t_{1/2} = 2,7-7,7$  суток
- Вводят в/м 1 раз в 10-14 сут.

# Протирелин (Рифатироин)

## Тиреотропинрилизинг-гормон

- Синтетический аналог тиротропин-рилизинг гормона.
- Стимулирует продукцию и секрецию тиреотропного гормона и пролактина передней доли гипофиза.
- Применение: диагностика дисфункций щитовидной железы
- Токсичность: у 50% пациентов – позывы к мочеиспусканию, металлический привкус во рту, головокружение (длится несколько минут)

- Для коррекции эндокринных расстройств применяют **дофаминомиметики**, которые способны подавлять инкрецию пролактина и соматотропного гормона
  - Бромокриптин
  - Каберголин

# Бромокриптин\* (Bromocriptine\*)

Дофаминомиметик - прямо стимулирует постсинаптические D<sub>2</sub>-рецепторы рецепторы в ЦНС.

- Ингибирует секрецию пролактина и подавляет физиологическую лактацию, нормализует менструальную функцию;
- облегчая дофаминергическую передачу в нигростриарной системе, снижает выраженность симптомов паркинсонизма;
- снижает концентрацию соматотропина в крови у больных акромегалией, уменьшает депрессивную симптоматику.
- **Показания:** Бесплодие и дисменорея на фоне гиперпродукции пролактина, послеродовая лактация (при необходимости ее подавления), акромегалия, доброкачественные узловые или кистозные изменения молочных желез, паркинсонизм.
- **Побочные действия:** Тошнота, рвота, запоры, снижение АД, побеление пальцев рук и ног при охлаждении, головная боль, набухание слизистых оболочек. Редко - ортостатическая гипотензия, коллапс. Психотические реакции - бред, галлюцинации.
- **Взаимодействие:** Несовместим с ингибиторами MAO и алкоголем. Снижает эффект нейролептиков, пероральных контрацептивов, уменьшает акинезию, вызванную резерпином.
- **Способ применения и дозы:** Внутрь, во время еды.

# Гормон роста (соматотропин)

## □ Пептидный гормон передней доли гипофиза

□  $T_{1/2}=20-25$  мин

□ В/м

□ Длительность действия – до 36 час.

□ Прямой

◦ Влияние на метаболизм:

- Вначале инсулиноподобный эффект с ↑ захвата глюкозы и аминокислот тканями и ↓ липолиза
- Через несколько часов - ↓ захвата глюкозы и активация липолиза

□ Непрямой

◦ Анаболический – увеличение роста.

Гормон роста стимулирует синтез соматомединов (преимущественно в печени). Соматомедины ↑ захват сульфатов хрящевой тканью и, возможно, являются медиаторами клеточных процессов, связанных с ростом костей

□ Дефицит гормона роста.

◦ Своевременная терапия позволяет достигнуть нормального роста во взрослом состоянии

- Один их критериев диагноза дефицита СТГ – увеличение роста <, чем на 4 см в год

□ До 0,1 мг/кг п/к или в/м 3 раза в неделю

□ Препараты животного происхождения неэффективны у людей

□ Хромота, боли в нижних конечностях – как результат быстрого роста

□ Незначительно ↑ заболеваемость лейкозами

# Гонадотропин хорионический\* (Chorionic Gonadotropin\*)

- Водорастворимый гликопротеин, продуцируемый плацентой и получаемый из мочи беременных женщин.



- **Фармакологическое действие - гонадотропное, лютеинизирующее.** Взаимодействует со специфическими мембранными рецепторами клеток гонад, активирует аденилатциклазную систему и воспроизводит эффекты лютеинизирующего гормона передней доли гипофиза.
- У **женщин** индуцирует и стимулирует овуляцию, способствует разрыву фолликула и его преобразованию в желтое тело, в т.ч. при проведении вспомогательных репродуктивных методов; повышает функциональную активность желтого тела в лютеиновой фазе менструального цикла, удлиняет время его существования, задерживает наступление менструальной фазы, усиливает продукцию прогестерона и андрогенов, в т.ч. при недостаточности желтого тела, способствует имплантации яйцеклетки и поддерживает развитие плаценты. Овуляция обычно достигается через 32-36 ч после введения.
- У **мужчин** стимулирует функцию тестикулярных клеток Лейдига, усиливает синтез и продукцию тестостерона, способствует сперматогенезу, развитию вторичных половых признаков и опусканию яичек в мошонку.

# Показания к применению гонадотропина хорионического:

- Гипофункция половых желез при гипоталамо-гипофизарных нарушениях:
  - у женщин - бесплодие, обусловленное гипофизарно-овариальной дисфункцией, в т.ч. после предварительной стимуляции созревания фолликулов и пролиферации эндометрия, нарушение, включая отсутствие, менструального цикла, дисфункциональные маточные кровотечения в детородном возрасте, недостаточность функции желтого тела, привычный и угрожающий выкидыш в I триместре беременности, контролируемая "суперовуляция" при искусственном оплодотворении;
  - у мужчин - гипогонадотропный гипогонадизм, явления евнухоидизма, гипогенитализма, гипоплазии яичек, адипозогенитальный синдром, нарушения сперматогенеза (олигоспермия, азооспермия), крипторхизм.

## Побочные действия:

- ▣ **Со стороны нервной системы и органов чувств:**  
головная боль, раздражительность, беспокойство, утомляемость, слабость, депрессия.
- ▣ **Аллергические реакции:** сыпь (типа крапивницы, эритематозная), ангионевротический отек, диспноэ.
- ▣ увеличение молочных желез, боль в месте введения.
- ▣ **Со стороны мочеполовой системы:**
  - у женщин - гипертрофия яичников, образование овариальных кист, синдром гиперстимуляции яичников, многоплодная беременность, периферические отеки;
  - у мужчин - преждевременное половое созревание, увеличение яичек в паховом канале, затрудняющее их дальнейшее опускание, дегенерация половых желез, атрофия семенных канальцев.

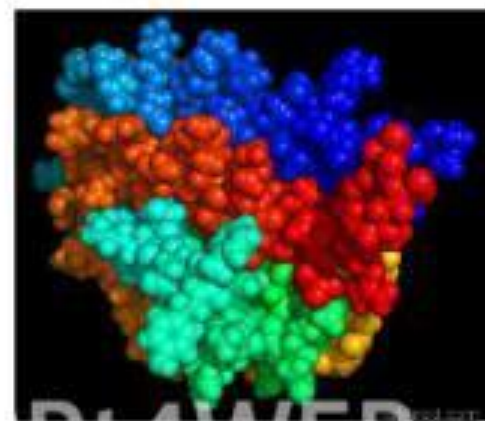
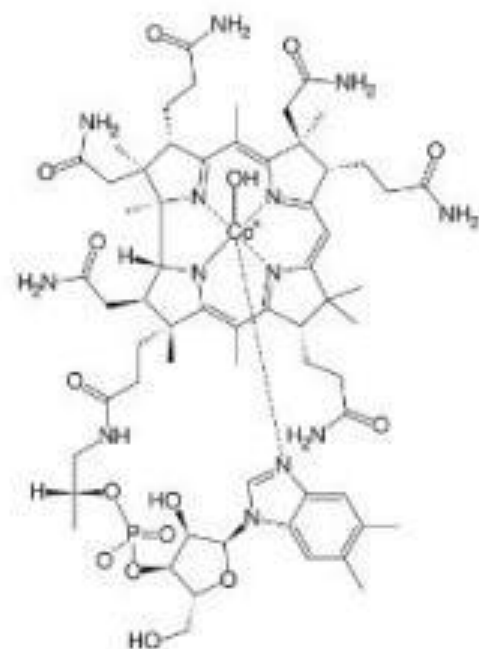
# Способ применения и дозы:

В/м.

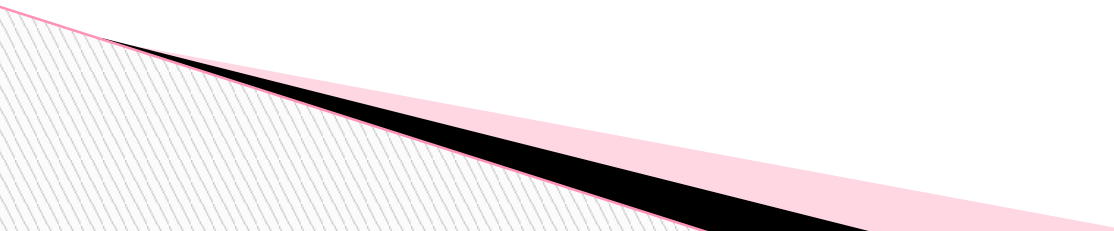
- **Женщинам для индукции овуляции и при использовании методов искусственного оплодотворения:** по 5000-10000 МЕ через день после последнего введения менотропинов или урофоллитропина либо через 5-9 дней после последнего введения кломифена;
- **при недостаточности желтого тела** - по 1500 МЕ каждые вторые сутки, начиная со дня овуляции до дня ожидаемой менструации или подтверждения наступления беременности (в последнем случае возможно повторное применение до 10 нед беременности).
- **Мужчинам при гипогонадотропном гипогонадизме** по 1000-4000 МЕ 2-3 раза в неделю в течение нескольких недель или месяцев либо до получения терапевтического эффекта;
- **для индукции сперматогенеза при бесплодии** в течение 6 мес и более; если число сперматозоидов в эякуляте остается недостаточным (менее 5 млн/мл) лечение дополняют менотропинами или урофоллитропином и продолжают в течение еще 12 мес.
- **Крипторхизм в препубертатном возрасте** - по 1000-5000 МЕ 2-3 раза в неделю до получения желаемого эффекта, но не более 10 доз; диагностика гипогонадизма у юношей - по 2000 МЕ 1 раз в сутки в течение 3 дней.

# Эритропоэтин

- Эритропоэтин (ЭПО) -гемопоэтический фактор роста, гликопротеин со свойствами гормона, физиологическая роль которого состоит в регуляции продукции эритроцитов в зависимости от потребности организма в кислороде.




**Эритропоэтин считается одним из наиболее подходящих продуктов в биотехнологической промышленности. Эта молекула представляет собой гликопротеид, состоящий из 165 аминокислот, который имеет молекулярный вес от 32.000 до 40.000 дальтон и вырабатывается клетками млекопитающих, в которые был трансфектирован ген эритропоэтина человека. Продукт содержит идентичную аминокислотную последовательность выделенного естественного эритропоэтина, которая была выявлена посредством исследований кругового дихроизма и спектрофлюориметрии.**



Рекомбинантный эритропоэтин человека получают путем культивирования трансформированных клеток СНО, вырабатывающих рекомбинантный ЭПО в половолоконных биореакторах, повторной инокуляции биореакторов через **7** дней, инкубации клеточной культуры в течение **16** ч до достижения плотности  **$2 \cdot 10^6$**  клеток/мл и началом процесса ферментации путем непрерывной перфузии до **60** дней, сбора надосадочной жидкости обогащенной рекомбинантным ЭПО и центрифугированием культуральной среды.

Очистку супернатанта и фракции проводят с помощью аффинной и ионообменной хроматографии. Рекомбинантный ЭПО имеет **98%**-ую степень чистоты, биологическую активность **160** МЕ/мг и используется в фармации для лечения анемии.

Изобретение позволяет получить рекомбинантный эритропоэтин человека с высокой специфической активностью и выведением из крови, высокоэффективный для терапевтического применения.





# Лекарственные формы эритропоэтина и технология их получения.

Активное-действующее вещество / начало: эритропоэтин

эпоэтин альфа

эпоэтин бета

эпоэтин омега

- эпоэтин альфа: Рэпоэтин-СП; Эпокомб; Эпокрин; Эпрекс; Эральфон.
- эпоэтин бета: Веро-эпоэтин; Рекормон; Эпостим; Эпоэтин; Эпоэтин-веро; Эритропоэтин; Эритростим.
- эпоэтин омега: Эпомакс.

Все лекарственные препараты выпускаются в виде раствора для инъекций.

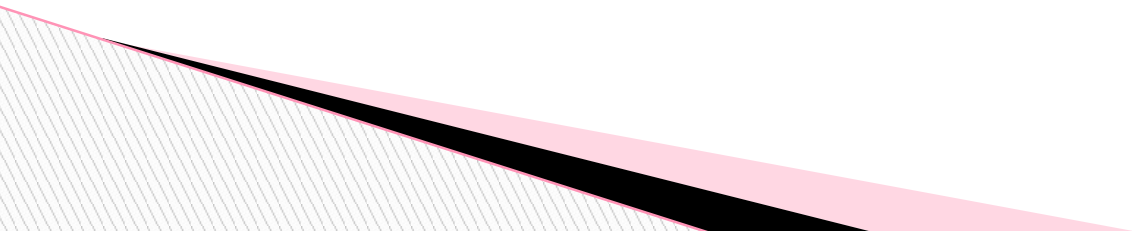
ЭПО стандартизирован по единицам активности (МЕ) и измеряется в МЕ и/или мг.





# Вакцина

- Это препарат, полученный из целых микроорганизмов или их компонентов и предназначенный для профилактики инфекционных заболеваний. Это способ активной иммунизации.
- Известен способ и пассивной иммунизации, когда в организм вводят готовые защитные антитела (**Ig** - иммуноглобулины), чтобы обеспечить временное лечение и профилактику инфекционных заболеваний. Один из вариантов – транспланцентарный перенос **IgG** (система мать-плод)

- **Вакцинация** – это способ индукции выработки антител и стимуляции других иммунных механизмов для профилактики инфекционного заболевания
  - Задача вакцинации – выработать иммунологическую память к инфекционному агенту с помощью предварительного введения вакцины
  - Термин **«вакцина»** происходит от латинского **VACCA** (корова), что связано с открытием английского врача Э.Дженнера.
- 

## Исторический очерк

- Э.Дженнер впервые привил коровью оспу (**cowpox**) для защиты от натуральной оспы, вирусной болезни человека – (**smallpox**)
- Заболевание с образованием пустул на коже встречается у коров – такие же пустулы появляются на руках доярок
- Обычно человек легко переносит коровью оспу, но может погибнуть от натуральной оспы
- Во время эпидемии натуральной оспы доярки были устойчивы к болезни

- Когда появилась вспышка коровьей оспы, Дженнер в присутствии врачей **14** мая **1796** г привил оспу здоровому **8**-летнему мальчику – сделал два небольших надреза на руке и внес в ранки пустулы, взятые от женщины, которая заразилась от коровы.
- На руке ребенка появились пустулы, но изменение общего состояния было едва заметным. Через **10** дней мальчик был совершенно здоров
- **1** июля Дженнер ввел мальчику пустулы от человека, заболевшего натуральной оспой. Спустя **3** дня эритема на месте прививки исчезла без следа – мальчик был здоров. Повторные прививки- через неск. мес и через **5** лет - мальчик оказался невосприимчивым к натуральной оспе

- Луи Пастер спустя столетие сформулировал главный принцип вакцинации – применять ослабленные препараты микроорганизмов для формирования иммунитета против вирулентных штаммов
- Вакцины вызывают появление клонов специфических Т- и В-клеток и создают резерв популяции клеток памяти. При последующем контакте с тем же антигеном клетки памяти способны индуцировать более эффективный вторичный ответ
- Эффекты вакцинации: - защита от болезни и - предотвращение эпидемии инфекции, если в популяции достаточно много иммунных индивидов (популяционный иммунитет, **herd immunity**)

# Характеристика вакцин

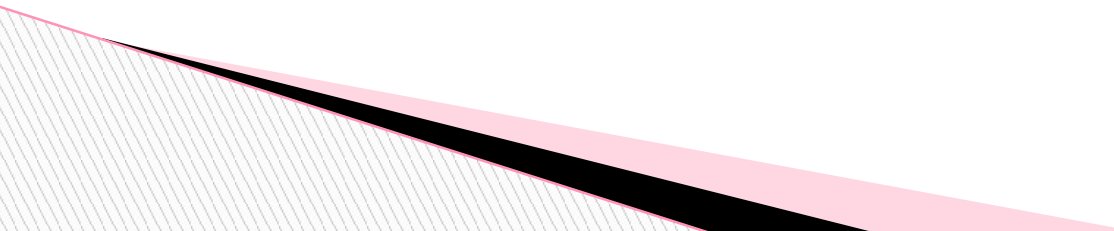
## живые и инактивированные вакцины

- **Живые вакцины** - это взвесь вакцинных штаммов микроорганизмов, выросших на питательных средах. Обычно используют **живые аттенуированные вакцины**
- Аттенуированные штаммы бактерий и вирусов получают путем инактивации (мутации) гена, ответственного за синтез фактора вирулентности (потогенности)
- Вакцинные штаммы сохраняют способность размножаться в месте введения вакцин, лимфатических узлах и внутренних органах
- **Преимущества:** формируют стойкий и длительный иммунитет, подобно постинфекционному
- **Недостатки:** возможна реверсия вирулентных свойств (очень низкая степень вероятности)**22**

# Живые вакцины



## Живые вакцины

- Полиомиелитная
  - Коревая
  - Гриппозная
- Против
- эпидемического паротита
  - сибирской язвы
  - туберкулеза
  - желтой лихорадки
  - сыпного тифа
  - чумы, туляремии, бруцеллеза
- 



# Вакцина для профилактики полиомиелита



- Вакцина против полиомиелита была первой, разработанной в **50-х годах XX** века на основе открытия клеточных культур - **аттенуированная вакцина Сэбина** и **инактивированная вакцина Солка**

# Инактивированные (убитые) вакцины

- Убитые вакцины готовят из инактивирован -ных вирулентных штаммов бактерий и вирусов, обладающих полным набором антигенов.
- Способы инаktivации: нагревание, обработка формалином, ацетоном, спиртом
- Преимущества: отсутствует вероятность реверсии
- Недостатки: отсутствует размножение и транспорт, менее эффективны, обычно при вакцинации необходимы адъюванты

# Инактивированные вакцины (цельноклеточные)

- Вирусные
  - Полиомиелитная
  - Гриппозная
  - Против гепатита А
- Бактериальные
  - Брюшнотифозная
  - Против чумы, лептоспироза
  - Коклюшная вакцина ( ее применение встречает возражения из-за токсичности)

# Вакцины на основе анатоксинов

- **Анатоксины**
- **Экзотоксины возбудителей**  
дифтерии, столбняка, ботулизма, холеры –  
обрабатывают формалином, при этом они  
**утрачивают токсигенность, но сохраняют**  
**иммуногенные свойства и способность вызывать**  
**продукцию антител**

# Вакцины на основе микробных компонентов

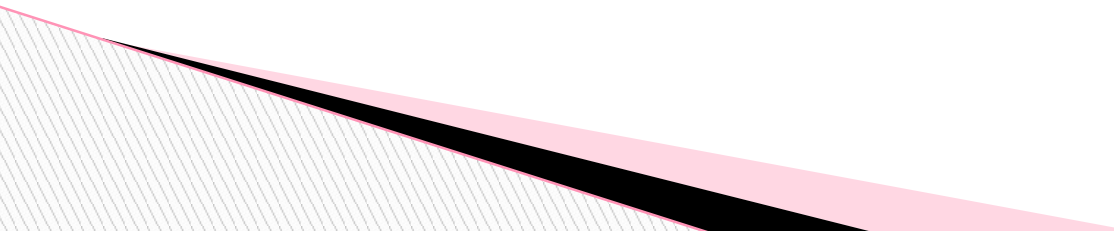
- Поверхностные антигены вирусов
- Гемагглютинин и нейраминидаза вируса гриппа
- Поверхностный антиген **HbsAg** вируса гепатита В – получают путем клонирования в клетках дрожжей с помощью рекомбинантной ДНК-технологии

# Вакцины на основе микробных компонентов

## Новая бесклеточная коклюшная вакцина

- содержит протеин наружной мембраны, агглютиногены фимбрий **B.pertussis**, коклюшный анатоксин
- Вакцина **АКадС** содержит компоненты **B.pertussis** + дифтерийный и столбнячный анатоксины
- Вакцина **Церварикс** для профилактики рака шейки матки - содержит вирусоподобные частицы из антигенов вирусов папилломы человека (**ВПЧ-18** и **ВПЧ-18**)  
Вакцинация с **10 – 25** лет

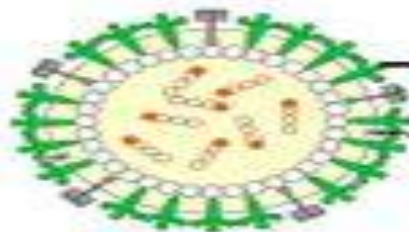
# Вакцины на основе капсульных полисахаридов

- Вакцина дл профилактики гемофильной инфекции- содержит капсульный полисахарид **H.influenzae** тип **b** + столбнячный анатоксин
  - Вакцина менингококковая
  - Вакцина пневмококковая
- 

## Искусственные вакцины

- **Принцип:** используют естественные антигены + синтетические носители
- Гриппол – гриппозная вакцина на основе антигенов вируса гриппа **H** и **N** + искусственный стимулятор Полиоксидоний





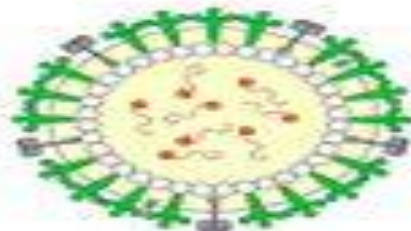
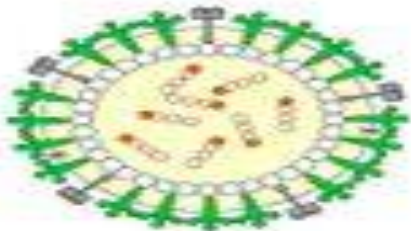
**Живая вирусная частица**  
 Memбранные белки  
 (гемагглютинин и нейраминидаза)  
 Сердцевина вируса

**Живые вакцины**

**Инактивированные вакцины**

Ослабление

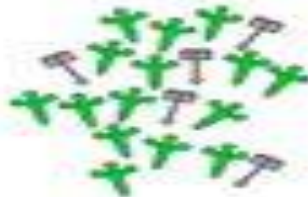
Ультрацентрифугирование  
 Инактивация формалином



**Цельновирионная вакцина**

Организм ospite  
 растёт оригтели

TCAB



**Расщепленная (сплит) вакцина**

**Субъединичная вакцина**



# Адьюванты

- усиливают продукцию антител,
- концентрируют антиген в участке, где лимфоциты экспонируются с антигеном, создают «депо» антигена
- индуцируют синтез цитокинов

**Примеры:** соли (или гидроокись) алюминия, природные медиаторы (цитокины),

**Препараты пролонгированного высвобождения –**  
липосомы, иммуностимулирующие комплексы  
**(ISCOM)**

# Контроль эффективности и безопасности вакцин

- Потенциальная опасность: тяжелое заболевание у пациентов с иммунодефицитами (оспенная, БЦЖ, коревая)
- Гиперчувствительность к вирусным антигенам (коревая)
- Гиперчувствительность к антигенам куриных эмбрионов (коревая, паротитная)
- Реверсия к дикому типу (характерно для штаммов вируса полиомиелита типов **2** и **3**)
- Контаминация эндотоксином (коклюшная)

# Вакцины, предназначенные для массовых прививок

Заболевание	Вакцина
□ Столбняк	Анатокин
□ Дифтерия	Анатоксин
□ Коклюш	Бесклеточная
□ Полиомиелит	Убитая (Солка) или аттенуированная (Сэбина)
□ Корь, паротит, краснуха	Аттенуированная
□ Вызванное <b>H.influenzae</b>	Полисахаридная

# Способы введения вакцин

- Инъекция
- Пероральное применение
- Накожная аппликация

Новая разработка

- Трансдермальный путь вакцинации  
**«Генетический пистолет»** - делает выстрел покрытыми ДНК золотыми микроскопическими частицами ->  
-> в эпидермис,  
где мишенью служат клетки Лангерганса





# ДНК-вакцины

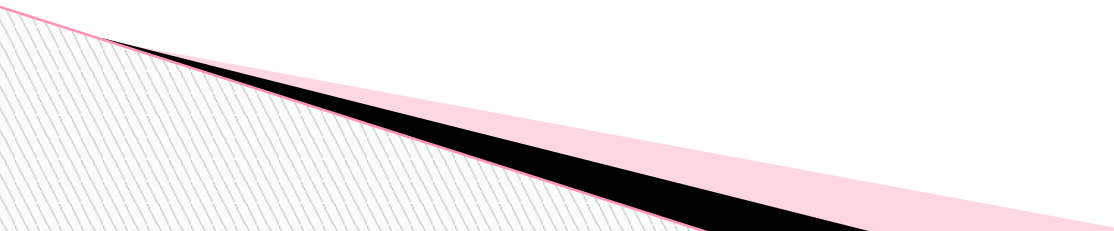
- Вакцины на основе плазмидных ДНК, кодирующие протективные антигены возбудителя
- Продолжаются исследования по созданию и испытанию ДНК-вакцин для профилактики ВИЧ, гриппа, вирусных гепатитов В и С, а также малярии

## Растительные вакцины

- Впервые концепция предложена в **1995** году  
**C.Arntzen:** было показано, что листья трансгенного растения табака способны экспрессировать **HbsAg**. При введении подопытным животным растительный антиген вызывал ответ подобно вакцине против гепатита В
- Схема: вводят структурный ген в растительный вектор  
-> интеграция гена в ядерную хромосому -> трансгенное растение, листья которого содержат **HbsAg**



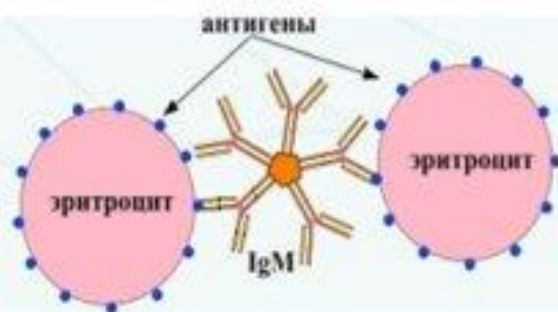
**Диагностические  
сыыворотки.  
Получение,  
практическое  
использование.**



# Диагностические сыворотки

К диагностическим специфическим сывороткам, применяемым для обнаружения в тех или иных материалах антигенов или для определения вида и даже типа микроба или вируса, относятся:

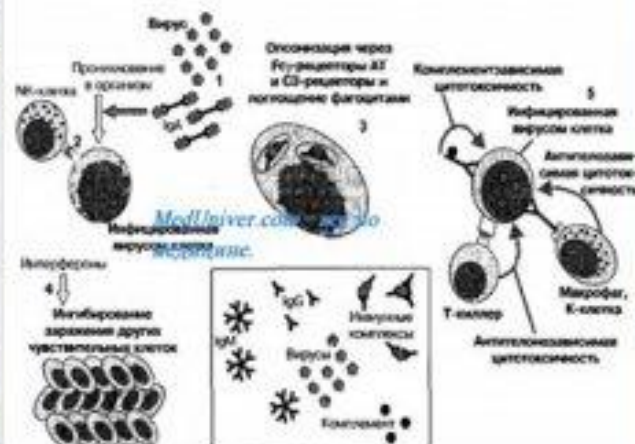
## 1. агглютинирующие



## 2. преципитирующие



## 3. лизирующие (комплемента связывающие).



Такая классификация основана на функциональной способности специфических гамма-глобулинов склеивать (агглютинировать), осаждать (преципитировать), растворять (лизировать) соответствующие антигены.

# Получение

Лечебные и профилактические сыворотки получают путем иммунизации ослов и лошадей, поскольку эти животные более реактогенны, чем другие, и дают большой выход антител.

Для получения антитоксических сывороток животных вначале иммунизируют анатоксином, а после создания базисного иммунитета – возрастающими дозами токсина.

Антибактериальные сыворотки получают путем введения животным убитых или живых микробов. Из крови животных выделяют плазму, затем из нее удаляют фибрин получают сыворотку. Забор крови у этих животных производят в период максимального содержания антител, однако для этого необходимо постоянно контролировать кровь по такому показателю, как титр антител.

Антитоксические сыворотки титруются в антитоксических или международных единицах (АЕ или МЕ). За 1 АЕ принимают минимальное количество сыворотки, предохраняющее определенный вид животных от гибели при заражении специально подобранной дозой токсина. Так, 1АЕ антидифтерийной сыворотки – это наименьшее количество сыворотки, которое на протяжении 4 суток предохраняет от смерти морскую свинку массой 250г, инфицированную 100 ДЛМ дифтерийного токсина.

Антибактериальные и противовирусные сыворотки не титруются и вводятся по клиническим показаниям в миллилитрах. При определении их дозы учитывается тяжесть, день заболевания и возраст больного.

Полученные выше описанным способом сывороточные препараты характеризуются относительно низкой активностью и существенным количеством примесей.



# Получение



Сыворотки можно получать также из культивируемых на искусственной питательной среде животных клеток. Однако главной проблемой в этом случае является обеспечение стабильного роста животных клеток вследствие их генетической нестабильности, непостоянства генетических экспрессий и старения.

Нередко для лечения и профилактики инфекционных болезней используются гомологичные сыворотки здоровых доноров, переболевших людей или препараты плацентарной крови.

В целях снижения токсичности, уменьшения аллергического действия и концентрации иммуноглобулинов сыворотки освобождают от балластных белков.

При этом используют методы фракционирования с помощью спиртоводных смесей при температуре  $0^{\circ}\text{C}$ , ультрацентрифугирования, электрофореза, ферментативного гидролиза. Очищенные и концентрированные препараты гамма-глобулиновой фракции сывороточных белков, содержащие высокие титры антител, называют иммуноглобулинами, а в практике – гамма-глобулинами. Современная технология изготовления человеческого гамма-глобулина гарантирует полную гибель вирусов гепатита.

# Практическое использование

- специфические иммунные сыворотки содержат антитела к определенным видам микроорганизмов
- введение сыворотки в организм человека создает пассивный иммунитет

Сывороточные препараты используют в следующих целях

для лечения, так как введение в организм антител обеспечивает быстрое обезвреживание микробов и их токсинов

для профилактики, чтобы быстро создать невосприимчивость у человека, контактировавшего с больным или инфицированным материалом

для инентификации микроорганизма выделенного от больного, что позволяет установить вид (тип)

# Монорецепторные сыворотки

- Монорецепторная сыворотка**—1) это сыворотка, содержащая антитела к одному из антигенов сложного антигенного комплекса;  
2) сыворотка, содержащая антитела к одной детерминантной группе антигена.



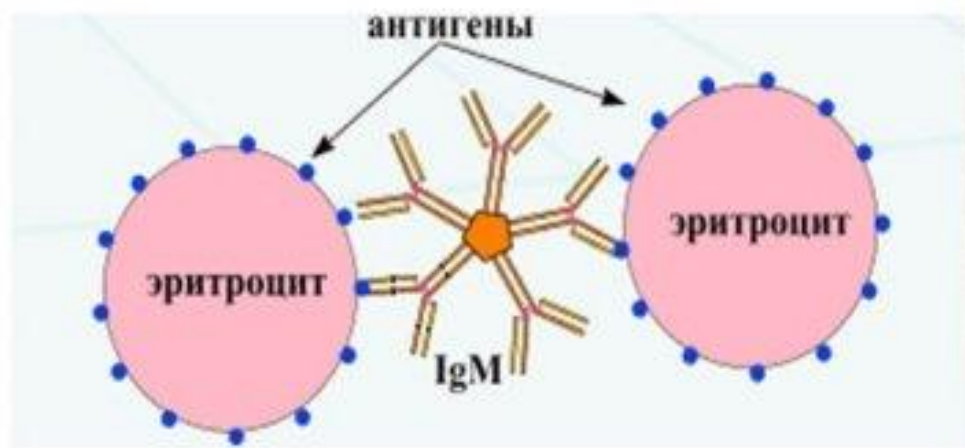
Монорецепторные сыворотки относятся к монорецепторным или двухкомпонентным реакциям, в которых принимают участие только антитела и антигены : реакции агглютинации и преципитации.



# Моноцепторные сыворотки

## Реакция агглютинации

Реакция агглютинации (РА) – это слипание и выпадение в осадок крупных корпускулярных антигенов (обычно проли эукариотических клеток) под действием специфических антител в присутствии электролита (изотонического раствора хлорида натрия). Образовавшийся в результате РА осадок называют **агглютинатом**.



Реакция агглютинации может проводиться в двух вариантах:

1. качественном – результат оценивается по принципу (+) или (-);
2. количественным – результат оценивается последним титром (кратностью разведения) антител, еще способные вызывать реакцию агглютинации.

# Монорецепторные сыворотки

## Реакция преципитации

Реакция преципитации (РП) – это реакция специфического взаимодействия детерминантных групп антигенов и активных центров антител в присутствии электролита с образованием нерастворимого комплекса «антиген-антитело», называемого **преципитатом**.

В реакции преципитации антиген представлен одиночными молекулами – растворимыми веществами белковой или липополисахаридной природы – полными антигенами или даже гаптенами.

Основными методами проведения реакции преципитации являются встречная преципитация (качественный анализ) и радиальная иммунодиффузия (количественный анализ).





**Благодарю за внимание!**

