

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

ЛЕКЦИЯ № 5 (заочная форма обучения)

FOR MORE INFORMATION...

Доцент, к.ф.н.,
Пархач Маргарита Евгеньевна,
Белорусский государственный медицинский
университет,
кафедра фармацевтической технологии
parkhach_marg@mail.ru

ЧАСТНАЯ
БИОТЕХНОЛОГИЯ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ
СРЕДСТВ

АНТИБИОТИКИ

– специфические продукты жизнедеятельности различных групп микроорганизмов, растений, животных, избирательно задерживающие рост и развитие иных организмов или злокачественных опухолей

Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. Высшая школа, 2004. – 448с.

Характер взаимоотношения организмов в природе

- ✓ Симбиотический: аэробы и анаэробы
- ✓ Паразитизм: риккетсии, вирусы и клетки макроорганизма
- ✓ Хищничество: миксобактерии.
Колонии миксобактерий синтезируют экзоферменты ([лизоцим](#), [протеазы](#) и [целлюлазы](#)) → совместное разрушение органических субстратов, в т.ч. н/р полимер 
«волчьей стаи»
- ✓ Антагонизм: бактерии и микроскопические грибки



Антибиотики имеют адаптационное значение для организмов, их синтезирующих

Преимущества антибиотиков перед цитотоксическими ядами:

- **Избирательность действия:** конкретный антибиотик проявляет свое действие лишь в отношении определенных организмов, не оказывая влияния на другие формы живых существ.

В медицине могут быть использованы лишь те антибиотики, для которых мишени в микроорганизмах отличаются от подобных систем макроорганизма

- **Высокая биологическая активность** в отношении только чувствительных к ним организмов (низкие концентрации и эфф. дозы).
- Антисептики и дезинфектанты неспецифичны: активны в отношении **всех** м/о

Избирательность антибиотиков определяется наличием структурных и метаболических различий у микро- и макроорганизмов

В отличие от животных клеток клетки бактерий

- снабжены клеточной стенкой,
- имеют единичную хромосому,
- лишены митохондрий, а большинство митохондриальных ферментов расположены на плазматической мембране.
- различно строение рибосом и т.д.

КЛАССИФИКАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ ПО ТИПУ ДЕЙСТВИЯ (медицинская)

- бактерицидные (b-лактамы, аминогликозиды, полимиксины и др.): вызывают гибель микроорганизмов. Используются при лечении тяжелых инфекционных заболеваний
- бактериостатические (макролиды, тетрациклины, левомицетин): прекращают или приостанавливают размножение микроорганизмов. В этом случае организм окончательно избавляется от возбудителя с помощью факторов иммунитета.

Бактерицидные антибиотики более выгодны, особенно в условиях неполноценного функционирования системы иммунитета.

□ Антибиотики широкого и узкого спектра действия. Действуют на м/о в зависимости от строения клеточной оболочки бактерий

Точки приложения действия антибиотиков

- **Клеточная мембрана микроорганизмов**
 - У **Gr+ бактерий** (слои ацетилглюкозамина и ацетилмурамовой кислоты, соединенные пептидными мостиками) - **более уязвима**;
 - У **Gr- бактерий** КС покрыта слоем липидов, поэтому менее проницаема для антибиотиков. Более защищены. Подвержены действию липофильных антибиотиков;
- **Внутренние структуры клеток**

Классификация по механизму действия:

- 1. Ингибиторы биосинтеза клеточной стенки:** пенициллин, цефалоспорины, гликопептиды, карбапены, карбапенемы, ванкомицин, ристомидин, циклосерин и т.д.
- 2. Разрушители клеточных мембран:** полиеновые антибиотики, полимиксины
- 3. Ингибиторы синтеза белка в рибосомах:** макролиды, линкомицины, аминогликозиды, тетрациклины, левомицетин
- 4. Ингибиторы РНК-полимеразы:** рифампицин – нарушает метаболизм фолиевой кислоты
- 5. Ингибиторы синтеза ДНК на уровне ДНК-матрицы:** нитрофураны, налидиксовая кислота, фторхинолоны, митомицины, и др.
- 6. Ингибиторы синтеза РНК на уровне ДНК-матрицы (стрептомицины),**
и др.

ПРОИЗВОДСТВО АНТИБИОТИКОВ

Создание штаммов микроорганизмов

Современные штаммы получают используя технологию рекомбинации ДНК

- Большая часть современных антибиотиков синтезируется рекомбинантными штаммами актиномицетов рода *Streptomyces* – прокариот сложного строения



Род *Streptomyces* является самым крупным родом, синтезирующим антибиотики и используется с 1940—1950 г. в промышленном производстве антибиотиков. Сейчас представители рода *Streptomyces* активно используются в генной инженерии как хозяева для клонирования и экспрессии чужеродной ДНК, т.к. в клетках *Streptomyces* происходит корректная **упаковка белков и гликозилирование**, белок затем экскретируется в окружающую среду, в отличие от [*Escherichia coli*](#)

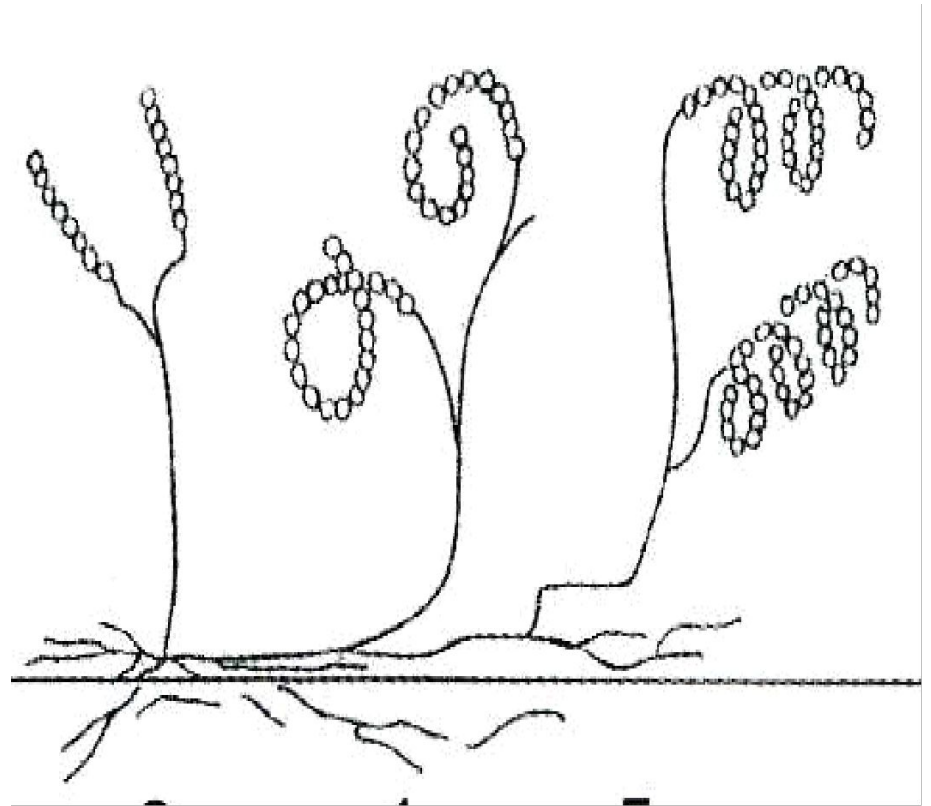
Схема роста мицелия актиномицетов рода **Streptomyces**

В отличие от E.Coli, Streptomyces существуют не в виде изолированных клеток, а в виде нитей – мицелл, образованных клетками.

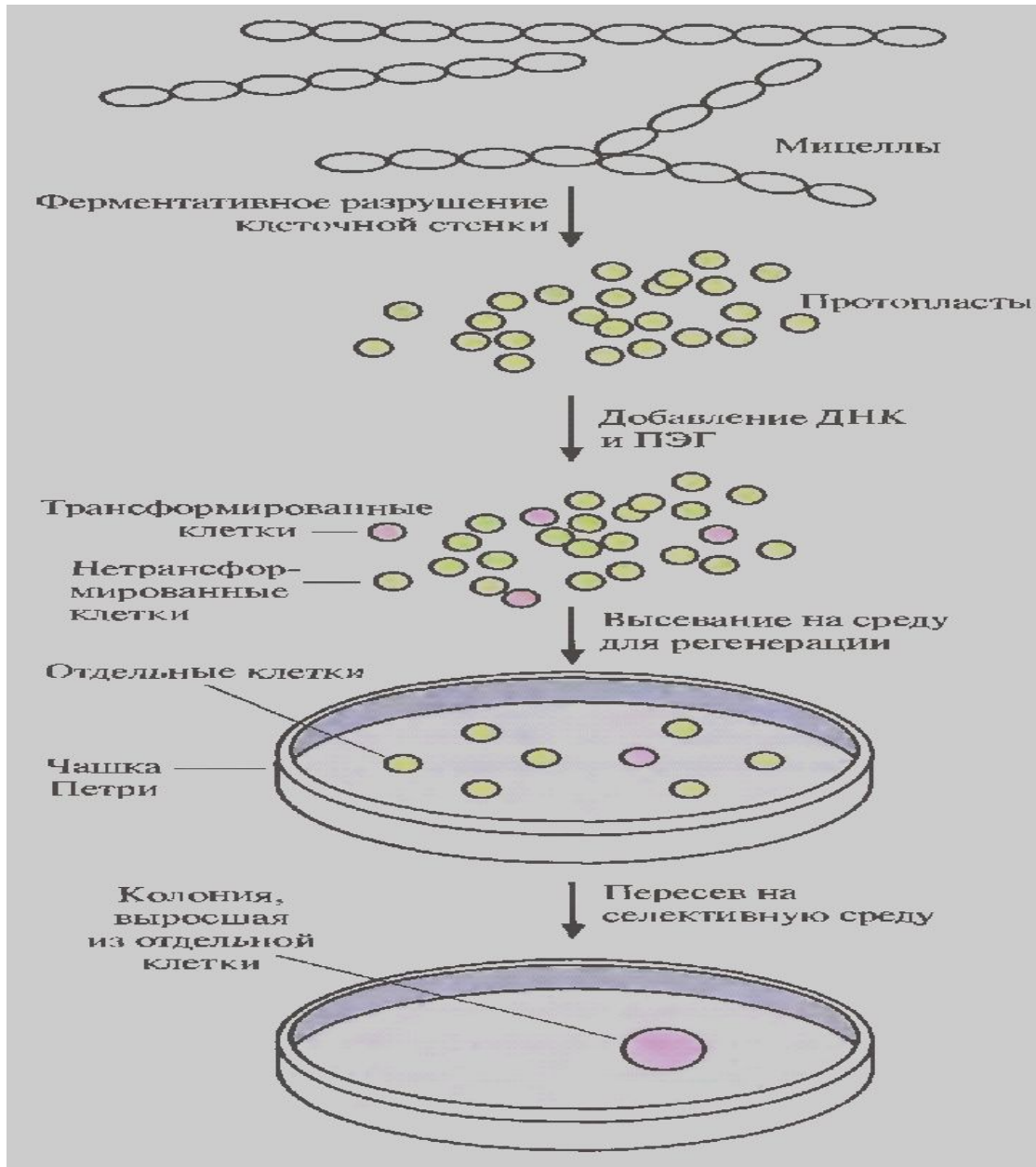
Клеточные стенки ригидны и прочны, как у большинства прокариот.

Клетки отделяют др.от др. и переводят в

протопласты путем разрушения клеточной стенки с помощью ферментов или химических веществ



Создание штаммов микроорганизмов-продуцентов



- Разрушение клеточной стенки и высвобождение протопластов
- Трансформация протопластов плазмидной ДНК в присутствии ПЭГ
- Посев протопластов на твердую ПС. Клеточные стенки восстанавливаются, клетки делятся и образуют колонии
- Посев **каждой колонии на селективную ПС** (обычно содержит Ant неомицин или Ant тиострептон – маркерный ген устойчивости к нему содержит вектор). На этих средах прорастают только трансформированные клетки
- Производят посев на ПС в ферментеры

Биосинтез антибиотика

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА АКТИНОМИЦЕТОВ

Культуры актиномицетов переменчивы в связи с генетической нестабильностью (высокая приспособляемость к изменениям среды обитания). Для стабилизации штаммов – продуцентов в ПС вводят антимутагены – вещества регулирующие экспрессию генов и предотвращающие хромосомные перестройки:

- пуриновые нуклеотиды;
- пуриновые основания (кофеин, теобромин, теофиллин, пентоксифиллин)
- ионы марганца;
- метионин
- гистидин;

Для каждого штамма актиномицетов состав ПС подбирается индивидуально для исключения мутаций в генах, кодирующих биосинтез антибиотиков

Требуется интенсивная аэрация среды

Двухфазный характер биосинтеза антибиотиков

- **1 фаза – трофофаза.**

Сбалансированный рост микроорганизмов и накопление биомассы продуцента. Быстрое потребление компонентов ПС, кислорода и биосинтез БАВ, необходимых для его собственного роста (белки, ферменты, нуклеиновые кислоты и др.). **Снижение pH.** Выработка ферментов, синтезирующих антибиотик отсутствует

(Лag-фаза, фазы ускорения и экспоненциальная).

- **2 фаза – идиофаза.**

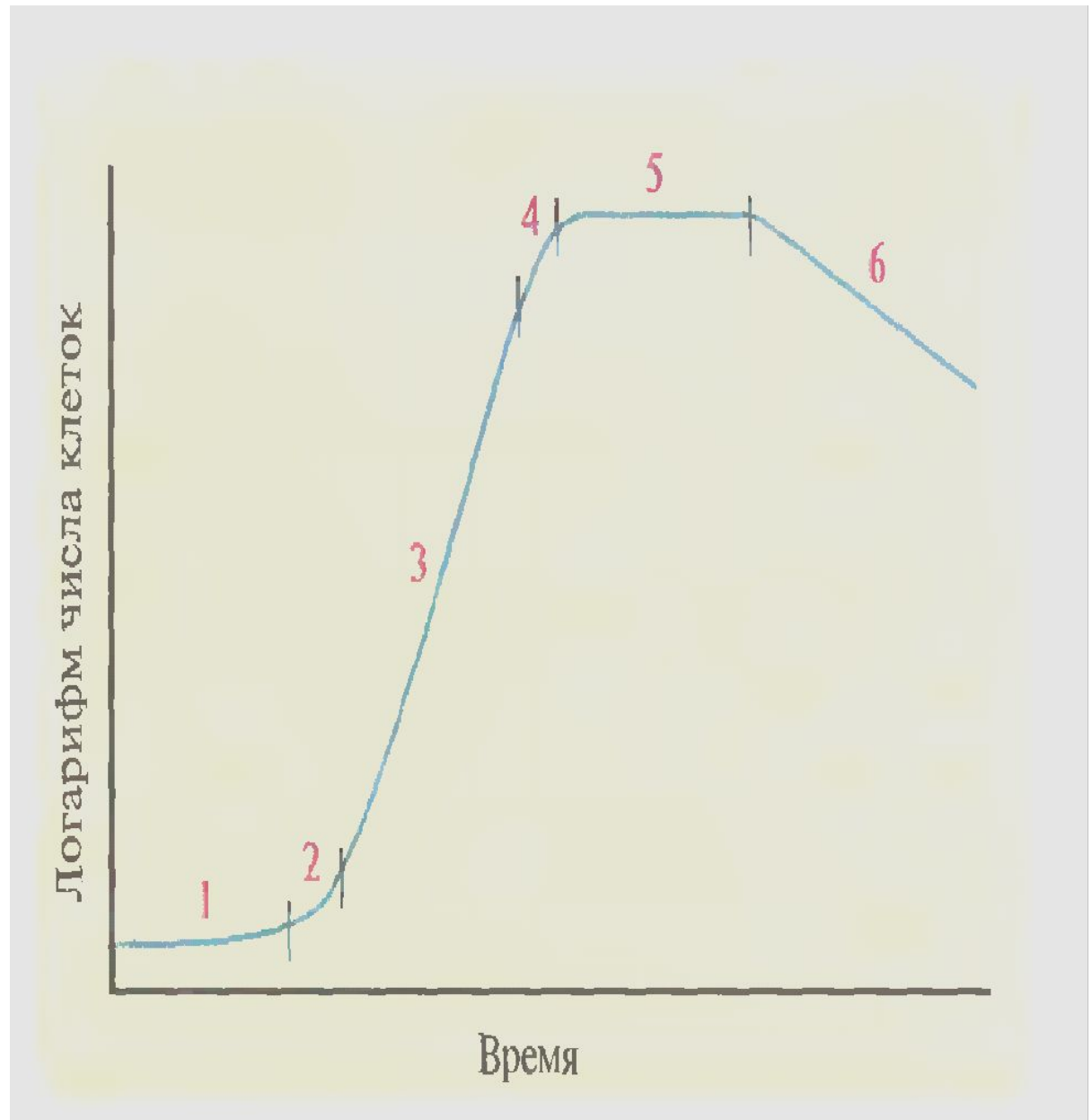
Культуральная среда обеднена питательными веществами. Накопление биомассы **замедлено**. Преобладают протеолитические процессы. **Повышение pH.** Борьба за выживание: активируются и транскрибируются гены, кодирующие синтез веществ, подавляющих рост других микроорганизмов – антибиотиков. Антибиотики экскретируются за пределы клетки

(фазы замедления роста, стационарная, отмирания)

ФАЗЫ РОСТА КУЛЬТУРЫ:

- 1 – лаг-фаза.
- 2 – фаза ускорения.
- 3 – экспоненциальная фаза.
- 4 – фаза замедления.
- 5 – стационарная фаза.
- 6 – фаза отмирания.

Биосинтез
антибиотика
достигает
максимальной
скорости в
стационарную фазу,
когда биомасса
культуры
максимальна



ИДИОФАЗА

Ферментативные процессы на этой стадии более интенсивны в присутствии антагонистических штаммов микроорганизмов (например иных бактерий). Наблюдается повышенный биосинтез антибиотика как результат проявления анатагонистических отношений.

РИСК: при совместном культивировании различных микроорганизмов могут возникнуть гибриды с иными свойствами → вырождение штамма-продуцента

Выделение антибиотика

Антибиотики в определенной концентрации губительны и для самого продуцента (для *Streptomyces gryseus* - около 0,5%).

По достижении $C_{\text{крит.}}$ рост м-о прекращается.

Ферментацию прекращают.

Антибиотик выделяют из культуральной среды:

- экстракция органическими растворителями;
- осаждение;
- адсорбция

Очистка антибиотика

Методы:

- Повторная замена растворителя;
- Адсорбционная хроматография;
- ВЭЖХ и т.д.

Степень очистки определяет **стабильность** антибиотика при хранении (антибиотики неустойчивы как в кислой, так и в щелочной среде, при избыточной влажности подвержены гидролизу и окислению)

Стандартизация антибиотика

Оценивают:

- биологическую активность;
- антимикробный спектр;
- токсичность;
- пирогенность;
- действие на лейкоциты крови;
- стерильность лекарственных форм;
- и т.д.

Биологическая активность антибиотиков

- Измеряется в условных единицах – у.е.

У.Е. антибиотической активности =

минимальное количество антибиотика,
способное подавить рост определенного
количества (как правило 1000) клеток
чувствительного тест-микроорганизма, в
единице массы питательной среды.

Пример: Для стрептомицина 650 у.е./мг способны
подавить рост 1000 клеток микобактерий туберкулеза

Изготовление лекарственных форм антибиотика

- Осуществляется в строго асептических условиях: в помещениях не ниже «В» класса чистоты;
- Лекарственные формы создают в соответствии с физико-химическими свойствами и устойчивостью антибиотика к воздействию различных фармацевтических факторов

Стрептомицин

Продуцент – актиномицеты

Streptomyces griseus

Выделен в 1943 г. амер. З.А. Ваксманом

Активен при туберкулезе, угнетает синтез белка

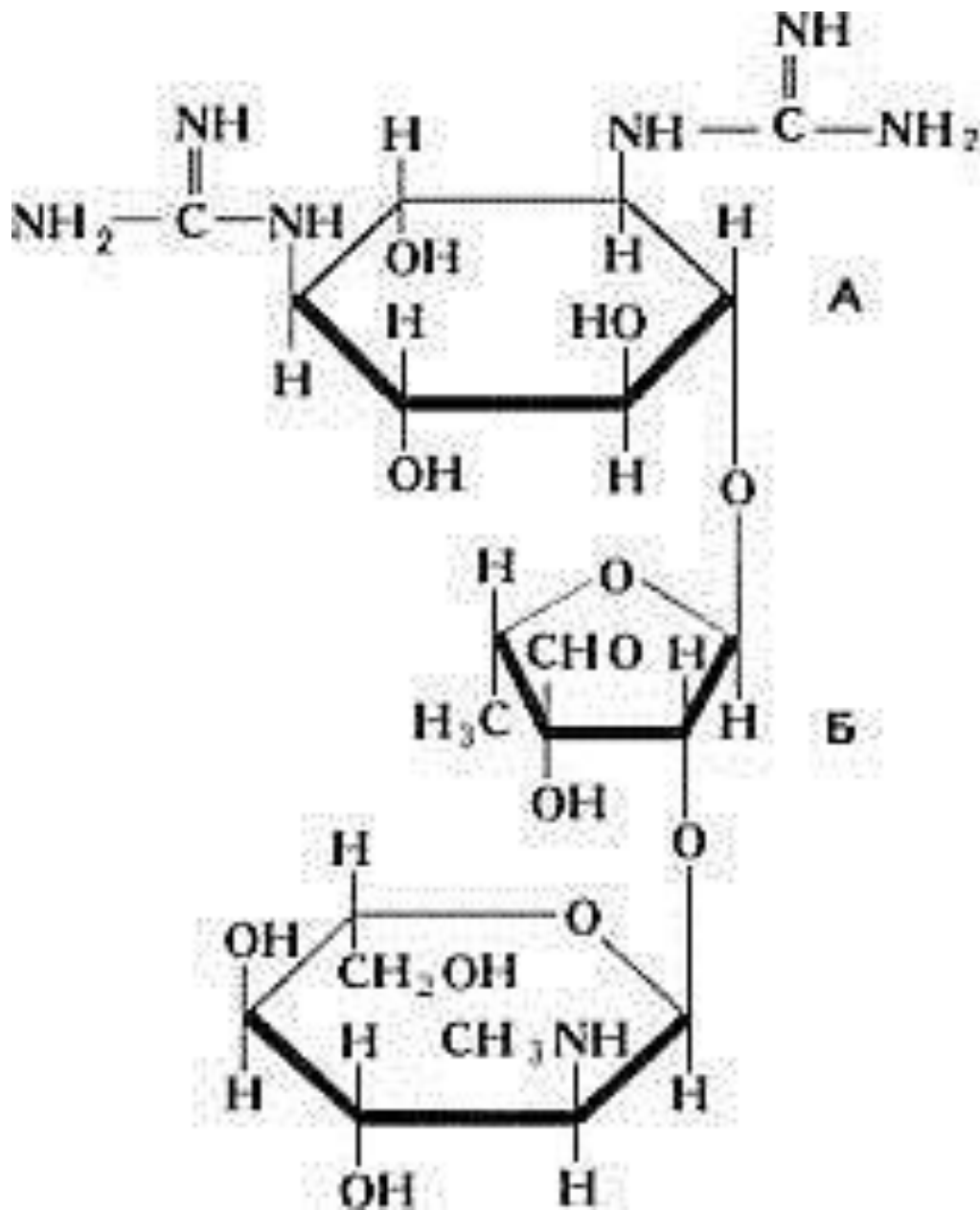
Стрептомицин ↑ сродство рибосом патогенного м-о к антикодону ацилированных тРНК, что ведет к связыванию ошибочных, не соответствующих кодону матрицы мРНК аминоацил-тРНК и обуславливает ошибки при считывании генетической информации. В результате в пептидную цепь включаются необычные аминокислоты и синтезируются неактивные молекулы белка.

Избирательность действия обеспечивается различием структуры рибосом у бактерий и млекопитающих. Бактериальные рибосомы более активны в образовании связей с антибиотиками, чем рибосомы млекопитающих.

Стрептомицин - Аминогликозидный антибиотик (ШСД)

А – агликон
стрептидин
(шестиатомный спирт
инозит, имеющий в
качестве заместителей
две гуанидиновые
группы)

Б - дисахарид
стрептобиозамин
(N-метил-
глюкозамин
и *стрептоза*)

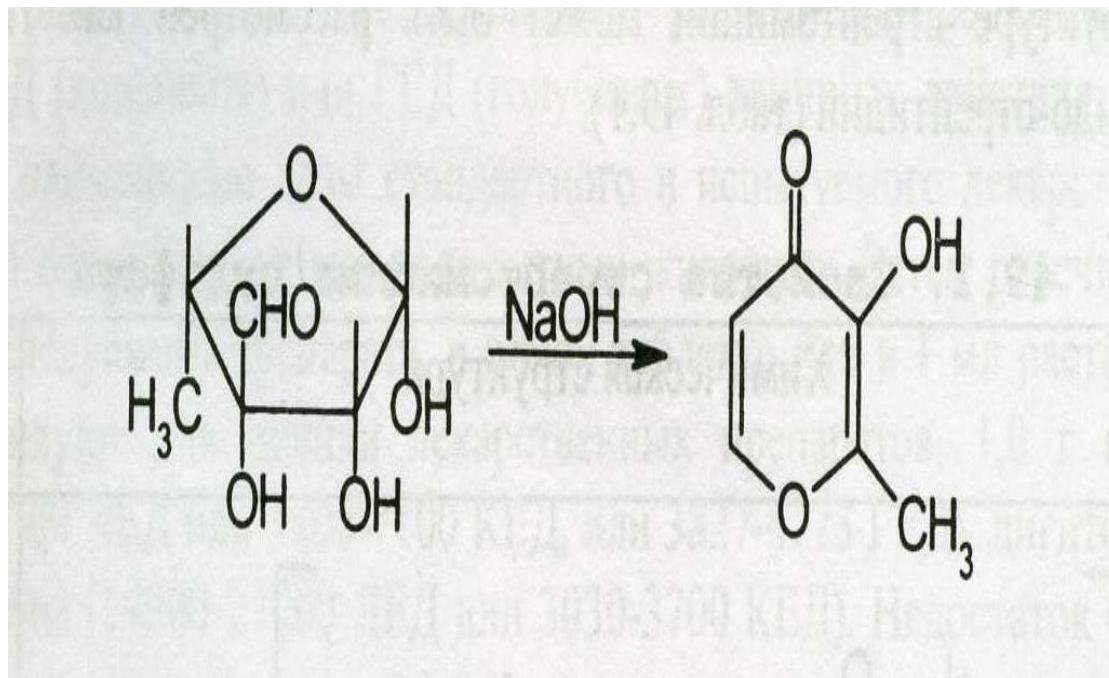


Мальтольная проба

L-стрептоза в **щелочной среде** подвергается дегидратации и изомеризации, превращаясь в **мальтол** (α -метил- β -окси- γ -пирон). При взаимодействии с ионами Fe^{3+} в кислой среде мальтол образует комплекс фиолетового цвета. Интенсивность окраски **пропорциональна концентрации** стрептомицина.

М.б. использована для количественного определения.

Мальтольная проба обусловлена наличием альдегидной группы в молекуле стрептомицина



СВОЙСТВА ПРОДУЦЕНТА И ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА СТРЕПТОМИЦИНА

Генетические свойства продуцента:

Культура генетически нестабильна. Перестройки ДНК происх. легко

Для стабилизации штаммов при культивир-и в ПС доб. антимутагены

Культуральные свойства:

Треб. жирных ПС, жирная мука, белок ее не востребован

треб. сильная аэрация

↑ сод. в идиофазу Cl^- , Na^+ , K^+ и цистеина ↓ биосинтез стрептомиц.

Стрептомицин → в КЖ,

Физ.-химич. св-ва стрептомицина и выд-е его из КЖ:

Балластные в-ва (белки, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+}) осаждают щавелевой кислотой

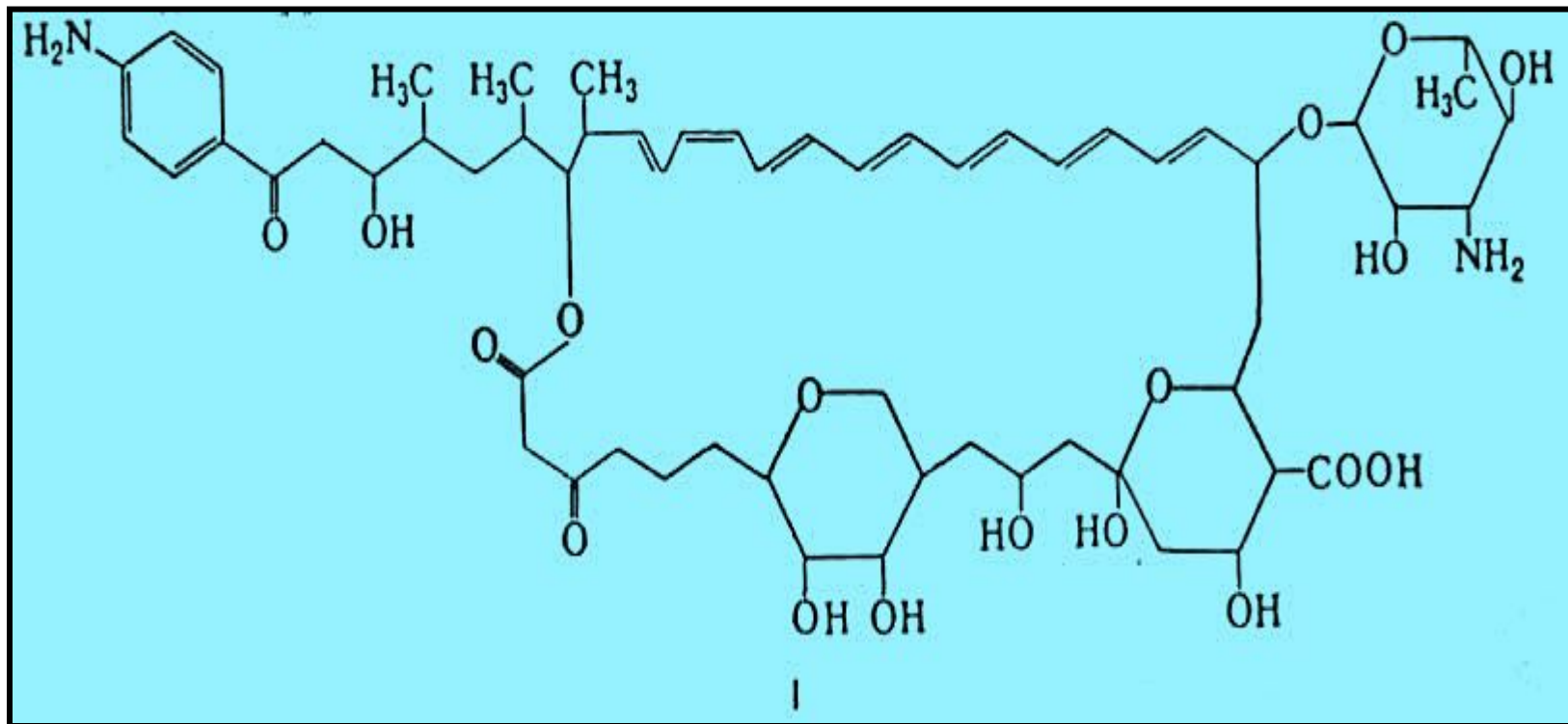
Стрептомицин полярен, х/р в воде (и осн-е и соли) и н/р в орг. р-лях. Для очистки многократно ↓ из воды орг. р-лями

В чистом виде стрептомицин выд. м-дом адсорбции при pH 2-4 на активир. угле и м-дом ионообм. хроматографии

ЛЕВОРИН

Противогрибковый антибиотик (фунгицидное).
Оказывает действие на дерматофиты, дрожжи, дрожжеподобные и плесневые грибы.

Поражает цитоплазматические мембраны грибковых клеток, взаимодействует с эргостеролом, образуя в мембране поры, что приводит к утечке важных для жизнедеятельности гриба компонентов цитоплазмы – ионов K^+ и ферментов. Активен в отношении практически всех грибов, патогенных для человека



Структура основного компонента леворина.

Продуцент - *Streptomyces levoris*

Леворин – суммарный полиеновый антибиотик. Смесь компонентов.

Не растворим в воде. Экстрагируют 65% водным ацетоном.

Особенности технологии β – лактамных антибиотиков

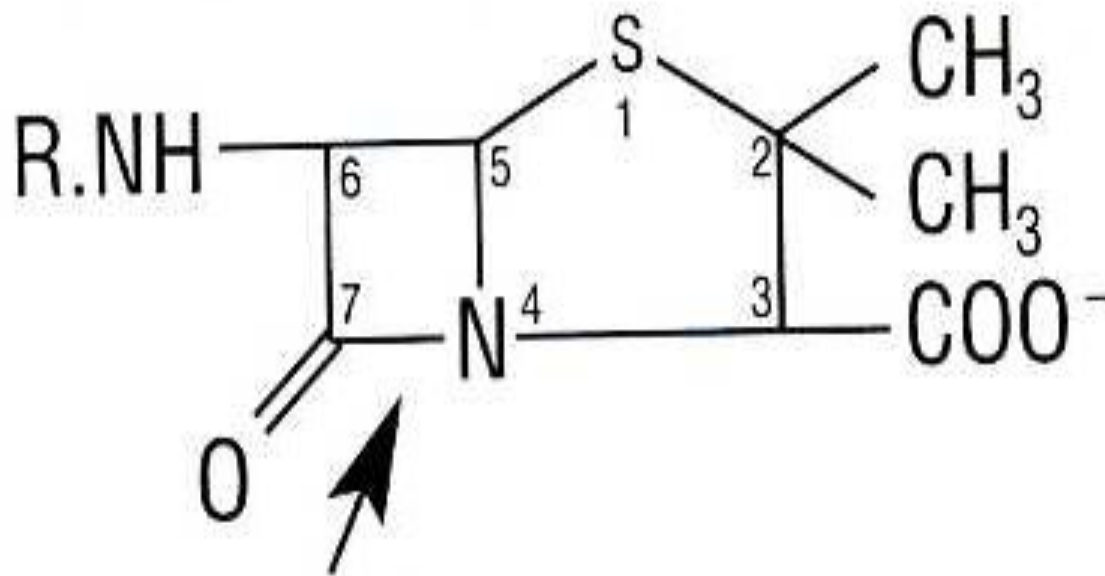
Выделены в чистом виде

А. Флемингом, **Х.** Флори и Е. Чейном в **1940**

Г.

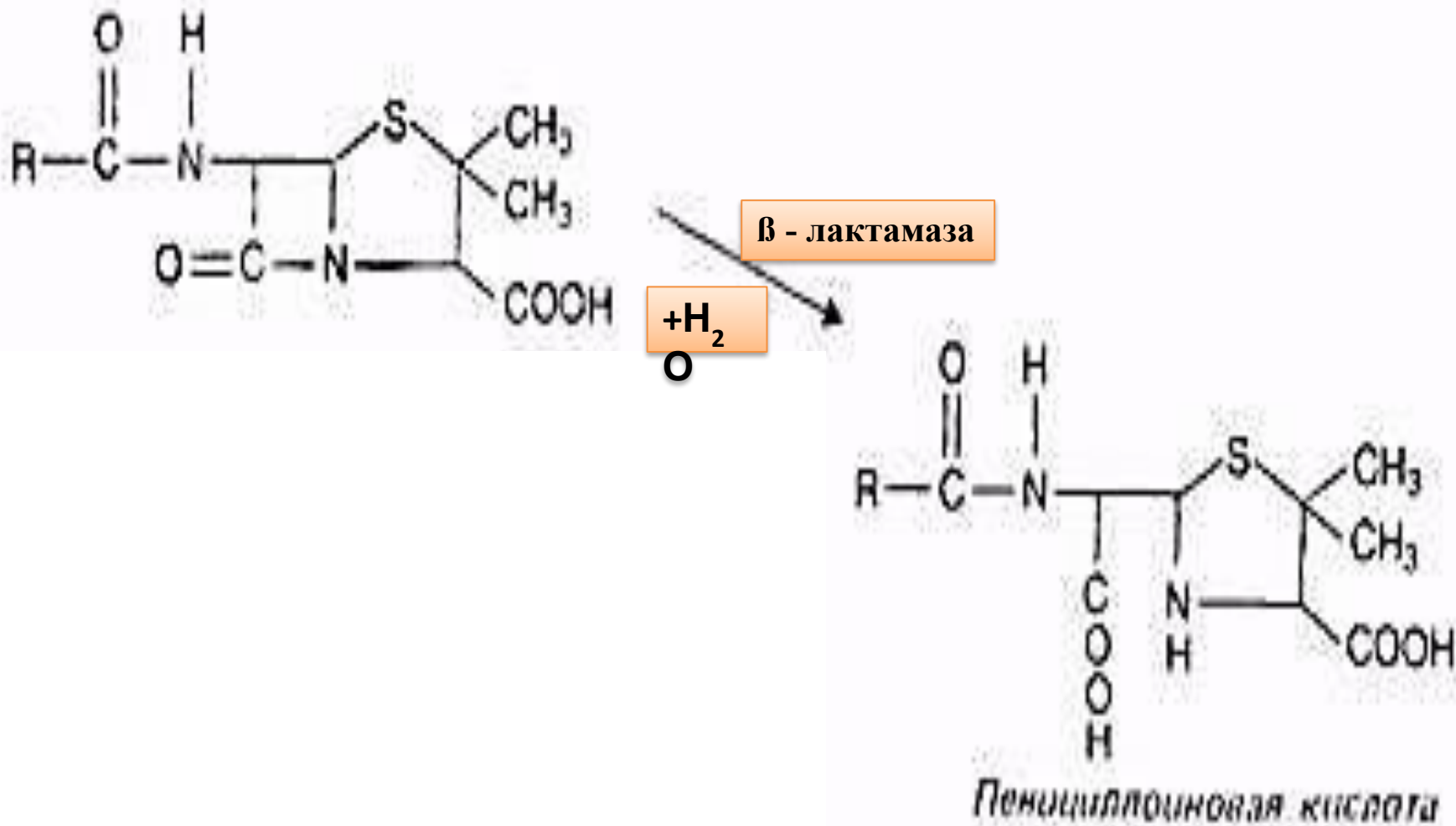
Пенициллины

В основе бициклическая структура, состоящая из β -лактамного кольца, соединенного с тиазолидиновым кольцом, образуют 6-аминопеницилановую кислоту (6-АПК).

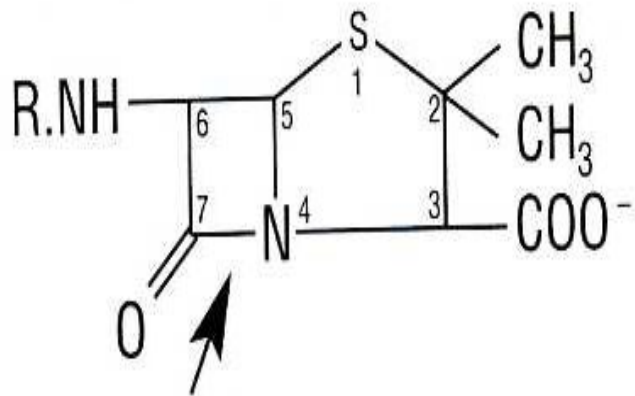


Целостность 6-АПК важна для проявления антибиотических свойств.

Гидролитическое расщепление пенициллинов ферментами пенициллиназообразующих м/о → неактивные производные пеницилловой кислоты



Пенициллины



6-АПК не проявляет антибиотических свойств (0,002 активности бензилпенициллина), но обеспечивает антибактериальную активность ее производных.

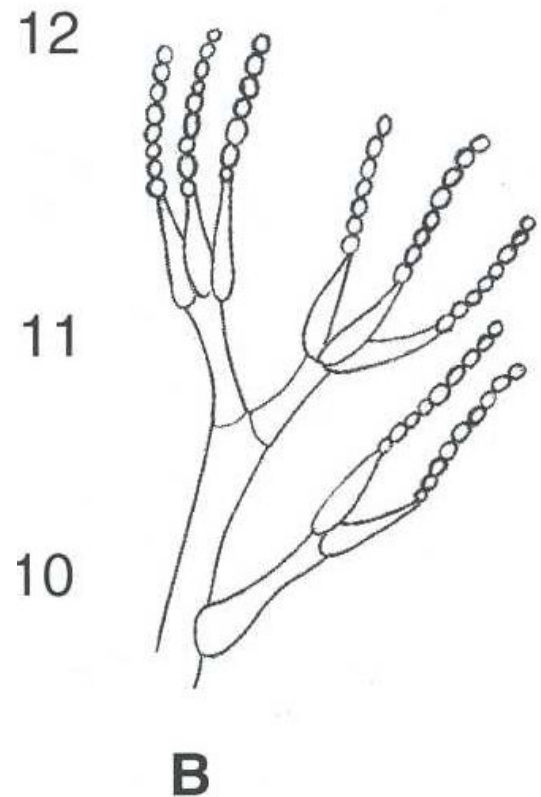
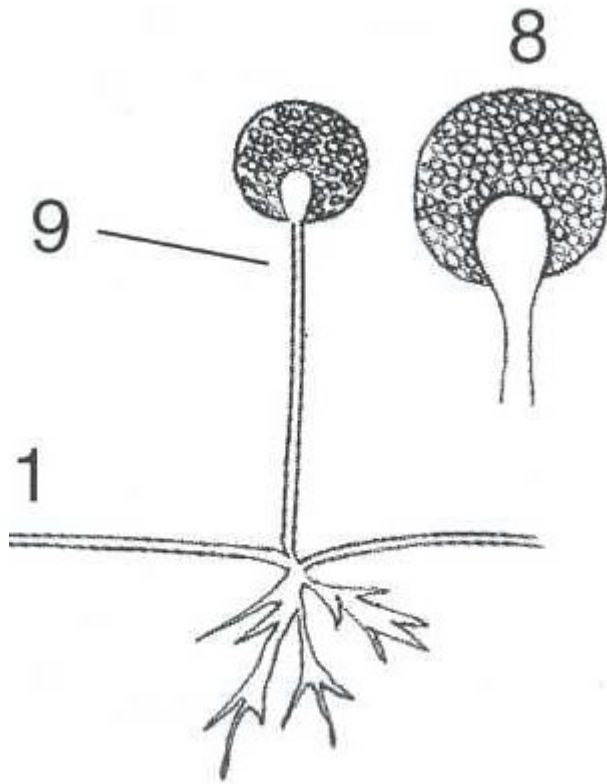
Различные типы пенициллинов близки по строению и отличаются лишь строением радикала R

Липосомирование

пенициллинов позволяет:

1. Защитить антибиотик от воздействия β -лактамазы;
2. Увеличить проницаемость через мембрану Gr- бактерий;
3. Увеличить химическую стабильность антибиотика;
4. Увеличить доступность для жировых тканей макроорганизма

Пенициллины. Продуцент – *Penicillium chrysogenum*.



Несовершенный (митоспоровый) гриб.

Вегетативные структуры: столоны и ризоиды (1). Анаморфы*: спорангии со спорами (8) спорангиеносец (9); конидиеносец (10); стеригмы (11); конидии (12)

***Анаморфы** — обобщенное название всех структур вегетативного и бесполого редукционного размножения грибов.

Пенициллины.

Особенности культивирования

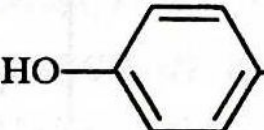
- *Penicillium chrysogenum*
- Вырабатывает сильные протеолитические ферменты, поэтому способен расти на грубой ПС, содержащей:
 - Арахисовую муку
 - Муку хлопковых семян
 - Жмых (отходы)
 - Лактозу, сахарозу (глюкоза нежелательна, т.к. комфортна для продуцента)
 - Натрия сульфат, тиосульфат
 - Фосфаты, фитаты
- Трофофаза. Оптимальная температура: +30°;
- ИДИОФАЗА: +20°С

Предшественники биосинтеза пенициллина

P. chrysogenum синтезирует разл. антибиотики, отличающиеся строением радикала R, антибиотич. активностью и спектром биол. действия.

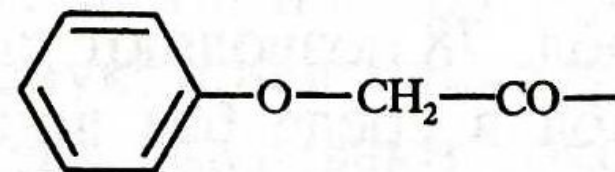
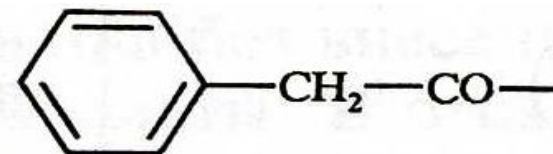
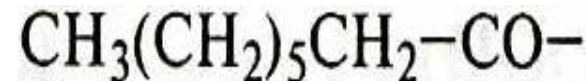
Вид превалирующего вырабатываемого антибиотика определяется веществом предшественником - мутасинтоном, содержащимся в ПС – веществом, которое гриб тем или иным путем включает в молекулу 6-АПК.

Различные типы природных пенициллинов и строение их радикалов

Название пенициллина		Строение радикала R	Активность натриевых солей в отношении <i>Micrococcus pyogenes</i> , ед./мг
общепринятое	условное		
Бензилпенициллин	G	 $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CO}-$ Фенилуксусная	1667
п-Оксибензилпенициллин	X	 $\text{HO-C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CO}-$ п-оксифенилуксусная к., фенилацетамид	900
2-Пентенилпенициллин	F	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CO}-$	1600
п-Гептилпенициллин	K	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{CO}-$	2300
п-Амилпенициллин	Дигидро F	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CO}-$	1500
Феноксиметилпенициллин	V	 $\text{C}_6\text{H}_5\text{OCH}_2\text{CO}-$ Феноксиуксусная	1670
Аллилмеркаптометилпенициллин	O	$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{SCH}_2\text{CO}-$	1630

Влияние предшественников на образование пенициллинов культурой *P. chrysogenium*

- 1. **Без** внесения **предшественника** образуется преимущественно гептилпенициллин (низкоактивный) – до 70%;
- 2. При добавлении к ПС производных **фенилуксусной кислоты** увеличивается общий выход пенициллинов, а концентрация гептилпенициллина уменьшается. Возрастает выход высокоактивного бензилпенициллина (до 99%)
- 3. При добавлении к ПС **феноксиуксусной кислоты** гриб образует феноксиметилпенициллин (пенициллин V) – пенициллин для перорального приема



Гипотеза

Большинство предшественников токсичны для гриба.

С биологической точки зрения использование грибом предшественников для синтеза пенициллинов рассматривается как **«защитный синтез»** = обезвреживание токсичного предшественника путем связывания с продуктами обмена гриба и экскреция за пределы клетки

Особенности биосинтеза пенициллина

- Посторонние микроорганизмы **снижают** выход пенициллина, т.к. продуцируют пенициллиназу
- Все технологические операции ведут в условиях строгой стерильности
- Пенициллин выделяется грибом в культуральную среду.
- Из культуральной жидкости пенициллин экстрагируют в кислотной форме неполярным растворителем (хлороформ, бутанол, бутилацетат)
- Экстракт обрабатывают водным раствором щелочи для перевода кислотной формы пенициллина в соль
- Образовавшаяся соль растворяется в воде. Экстракт обрабатывают водой.

Процедуру повторяют многократно

Полусинтетический способ получения пенициллинов

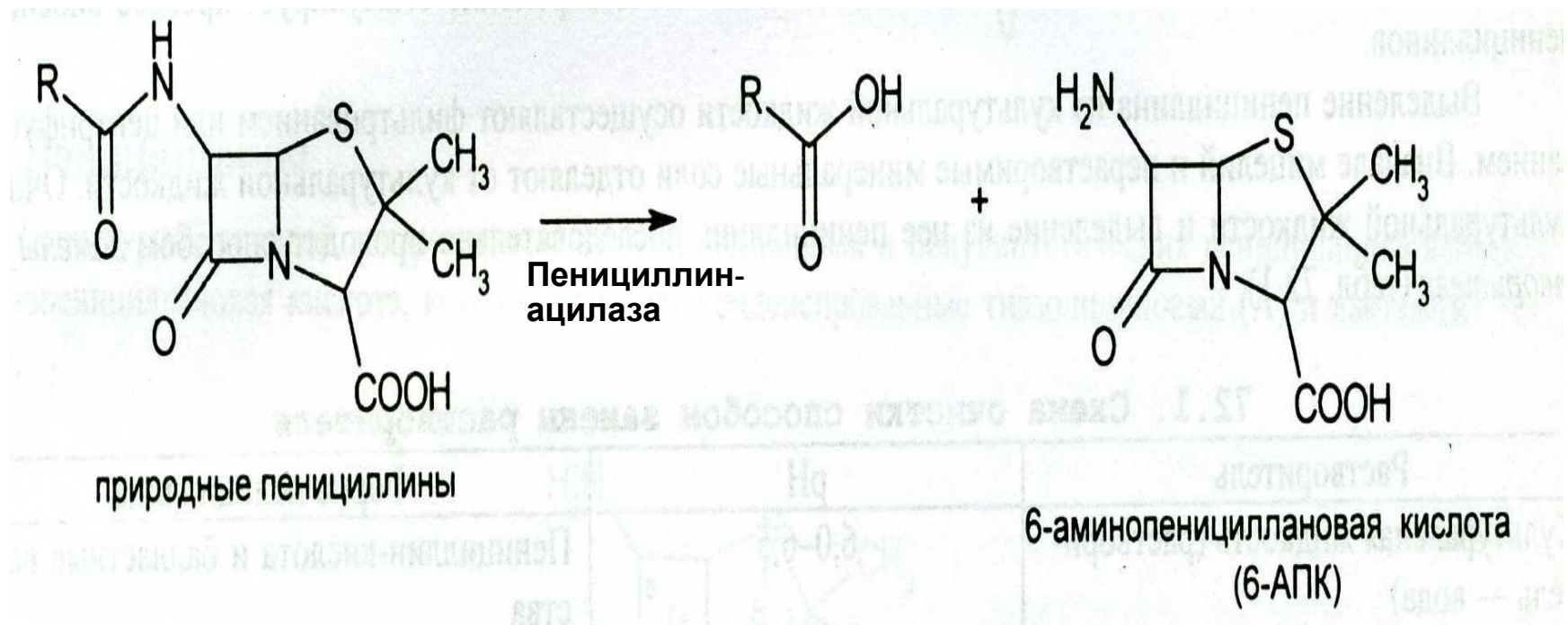
1. В результате биосинтеза при развитии *P.chrysogenium* получают природный пенициллин
2. Далее продукт (чаще всего бензилпенициллин) извлекают из КЖ и гидролизуют иммобилизированной **пенициллинацилазой** бактериального происхождения с образованием 6АПК
3. **Ацилируют амин в молекуле 6-АПК соответствующей кислотой или ее хлорангидридом**

1 стадия

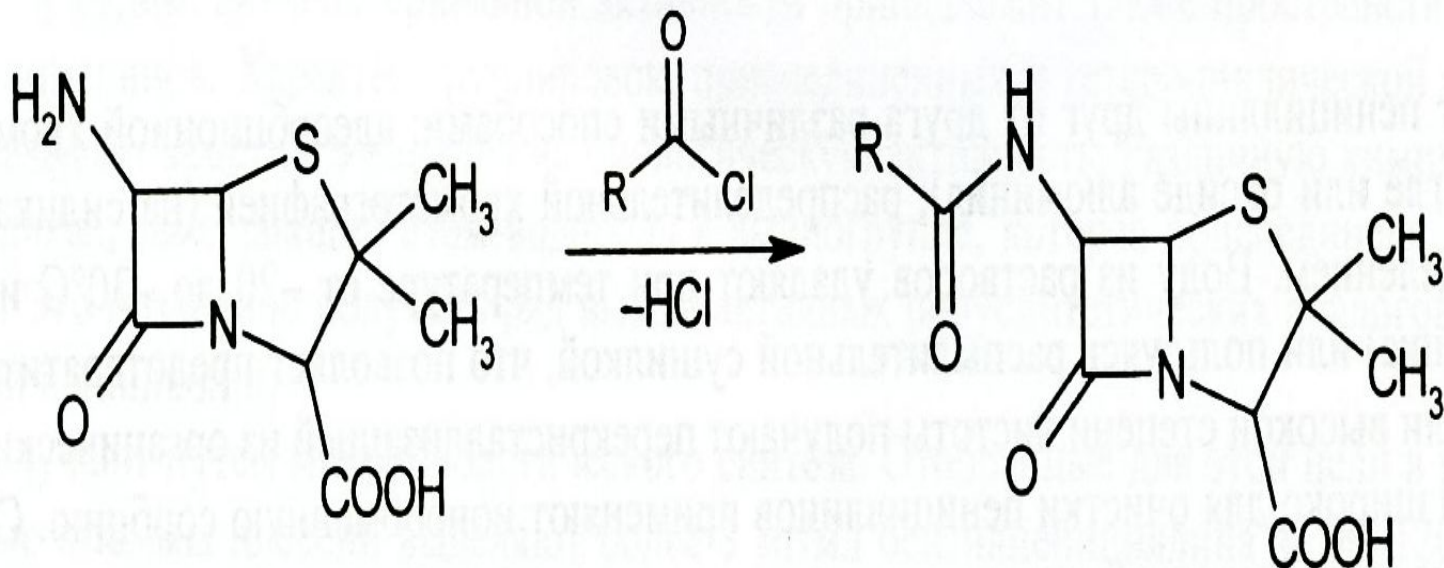
производства

полусинтетических пенициллинов

Природный антибиотик извлекают из КЖ экстракцией или с помощью ионообменной хроматографии и с помощью фермента пенициллин**ацил**азы отщепляют природный радикал:



2 стадия



6-аминопенициллановая кислота
(6-АПК)

полусинтетические пенициллины

Ацилирование амина в молекуле 6-АПК соответствующей кислотой или ее хлорангидридом

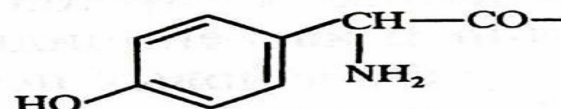
На основе **6-АПК** синтезировано более **20** тысяч полусинтетических пенициллинов

Наиболее ценные полусинтетические пенициллины

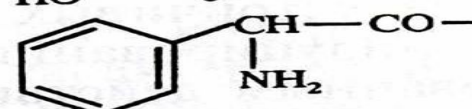
название пенициллина

строение радикала **R**

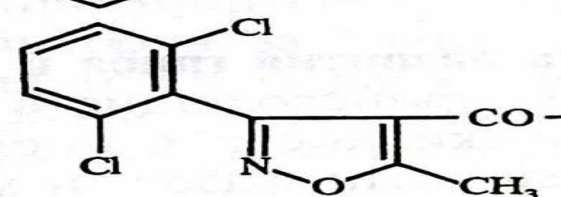
Амоксициллин



Ампициллин



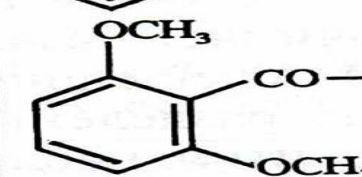
Диклоксациллин



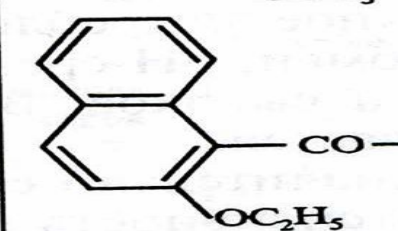
Карбенициллин



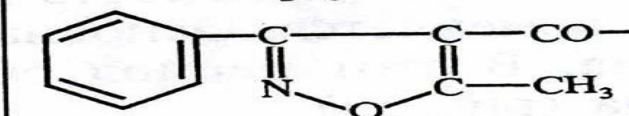
Метициллин



Нафциллин

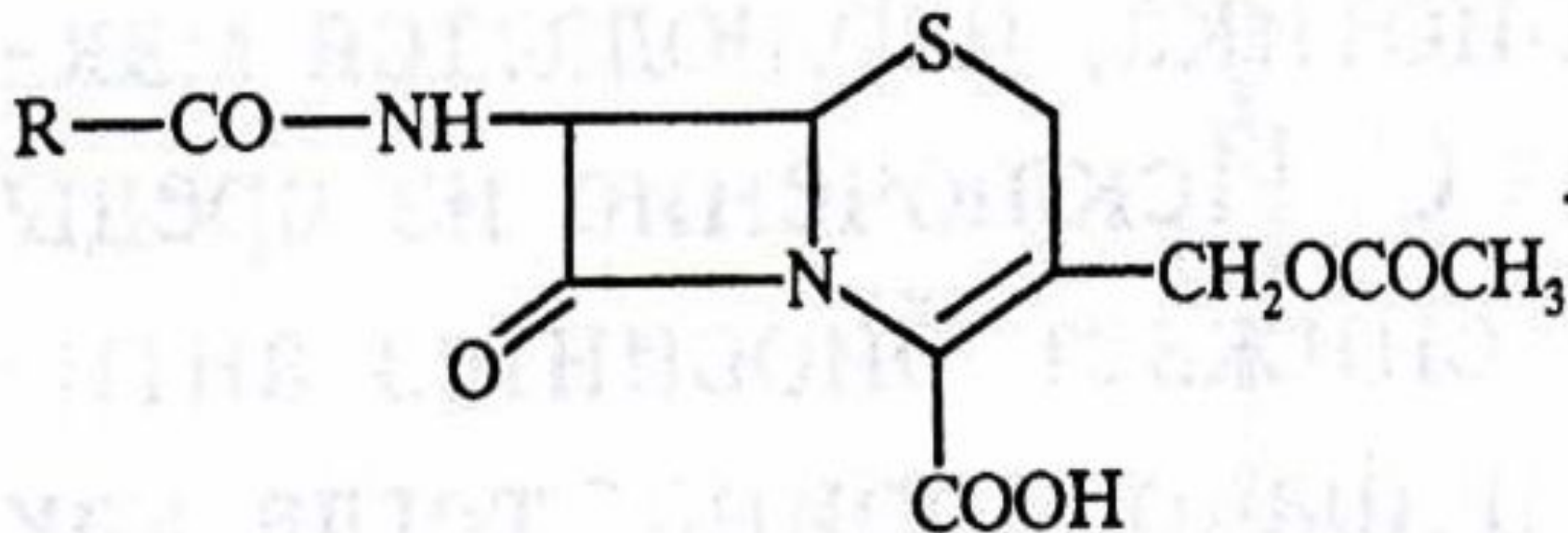


Оксациллин



ЦЕФАЛОСПОРИНЫ. ШСД

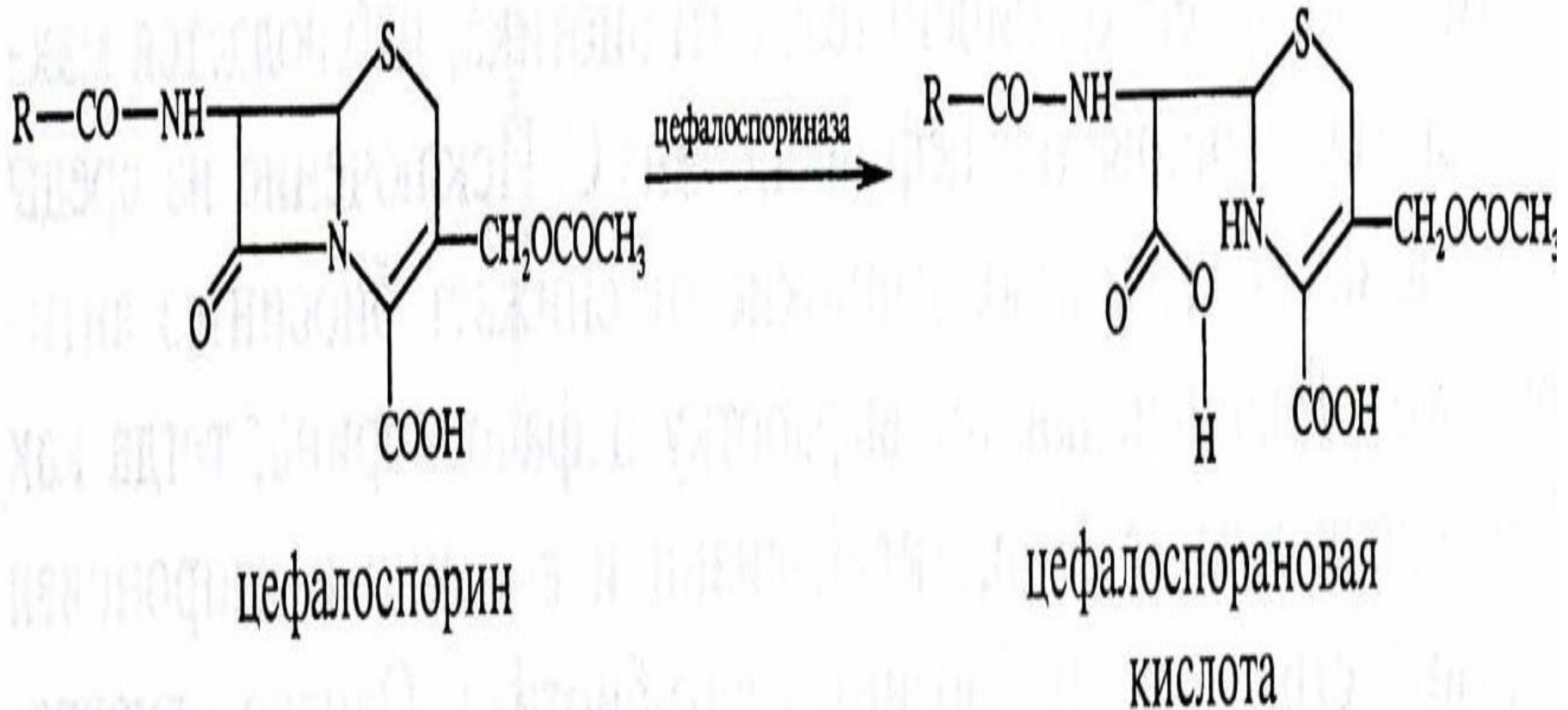
- Продуцент – гриб рода *Cephalosporium acremonium* (переименован в *Acremonium chrysogenum*), выделен в 1945 г.
- Проникают через клеточную оболочку не только Gr+ но и Gr- микроорганизмов



цефалоспорин

β -лактамное кольцо сопряжено с
дигидротиазиновым кольцом

Устойчив к β -лактамазе, но расщепляется ферментом – **цефалоспориной** (вырабатывается лишь немногими м/о рода *Enterobacter*)

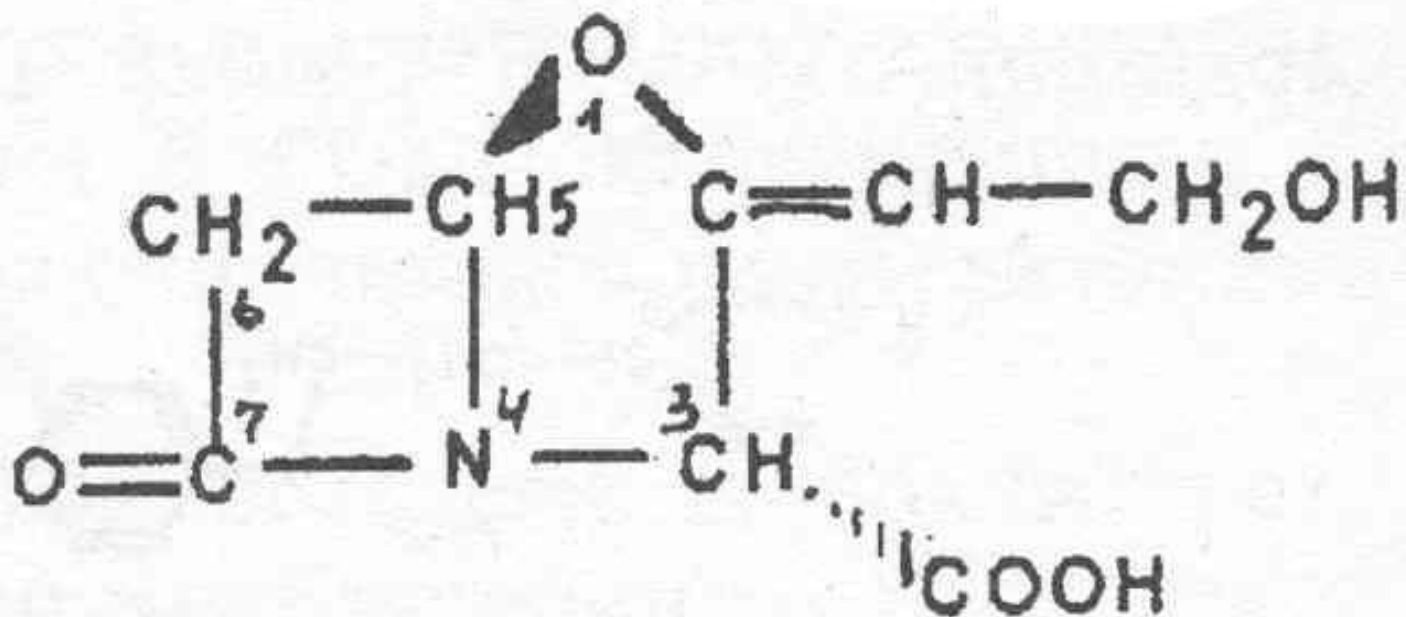


Механизм действия пенициллинов и цефалоспоринов

Ингибируют синтез клеточной стенки микроорганизмов. Связываются с пенициллинсвязывающими протеинами (ПСП) – клеточными рецепторами м/о. В результате возможны различные реакции:

- аномальное увеличение микробной клетки;
- нарушение строения поверхности клеточной мембраны;
- останавливается синтез гликопротеина;
- активируется литический фермент в клеточной стенке, что приводит к лизису клетки

ИНГИБИТОРЫ ЛАКТАМАЗ



клавулановая кислота

Клавамы - (3-лактамы антибиотики, отличающиеся от пенициллинов тем, что в тиазолидиновом кольце последних сера заменена на кислород (*клавемовое оксазолидиновое кольцо*) и в позиции 6 нет боковой цепи. В сочетании с ампициллином и амоксициллином является основой комбинированного препарата *аугментин*.



Карбапенемы - новое семейство лактамных антибиотиков, представляющих собой аналоги пенициллинов или клавамов, в которых сера у первых и кислород у вторых замещены на углерод. К этому семейству относятся *оливановые кислоты* и *тиенамицин*

ИММУНОБИОТЕХНОЛОГИЯ

- раздел биотехнологии, предметом кот. явл. научная конструирование, разработка и производство ЛС, влияющих на процессы иммунной системы.

Иммунобиотехнологические ЛС предназначены для профилактики, лечения, диагностики инфекционных и неинфекционных болезней.

Программные вопросы:

Биотехнология МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ
(МАТ)

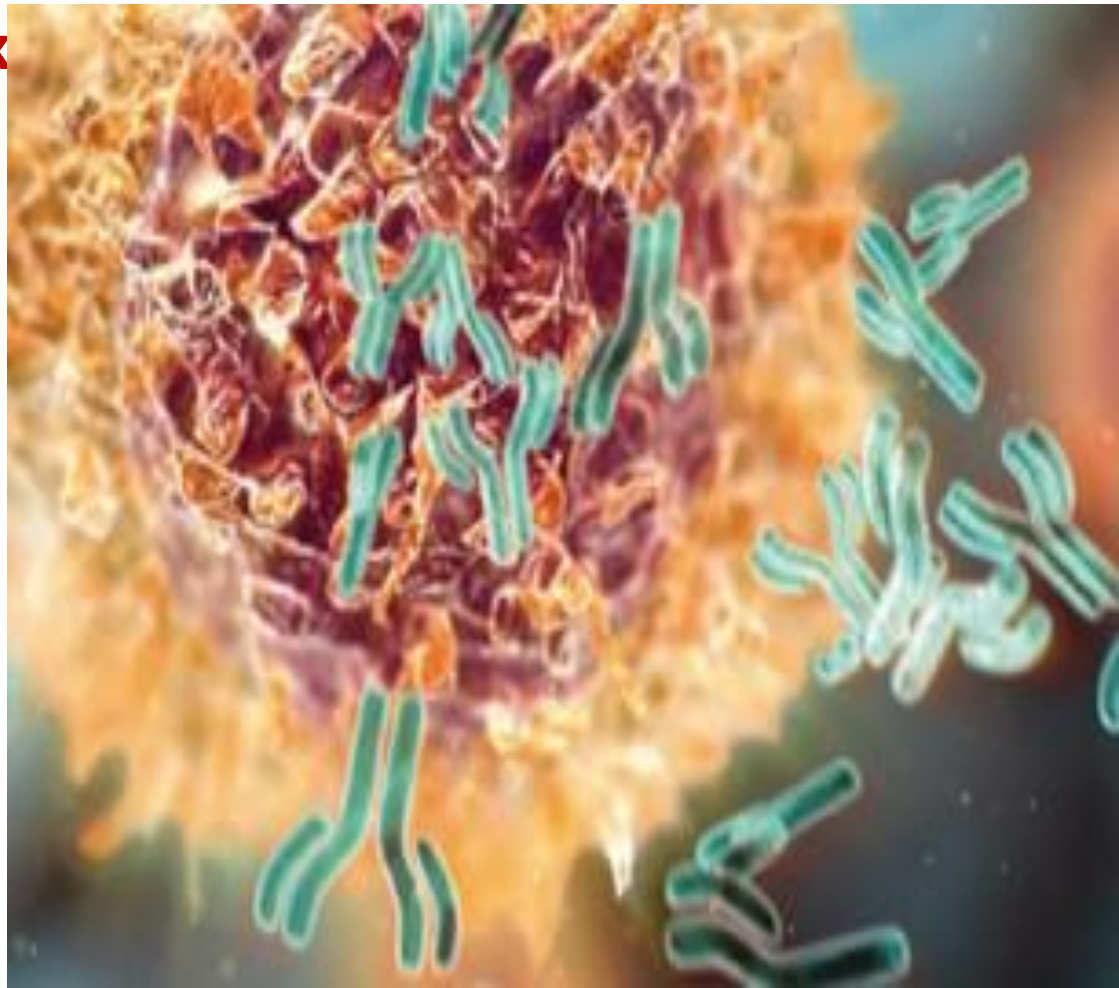
Антиген (АГ - Antigenum)

– в-во или существо, воспринимаемое организмом как чужеродное и вызывающее специфический иммунный ответ – выработку антител.

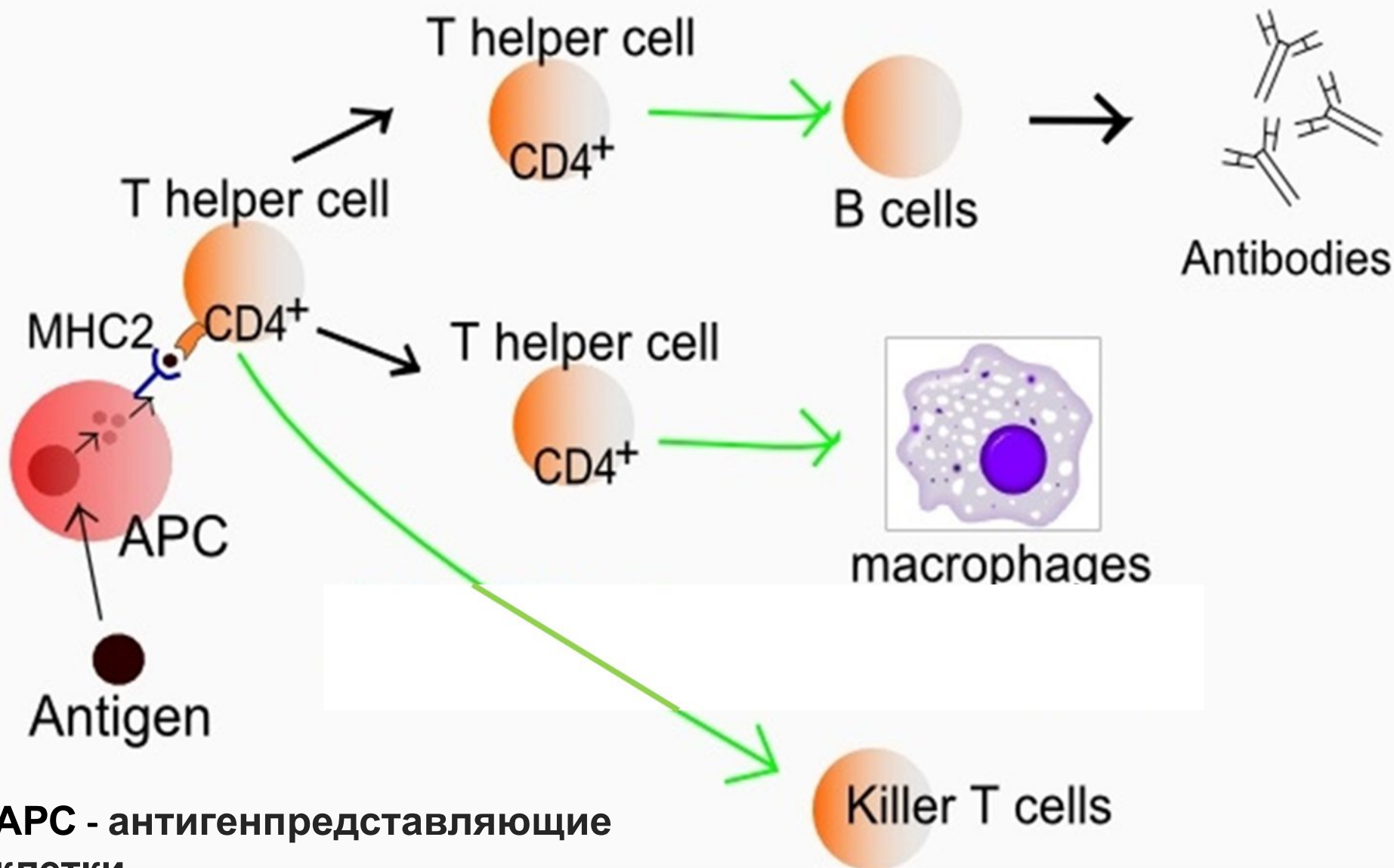
Бактерии, вирусы, чужеродные белки, токсины, чужие и собственные клетки, мех

Антитела (АТ)

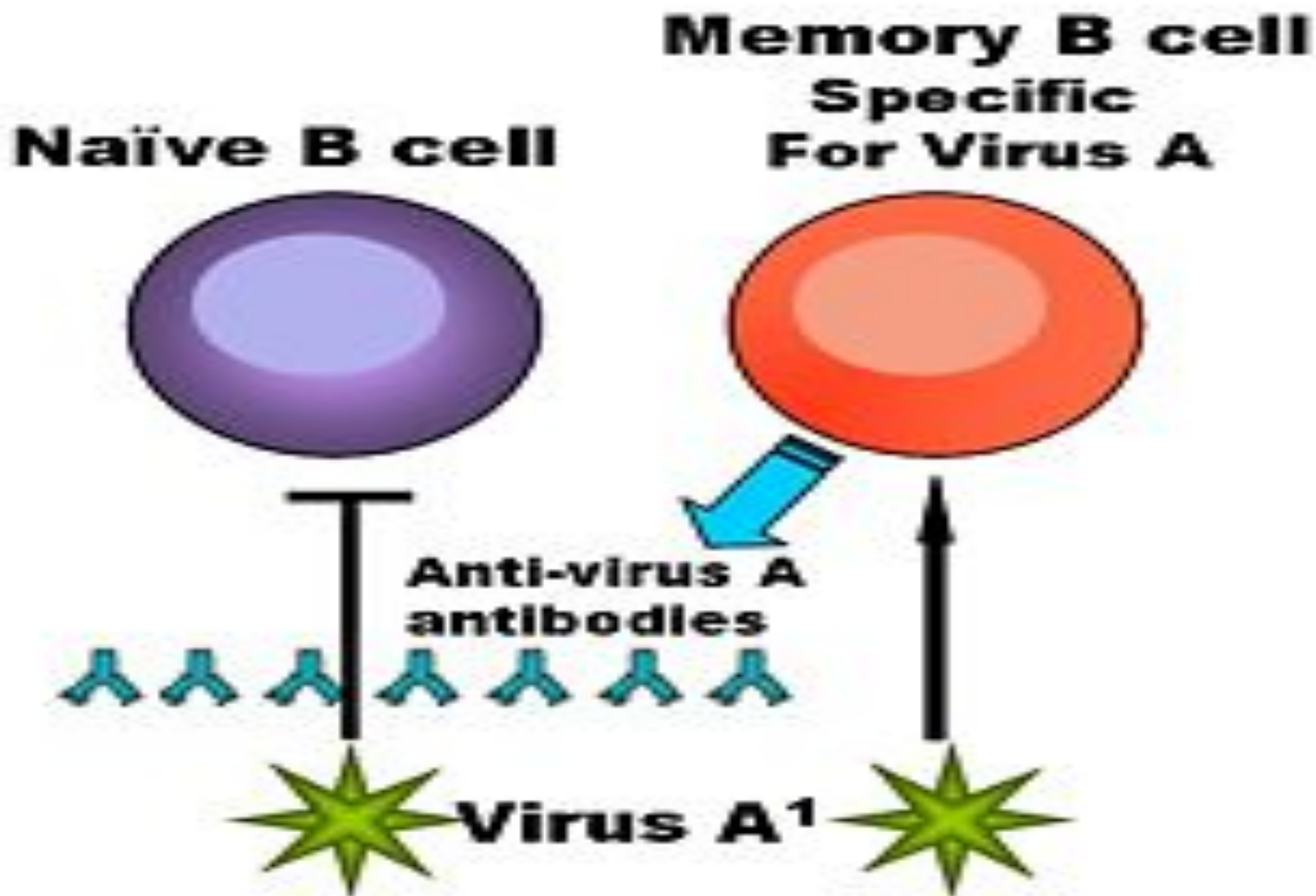
- белки макроорг-ма, синтезируемые и секретируемые *В- лимфоцитами* в ответ на попадание в организм различных АГ и специфически с ними взаимодействующи
е



Принципиальная схема механизма иммунной памяти у В-лимфоцитов

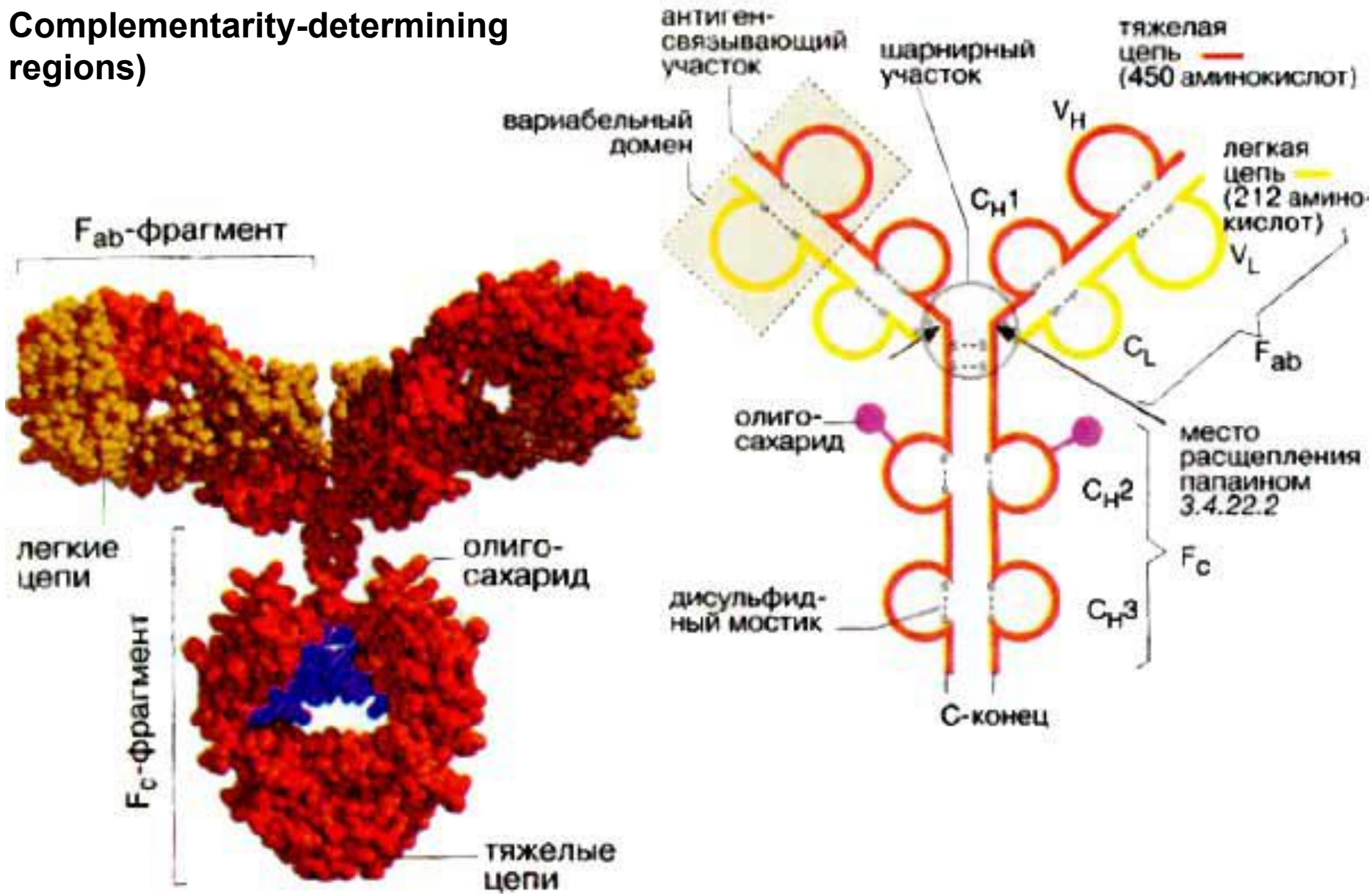


Механизм иммунной памяти В-лимфоцитов



Структура антитела

Complementarity-determining regions)

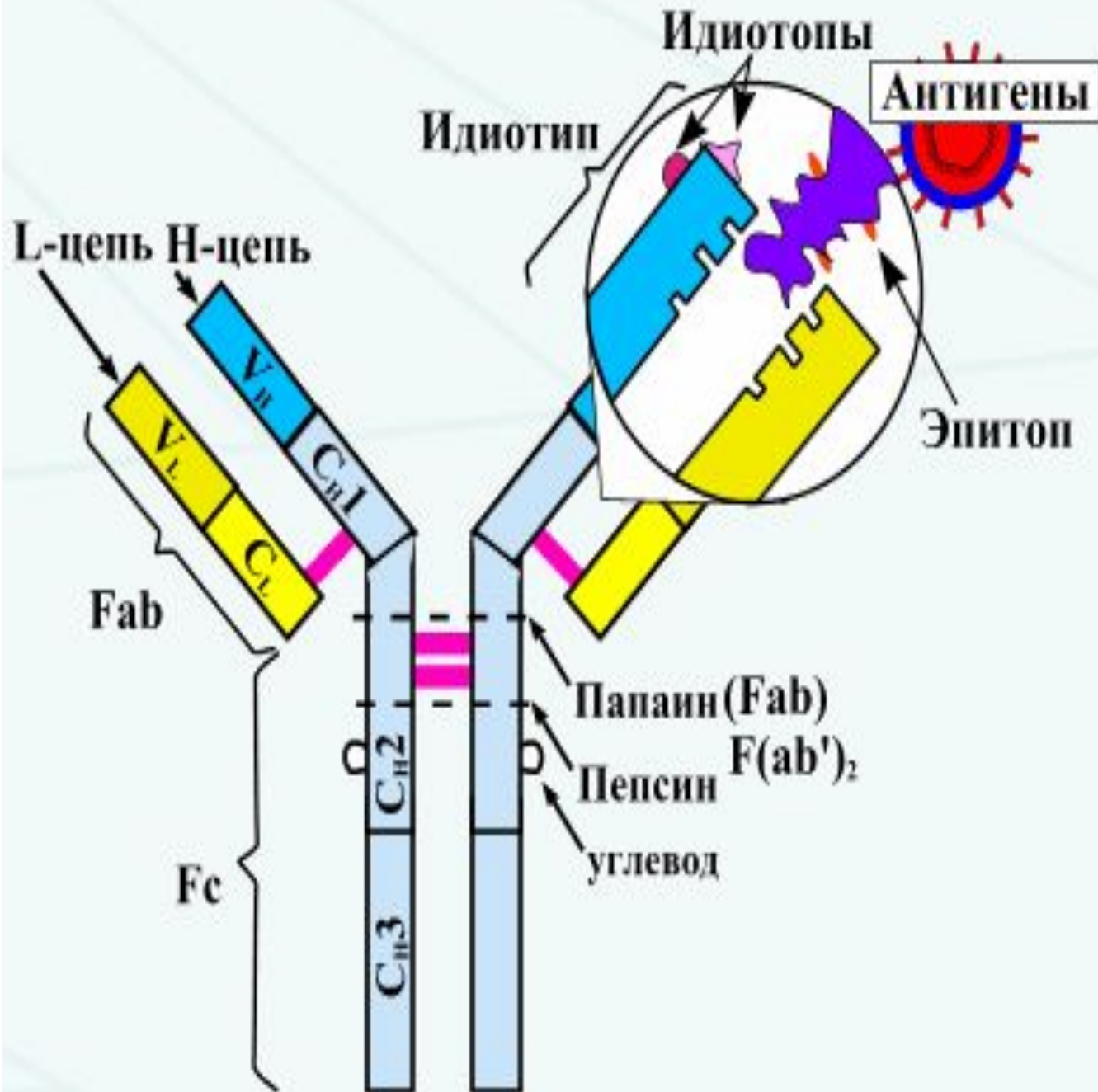


Вариабельные области молекулы антитела

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.

Активный центр антител - антигенсвязывающий участок иммуноглобулина - **идиотоп**, образованный гипервариабельными участками H- и L-цепей, связывает **эпитопы** антигена. В активном центре имеются специфичные комплементарные участки к определенным антигенным эпитопам

Идиотип АТ определяется антигенсвязывающими свойствами переменных участков (V-областей). Идиотип состоит из набора **ИДИОТОПОВ** - антигенных детерминант V-области антитела.

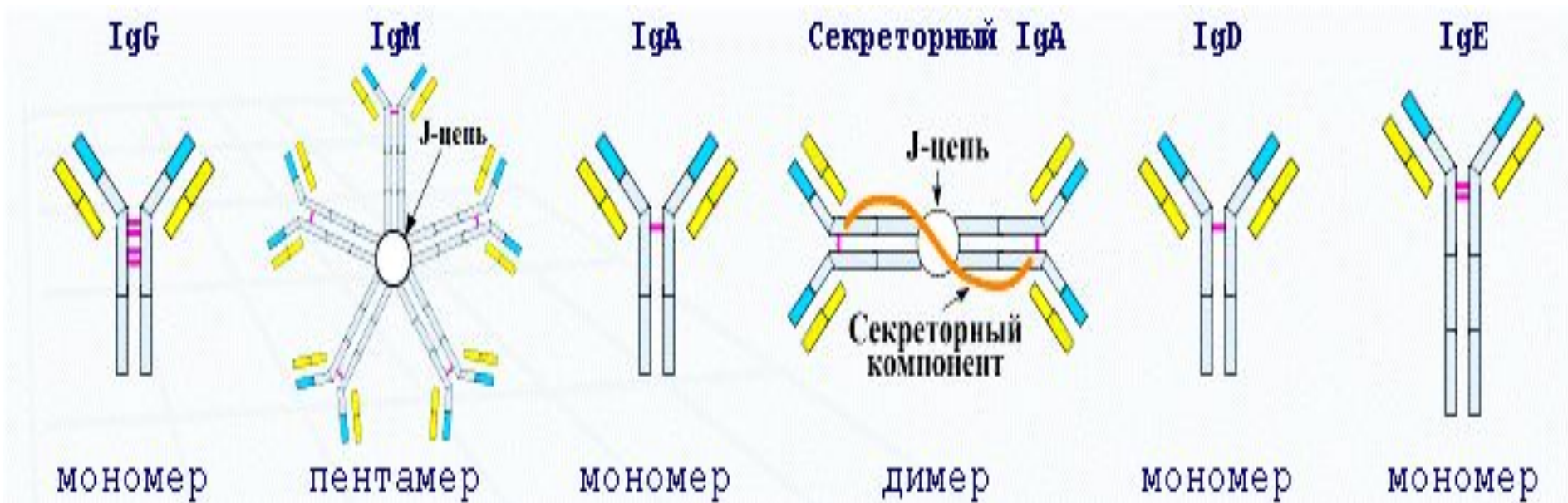


Константные области молекулы антитела

- Каждая L-цепь содержит одну постоянную (константную) область (C_L),
- Каждая H-цепь – три константных области (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3})
- Константная область может связывать комплемент, взаимодействует с мембранами клеток и обеспечивает присоединение к собственным клеткам макроорганизма (фагоцитам, эффекторным клеткам и т.д.), активизирует их и обеспечивает иммунную защиту

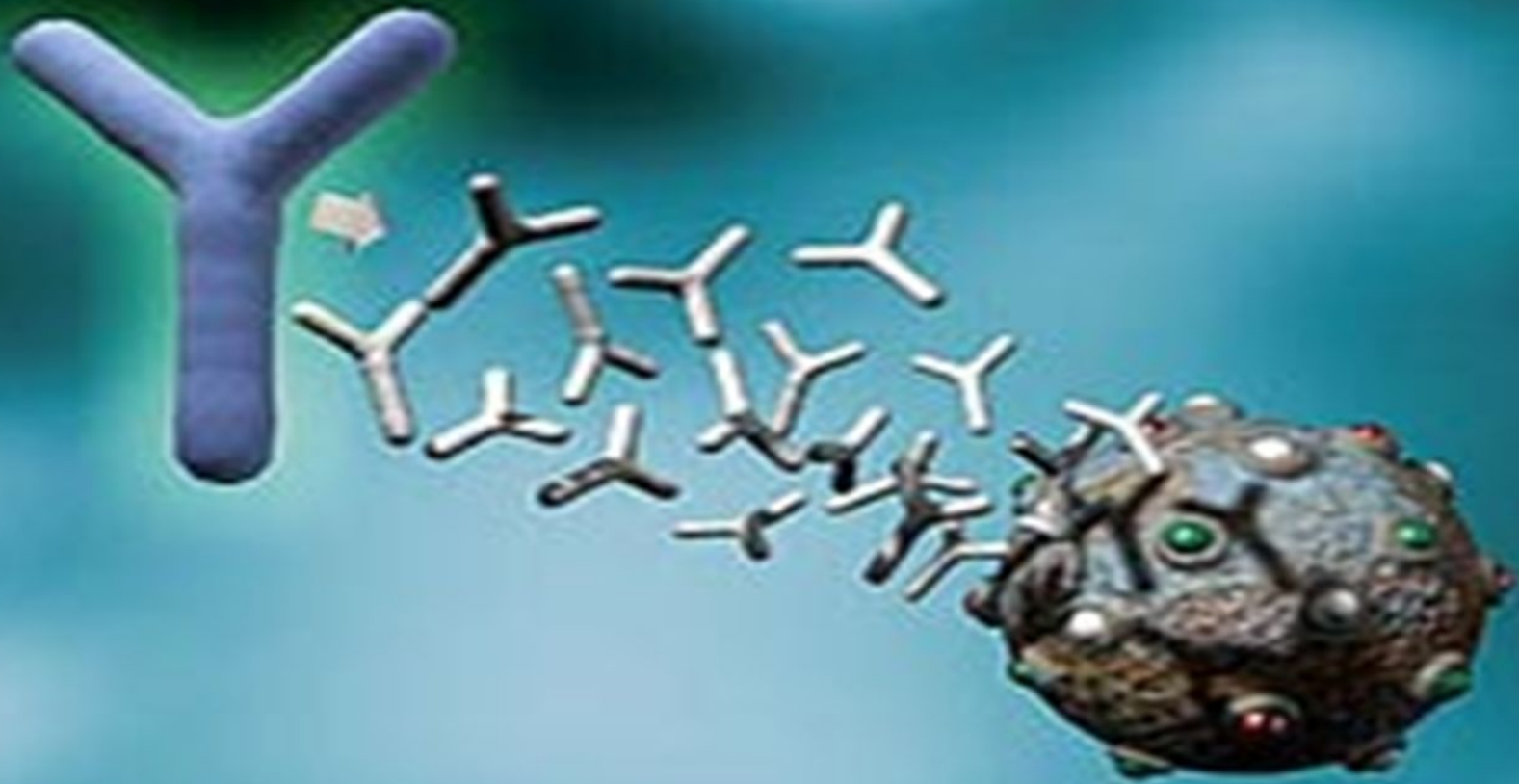
Комплементсвязывающий участок находится в C_{H2} -домене.

**По типу константной области тяжелой цепи различают 5 классов иммуноглобулинов:
IgG, IgM, IgA, IgD, IgE.**



Изотип АТ (класс, подкласс иммуноглобулинов - IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE) определяется С-доменами тяжелых цепей

В отношении большинства АГ антитела не способны их разрушать. Они лишь инициируют реакции иммунитета в отношении мишени – АГ (воспаление, фагоцитоз и др.). Т.е. функционируют как наводчики.



ОПСОНИЗАЦИЯ

КОМПЛЕКС «АНТИГЕН – АНТИТЕЛО» (АГ - АТ)



**Взаимодействие АТ с системами
естественного иммунитета собственного
организма**

Опсонизация (от др.-греч. ὀψώνιον — снабжение пищей) — процесс адсорбции опсопинов на поверхности АГ, кот. стимулирует и облегчает фагоцитоз данных частиц. Функцию опсопинов могут выполнять как антитела так и другие комплементарные молекулы организма.

Антитела связывают АГ вариабельными участками, а фрагмент Fc может связываться со специфическими рецепторами фагоцитов, лейкоцитов (моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, естественные киллеры), которые синтезируют цитокины или выделяют токсичные вещества, убивающие опсонизированные клетки. Этот процесс в макроорганизме вызывает воспаление и повреждает соседние здоровые клетки.

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

Современные направления использования моноклональных АТ (МАТ) в фармакотерапии

- **иммунодиагностика**
- **нейтрализация токсинов,**
- **борьба с бактериями, вирусами,**
- **лечение онкологических заболеваний,**
- **обеспечение направленной доставки ЛВ к мишеням**

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАТ ДЛЯ
ДОСТАВКИ ЛВ К ОРГАНАМ И
ТКАНЯМ - МИШЕНЯМ**

Технология «золотых пуль»

А



Б



Авастин (бевацизумаб)



Рекомбинантные МАТ
селективно
связываются с
*vascular endothelial
growth factor* (VEGF,
- фактором роста
эндотелия сосудов
опухоли) и
нейтрализуют его.



**угнетение роста
опухоли**

Тромболитики и антикоагулянты

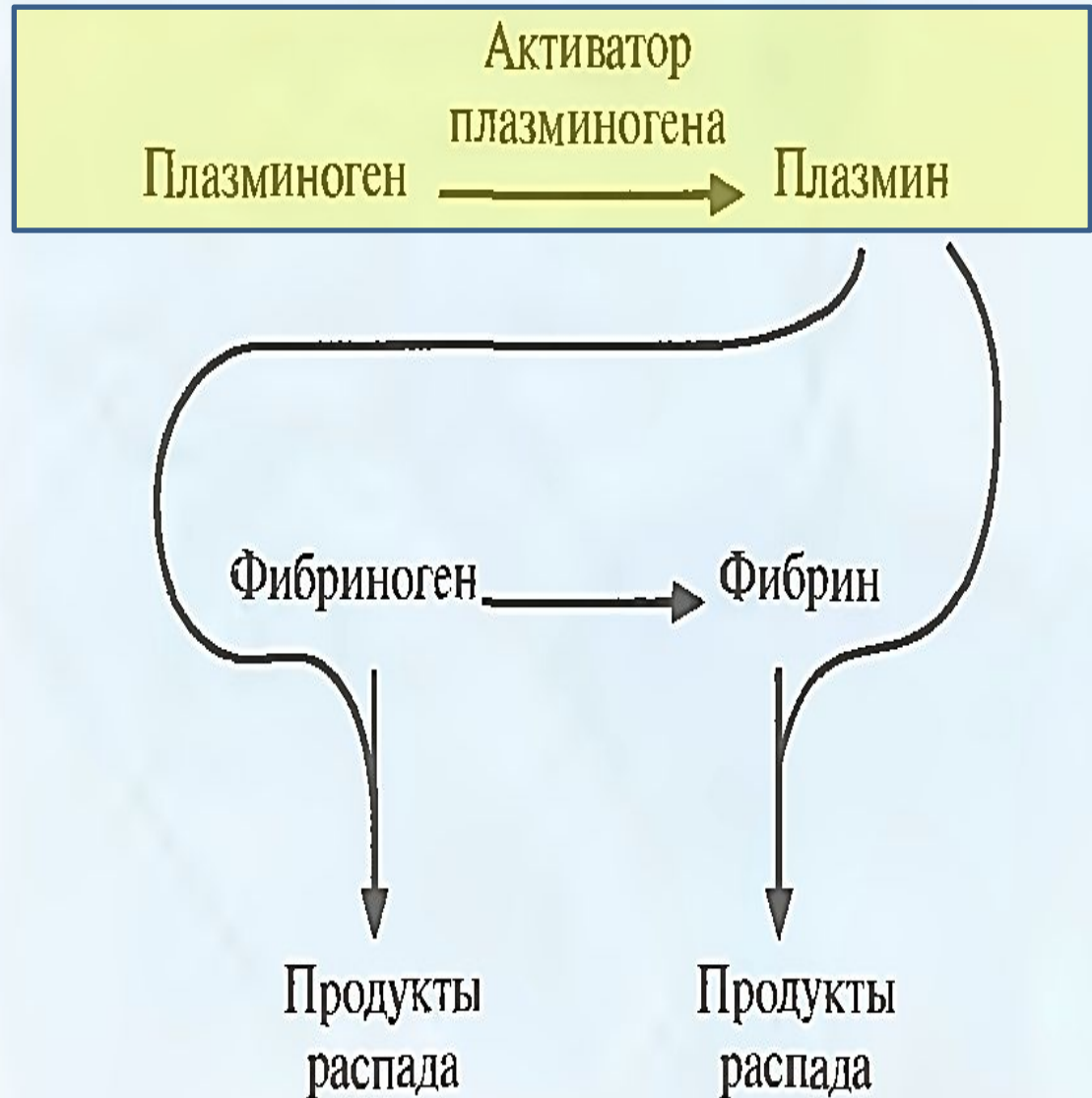
Тромб сост. из м-л **фибрина**, обр. **сеть**. Сеть создается в ответ на повреждение стенки кров. сосуда.

В **N** м-лы фибрина в тромбе расщепляются **плазмином** сериновой протеиназы (**фибринолизин**).

Плазмин обр. из **плазминогена** под д-ем **активатора**. В патологии (часто) эта с-ма не эфф. → закупорка артерий.

Для ↑ ур-ня плазмينا в крови предложено исп. **АПг**.

Но плазмин м. разрушать и фибриноген (предшественник фибрина). И если ур-нь фибриногена в рез.



Тромболитические ЛС, разрушающие фибрин в образовавшемся тромбе

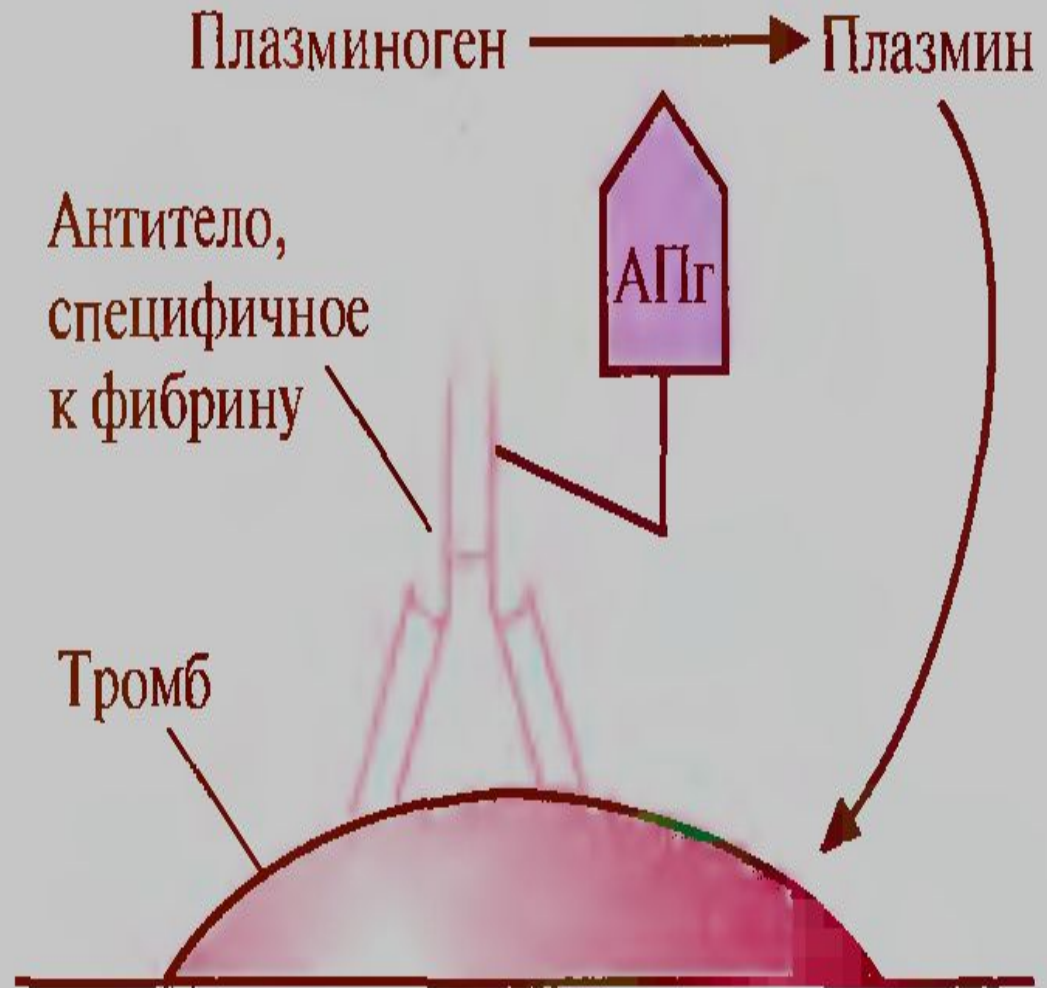
К АПг «пришили»
МАТ, **специфичное к
фибрину** (обр.
ИТАПг).

Комплекс связ. т-ко с
фибрином,
находящимся в
тромбе, в рез. АПг
выз. локальное
накопление плазмина
вблизи тромба →
плазмин лизирует
тромб.

При этом значит.
разрушения
фибриногена в крови
не происх.



Вероятность внут.
Кровотечений ↓↓↓



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, имидинодиуксусной 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**

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.

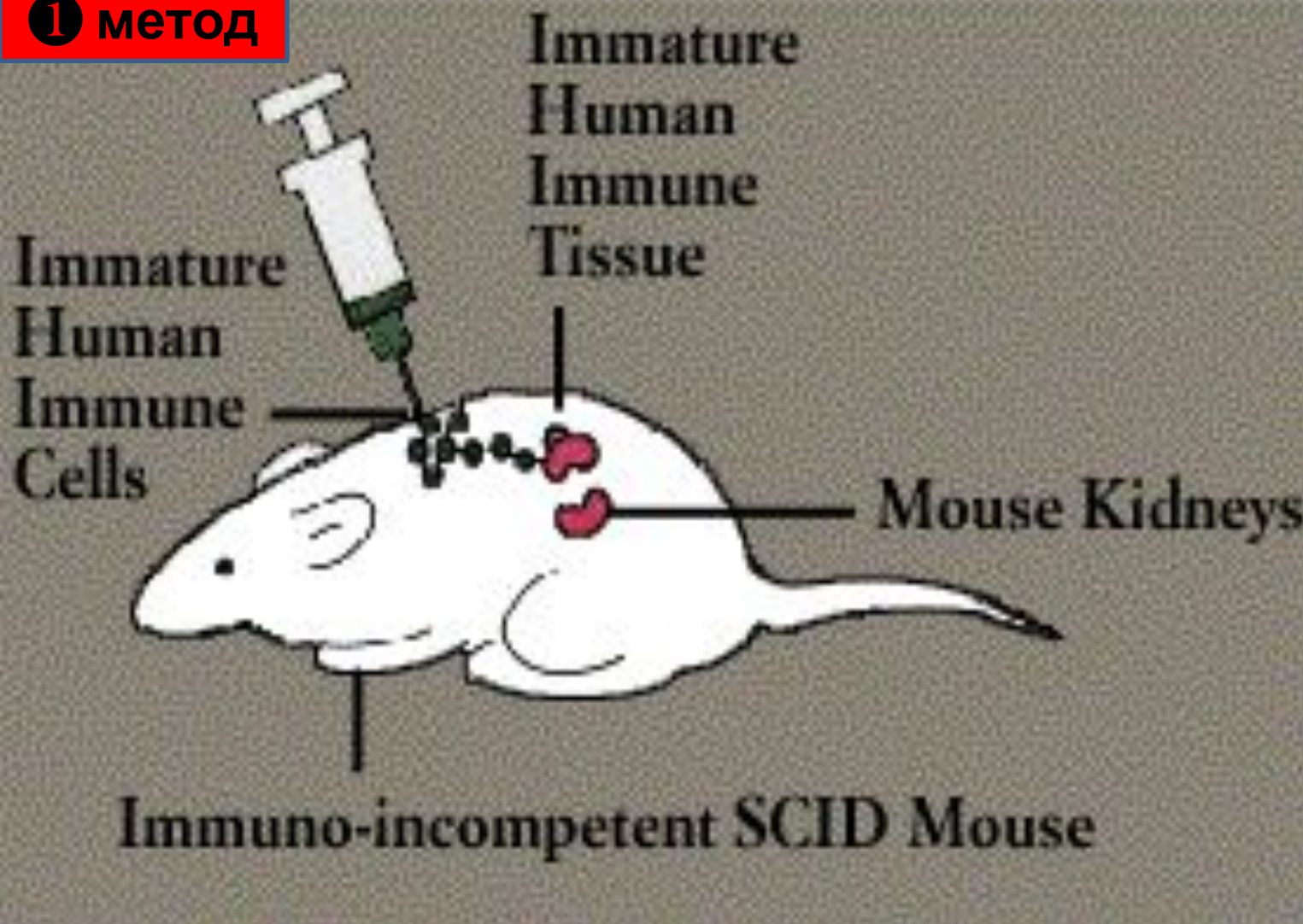
Активаторы плазминогена урокиназного типа

- 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.

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ЧЕЛОВЕКА

- МАТ животного происхождения воспринимаются организмом человека как **чужеродные белки – антигены**, и к ним вырабатываются собственные АТ человека. Происходит сенсibilизация организма.
- если предполагается многократное введение препарата, необходимо использование *АТ самого пациента, а не животных*;
- это возможно лишь когда заболевание уже началось и АТ в крови имеются (но в недостаточном количестве или они бессильны, например, в отношении клеток рака);
- создание же моноклональных АТ, специфичных к тому или иному АГ у человека проблематично, т.к. **иммунизация человека** различными АГ не проводится по **соображениям этического характера**. Для получения АТ человека необходимы иные подходы.

1 метод

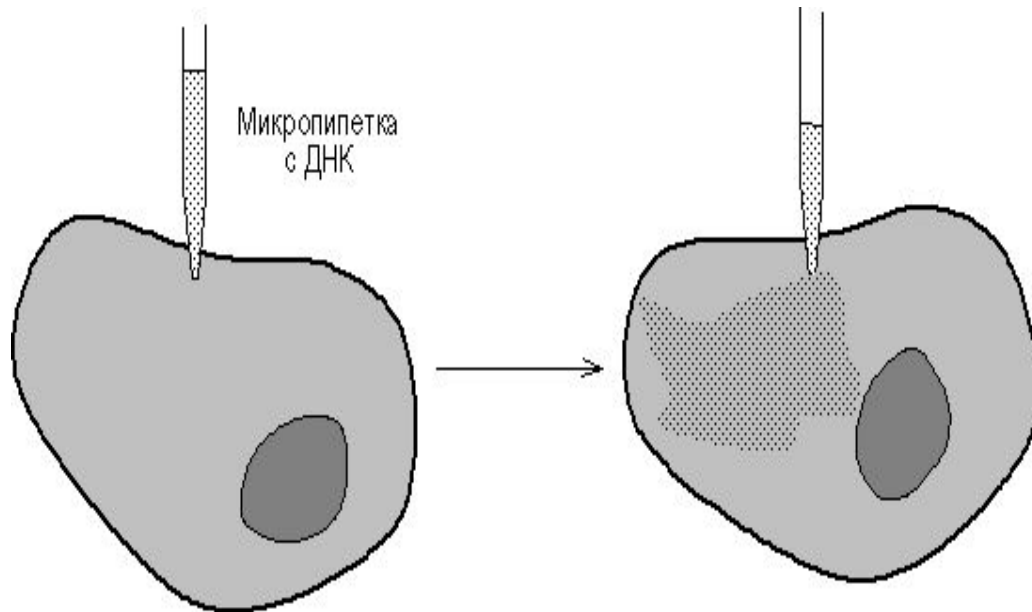


Scid - Severe combined immunologic deficiency
генетическое заболевание
, которое характеризуется отсутствием или атипичной формой Т и В лимфоцитов (мыши-мутанты)

Иммунные стволовые клетки костного мозга человека трансплантируют **Scid** мышам, лишенным собственной иммунной системы. Клетки приживаются, дифференцируются → образуются β -лимфоциты с человеческим генотипом.

Вот так из модели SCID мыши получают АТ-источника. Собственно

2 метод



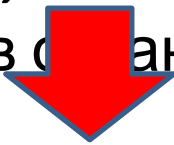
Гибридные технологии

Гены, кодирующие β -лимфоциты человека, $\rightarrow$ в зародышевые клетки мышей. Клетки имплантируют в матку мыши-матери $\rightarrow$ формируются трансгенные мыши, **кот. наряду со своими β -лимфоцитами, вырабатывают и человеческие**. 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

Установлено:

1. **Вариабельные домены АТ на один и тот же АГ идентичны и у человека и у животного.** Т.е. если лаб. животное (мышь и т.д.) и человека иммунизировать каким-либо АГ, то в организме и того и другого сформируются специфические β -лимфоциты, которые будут вырабатывать **АТ** с одинаковой последовательностью аминокислот в вариабельных доменах, и эта последовательность будет комплементарной последовательности аминокислот **АГ**.
2. **Константный домен АТ животного вызывает сенсibilизацию**, т.е. индуцирует образование перекрестных АТ в организме человека.



3 метод

3 метод

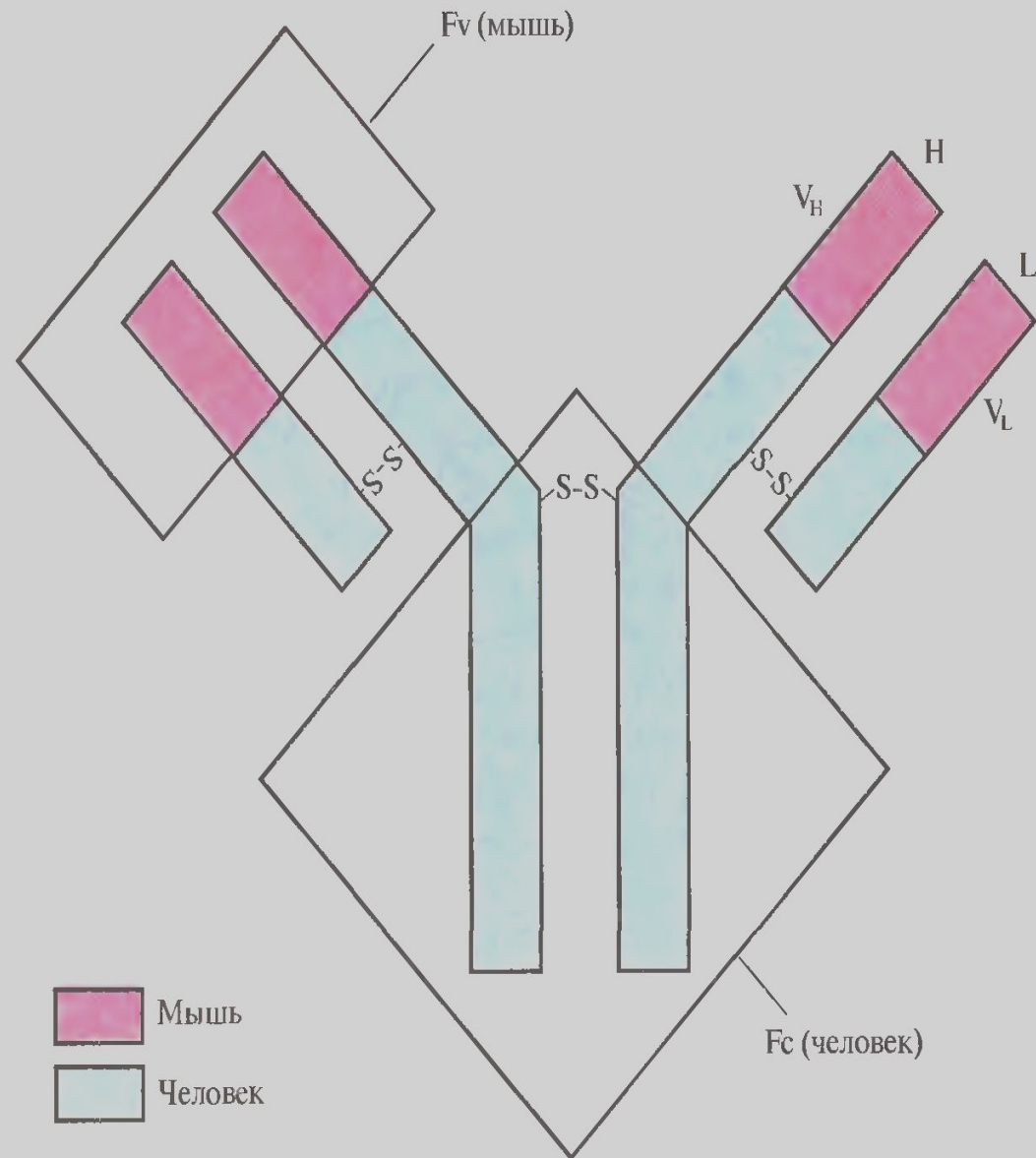
Генноинженерный (схема)

В **генах**, кодирующих L- и H-цепи АТ **человека**, заменили участки, кодирующие переменные домены (V_L и V_H) на аналогичные участки ДНК, кодирующие V_L и V_H -домены антител, выделенных из **иммунизированной** мыши. ДНК, кодирующие **химерные** цепи, встраивали в вектор и → в клетки культуры β-лимфоцитов.

В процессе жизнедеятельности такие клетки выделяли **МАТ**, **специфические к АГ**, **использованному для иммунизации мыши**.

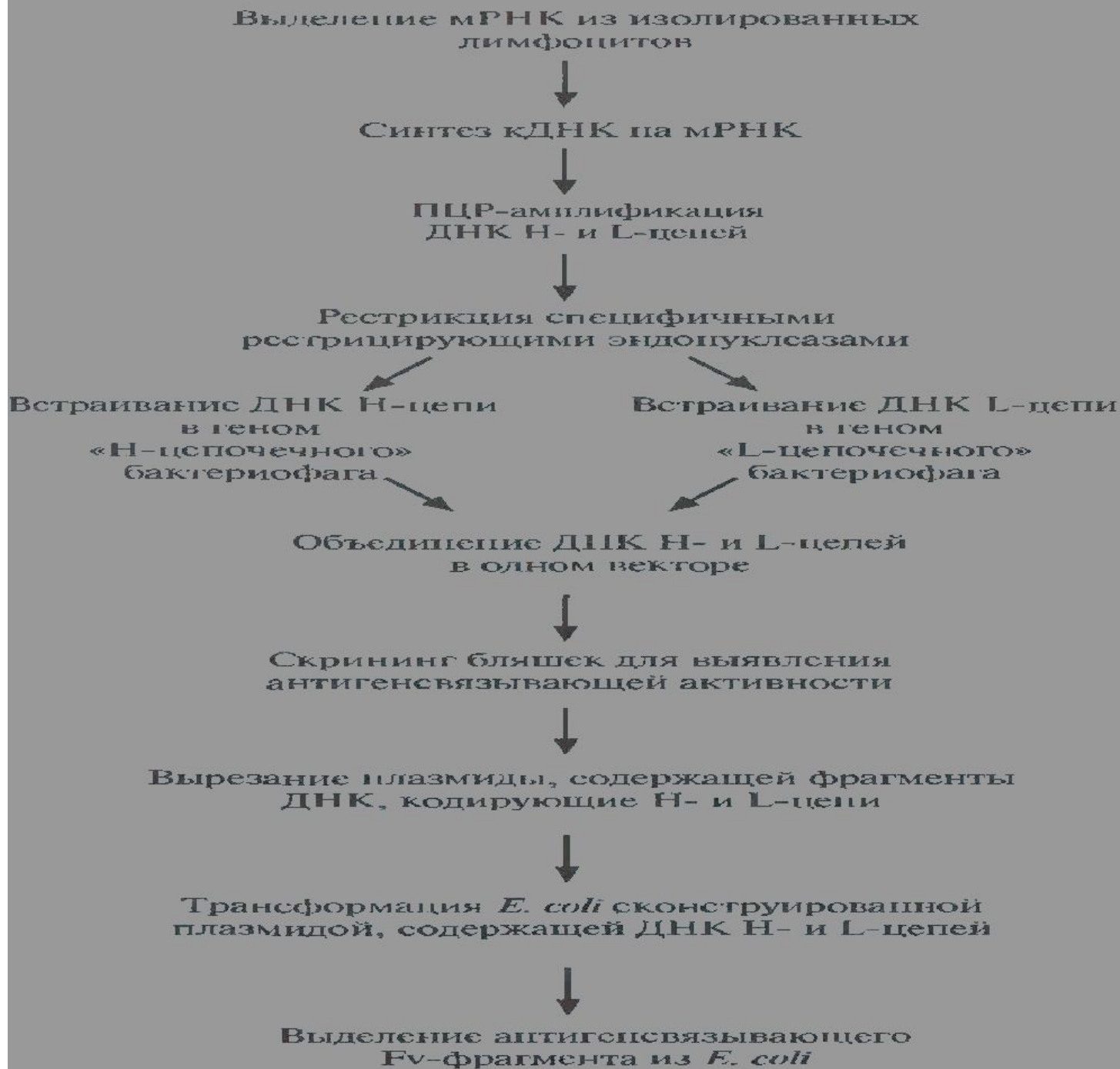
Химерные МАТ, обладают АГ-связывающей специфичностью мышиногеного АТ и эффекторными свойствами Fc-фрагмента АТ (иммуноглобулина) человека. Исп. как ЛВ

•Иммуногенность для человека



3 метод

Технология
встраивани
я ДНК,
кодирующе
й Н-цепи и L-
цепи
МАТ в
клетки
кишечной
палочки
с помощью
вектора на
основе λ-
бактериофа
га



**Общие принципы
биотехнологии
ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ**

ВАКЦИНЫ

– препараты, содержащие антигены (АГ) возбудителей инфекционных заболеваний, и предназначенные для создания искусственного **активного** иммунитета с целью профилактики и лечения соответствующего инфекционного заболевания.

Традиционные вакцины

- цельные патогенные микроорганизмы: клеточные или вирусные (АГ).

АТ, вырабатываемые в ответ на их введение, связываются с **поверхностными** белками патогенного м/о и запускают реакции иммунного ответа

I. Неживые (убитые);

II. Живые:

✓ **аттенуированные** (лат. *attenuatio* — уменьшение).
Штамм дикого типа выращивают в культуре, очищают, затем инактивируют или модифицируют до такой степени, чтобы он утратил патогенность, но сохранил способность вызывать иммунный ответ

Для инактивации используют нагревание, воздействие химических веществ, физических факторов (УЗ, температурный или осмотический шок и т.д.);

✓ **дивергентные (ВКО, БЦЖ)**

Компоненты комплекса АГ-АТ

- разрушают мембраны клеток м/о,
- активируют фагоциты,
- генерируют сигналы, мобилизующие другие компоненты системы иммунного ответа (T_H – лимфоциты, эффекторные клетки, механизмы воспаления и т.д. – см.

Взаимодействие АГ с
системами
естественного
иммунитета
собственного
организма



Проблемы и ограничения в производстве традиционных вакцин

- Не все патогенные м/о удается культивировать
- При нарушении производственного процесса в вакцины могут попасть вирулентные м/о (недостаточно ослабленные), что может привести к распространению инфекции
- Возможно инфицирование персонала. GMP регламентируют **особые правила** для работы с особо опасными м/о.
- Аттenuированные штаммы могут ревертировать к исходному дикому штамму
- Некоторые заболевания (например СПИД) нельзя предупредить с помощью традиционных вакцин



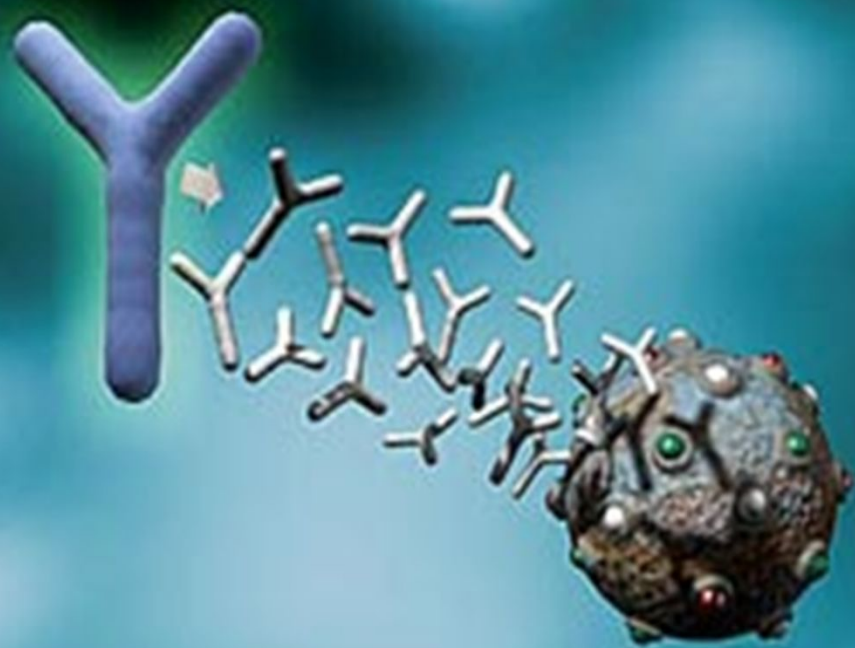
Костюм для работы с ООИ

Вакцины нового поколения

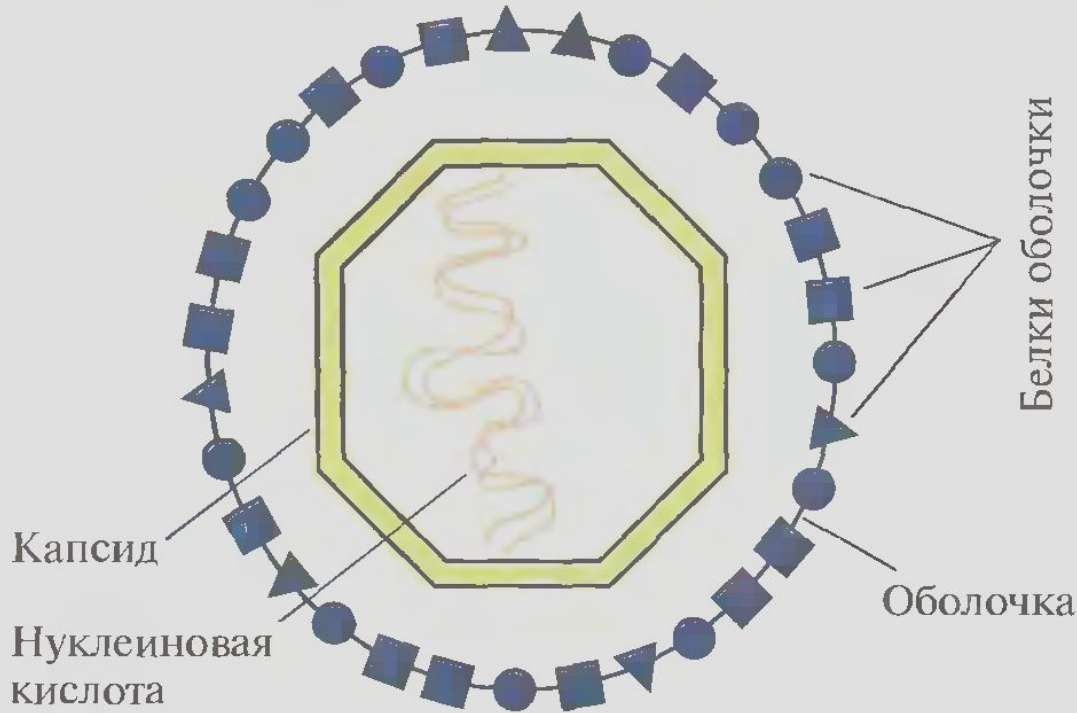
Лишены недостатков традиционных вакцин.

Для их разработки применяют методы генной инженерии.

Если антитела, вырабатываемые в ответ на введение традиционных вакцин, связываются с поверхностными белками патогенного м/о и этого бывает достаточно для запуска иммунного ответа, то должна ли **вакцина** содержать **целые** и **мёртвые** патогены?



ЭВРИКА !!!



Строение вируса млекопитающих

ДНК или РНК заключена в белковый капсид.
У некоторых вирусов капсид окружен гликопротеиновой или протеиновой оболочкой

Установлено:

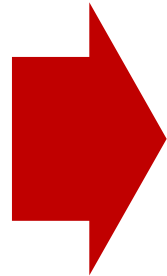
Для выработки в организме-хозяине антител в ответ на вирусную инфекцию достаточно очищенных *поверхностных* белков вируса (белков капсида или внешней оболочки)

1 Субъединичные вакцины

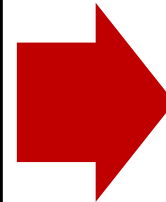
**Вакцины, содержащие
отдельные компоненты
патогенного м/о**

Принципиальная схема создания субъединичных вакцин

Идентифицируют АГ-активную компонент у патогенного м/о (как правило белковой природы)



Гены (или их сегменты), кодирующие АГ патогенных м/о экспрессируют в альтернативном хозяине, например *E.coli*



Получают АГ-белок в большом количестве, очищают и используют как

Преимущества и недостатки субъединичных вакцин

Преимущества:

- очищенный иммуногенный белок стабилен
- Безопасен (в сравнении с патогенным м/о – живым или аттенуированным)
- его химические свойства известны
- в нем отсутствуют дополнительные белки и нуклеиновые кислоты, которые могли бы вызвать нежелательные побочные эффекты в организме-хозяине (аллергические)

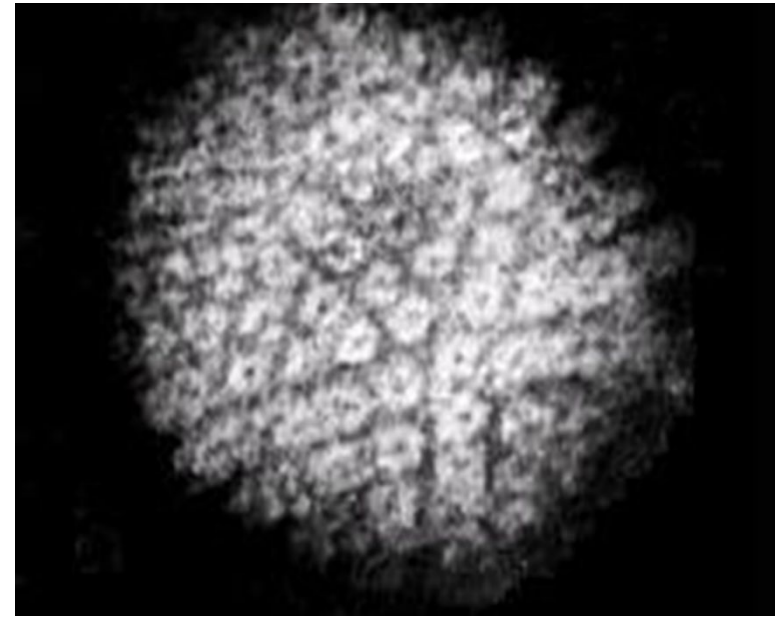
Недостатки:

- очистка специфического белка дорогостоящая
- *конформация* выделенного белка может отличаться от конформации *in situ* (в составе вирусного капсида), что может приводить к изменению его антигенных свойств → непостоянство активности

СУБЪЕДИНИЧНАЯ ПРОТИВОГЕРПЕТИЧЕСКАЯ ВАКЦИНА

HSV – *herpes simplex virus* -

вирус простого герпеса. Вызывает не только заболевания местного и общего характера (глаза, гениталии, энцефалит и т.д.). Он является онкогенным, поэтому вакцинация убитым или аттенуированным вирусом сопряжена с риском развития рака. ВОЗ запретила применение в медицине традиционной противогерпетической вакцины



Вирус герпеса простого (HSV)

Электронномикроскопическое фото

- Субъединичная противогерпетическая вакцина безопасна, т.к. **не** содержит вируса, а также *ДНК, кодирующей развитие раковых клеток.*

СОЗДАНИЕ И ПРОИЗВОДСТВО ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГЕРПЕСА ПРОСТОГО

Установлено, что выработку антител индуцирует **гликопротеин D** вирусной оболочки **HSV** (gD HSV).

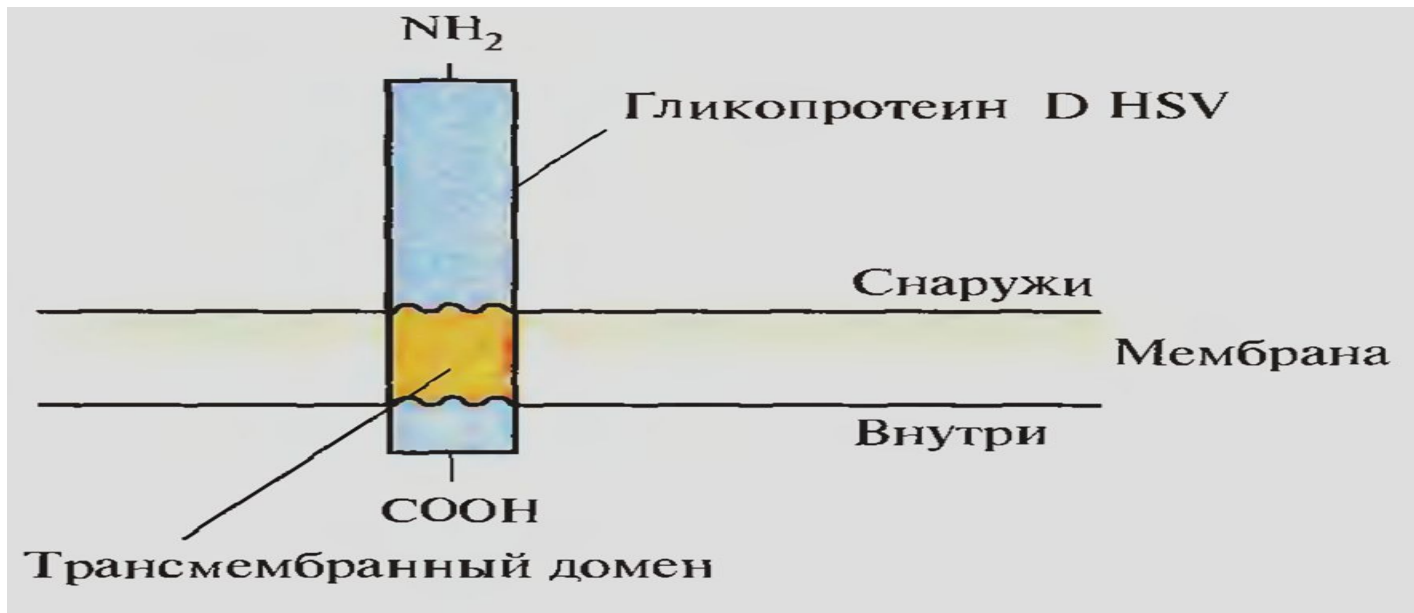
В ответ на введение **мышам gD HSV**, очищенного от других вирусных фрагментов, вырабатываются АТ, нейтрализующие **HSV**.

Идентификация генов, кодирующих АГ-активный компонент HSV

- ❖ Ген, кодирующий **gD HSV**, был изолирован и клонирован в клетках млекопитающих (мыши).

Установлено, что полноразмерный ген **gD HSV** кодирует белок, **связывающийся с мембраной клетки** продуцента посредством трансмембранного домена.

- ❖ Такой белок трудно отделить от клетки-продуцента и очистить.

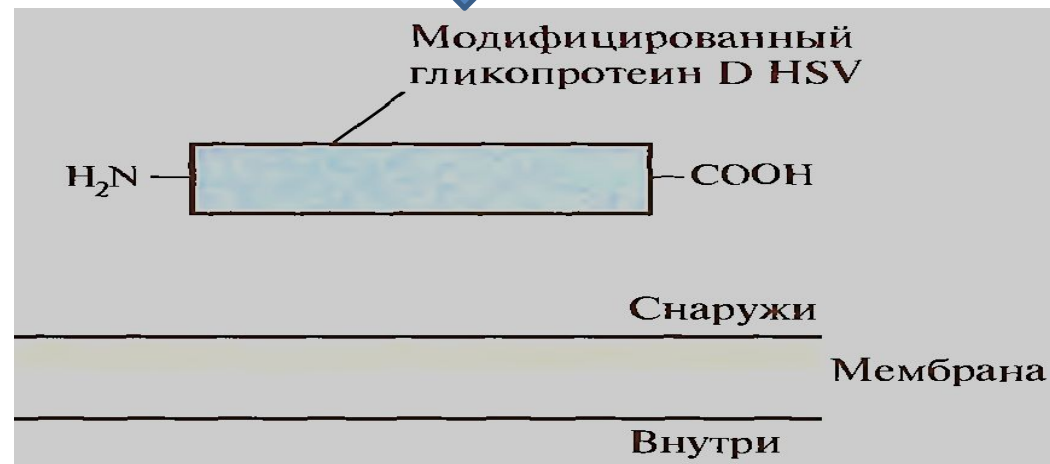
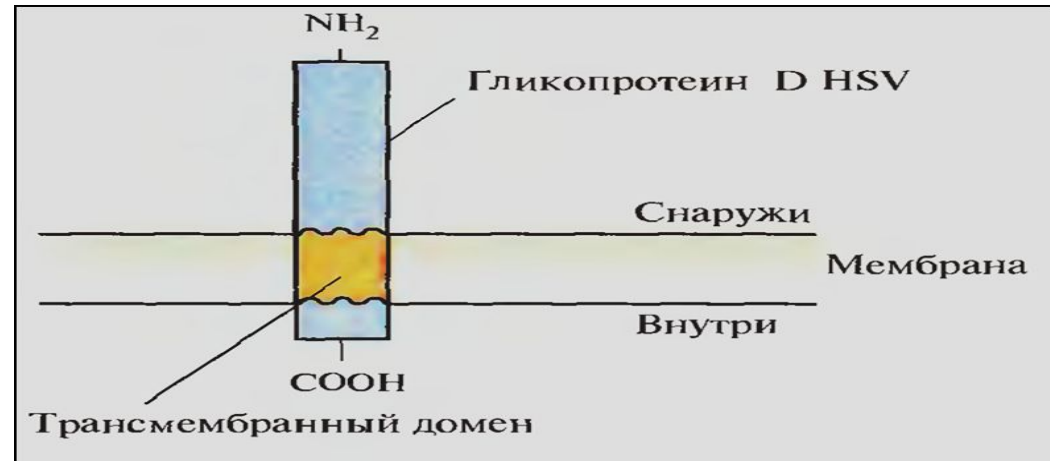


Стадия

Получение АГ-белка

Поэтому ген, кодирующий **gD HSV**, модифицировали, удалив ту его часть, которая кодирует трансмембранный домен.

- В результате получили белок **D HSV**, не содержащий трансмембранного домена и молекулы сахара.
- Полученный белок не связывался с мембраной клетки хозяина (продуцента) и легко растворялся в клетках и межклеточном пространстве.



Получаение АГ-белка

- Однако для выработки точно специфичных АТ важно было получить не просто протеин, а **гликопротеин**.
- Для этого модифицированным геном трансформировали яйцеклетки китайского хомячка - единственный подходящий продуцент.
- В отличие от клеток мыши и *E. Coli* (и пр. продуцентов) в яйцеклетках китайского хомячка происходит гликозилирование всех чужеродных белков (гликозилирование - ковалентное присоединение сахарного остатка к белковой молекуле).
- В яйцеклетках китайского хомячка модифицированный ген генерирует выработку белка, который воспринимается хозяйской клеткой как чужеродный белок и, следовательно, происходит его гликозилирование
- В результате образуется растворимый гликопротеин, который выбрасывается (экскретируется) клеткой во внешнюю среду, как чужеродное вещество.
- При введении очищенного модифицированного гликопротеина в организм человека вырабатываются АТ, эффективные в отношении HSV

Субъединичная противотуберкулезная вакцина

Актуальность обусловлена тем, что традиционная вакцина, созданная на основе ослабленного штамма *Mycobacterium bovis* - ***Bacillus Calmette-Guerin*** – вакцина BCG, используемая в настоящее время, вызывает:

- заболевание у иммуноослабленных пациентов
- BCG-вакцинированные лица дают положительный ответ на обычную процедуру выявления туберкулобактерий (Манту), что не позволяет отличить их от больных туберкулезом.

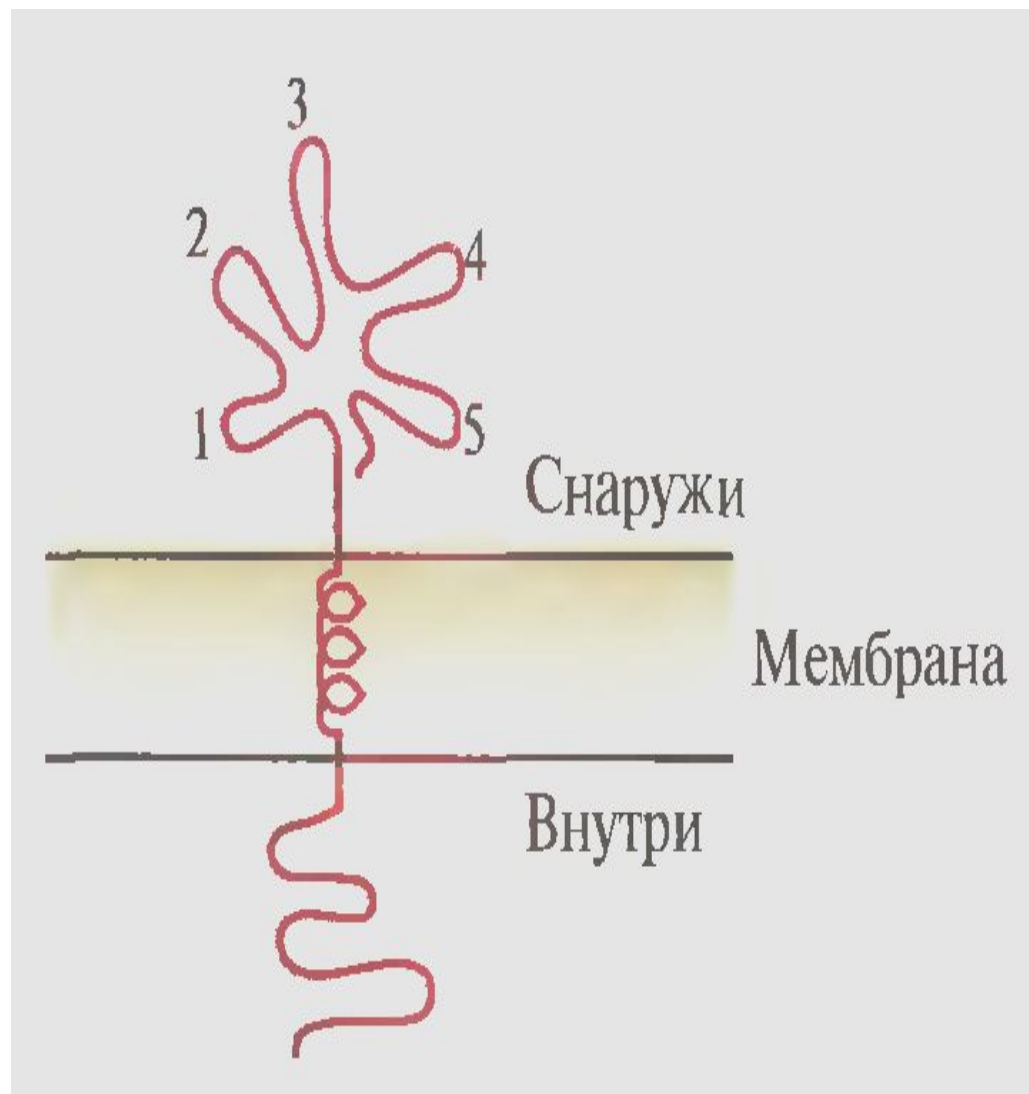
Субъединичные ПЕПТИДНЫЕ ВАКЦИНЫ

- А может ли **фрагмент** (небольшой участок) белковой молекулы (домен) служить субъединичной вакциной и индуцировать выработку АТ?



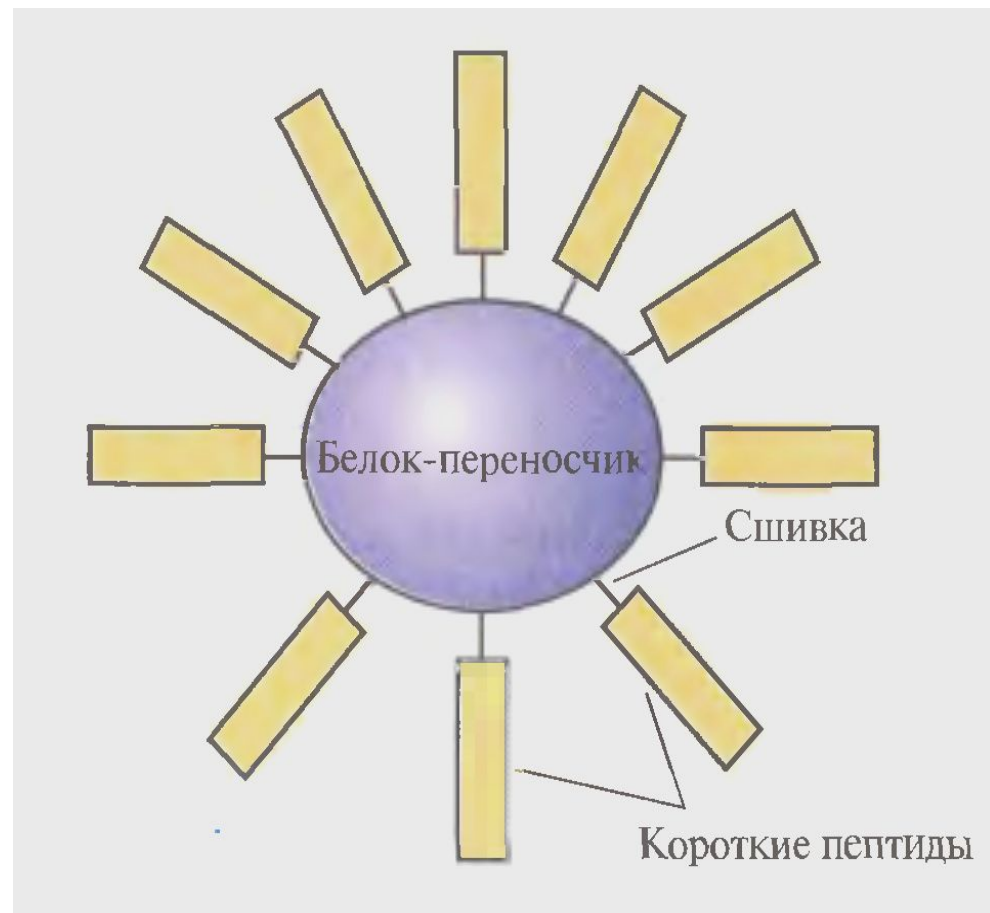
Субъединичные ПЕПТИДНЫЕ ВАКЦИНЫ

- Интуитивно - да:
те участки, которые
находятся на
поверхности вируса и
доступны для АТ
обладают
иммуногенными
свойствами, а
внутренние участки
несущественны, если
только они не влияют
на конформацию
иммуногенного домена.
- Если так, то короткие
пептиды, имитирующие
АГ, можно
использовать для
создания вакцин.



Субъединичные ПЕПТИДНЫЕ ВАКЦИНЫ

- Химическими методами синтезировали белковые домены, идентичные **поверхностным** белкам патогенного для морских свинок вируса, и сшили их по-отдельности с инертным белком-переносчиком (для предотвращения их разрушения)
- Ввели морским свинкам.
- Наблюдался ярко-выраженный иммунный ответ. Но доза такой вакцины выше, чем в случае убитой вакцины.



② Векторные вакцины

Живые вакцины, полученные путем клонирования генов, кодирующих АГ патогенного микроорганизма, и встраивания их в геном непатогенного носителя (обычно вируса)

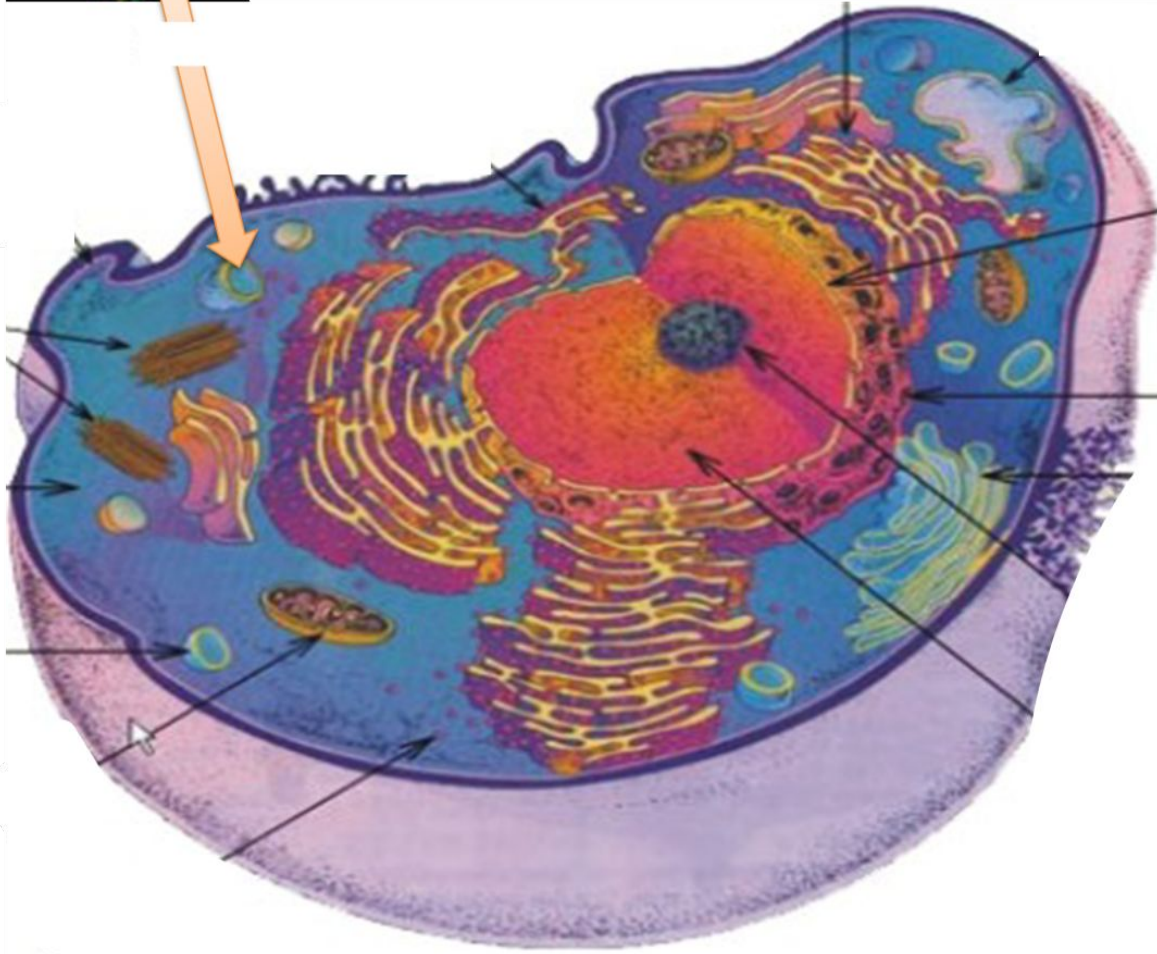
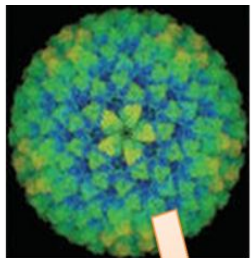
В основе - идея генной иммунизации

- В макроорганизме можно индуцировать иммунный ответ без введения антигена (АГ)
- Основан на включении в клетки организма ГЕНА, кодирующего белок АГ.

В одном из экспериментов ДНК, кодирующую белок АГ, соединили с плазмидой кишечной палочки рBR322. Плазмиду ввели В/М в организм мышей. Более чем в 75 % случаев ген включался в клетки мыши и начинался синтез белка АГ. Белок АГ индуцировал синтез АТ.

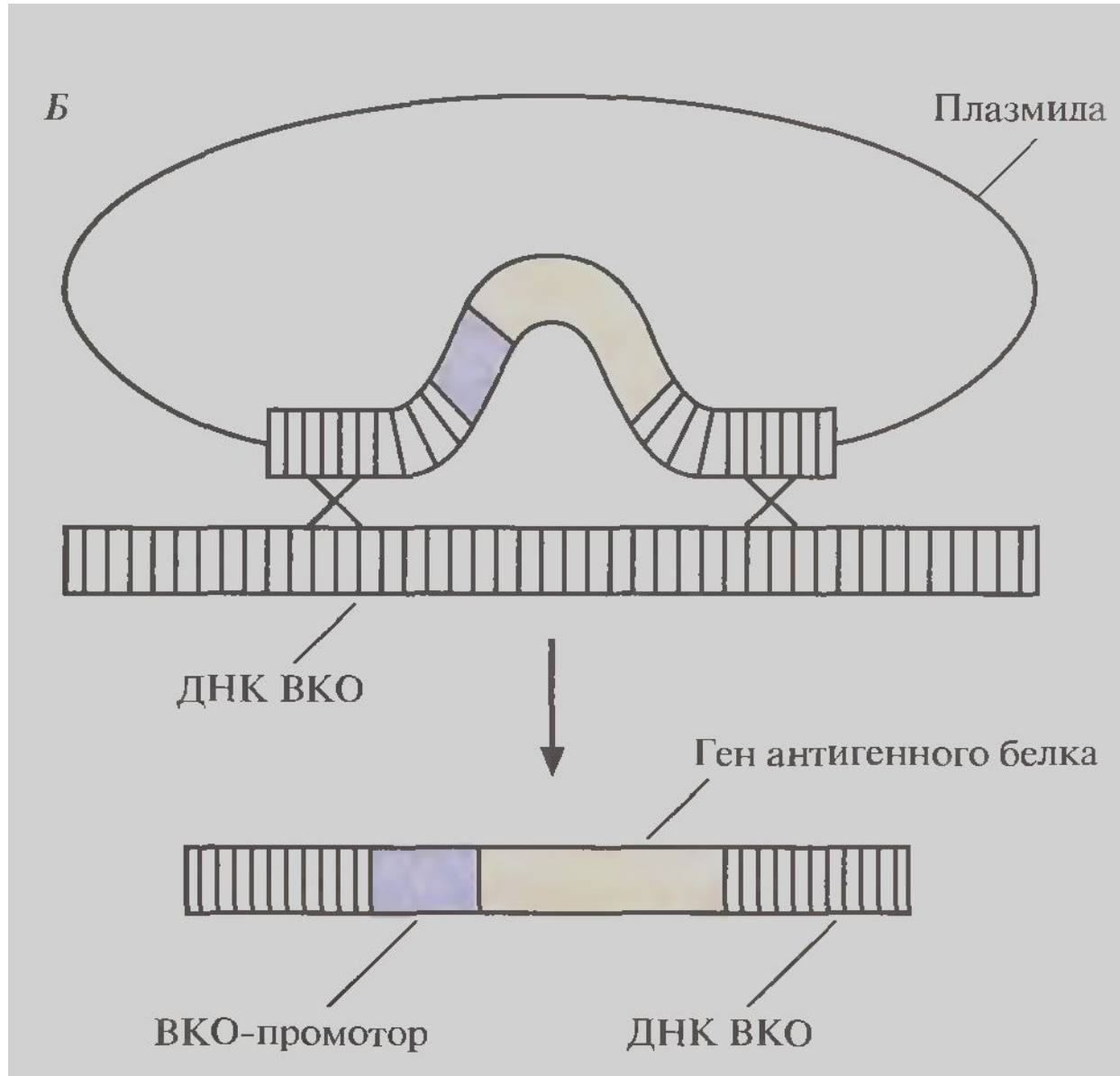
- Этот подход позволяет избежать дорогостоящего процесса очистки АГ

В качестве вектора для доставки ГТД, кодирующего белок АГ, используют ВКО – вирус коровьей оспы



- Геном ВКО изучен и воспроизведен
- Проникая в клетки макроорганизма, ВКО реплицирует свою ДНК в *цитоплазме* инфицированной клетки, а не в ядре, т. к. у вируса имеются свои гены ДНК-полимеразы и гены ферментов, иницирующих синтез мРНК.
- Вновь синтезированная ДНК ВКО обрастает белковой оболочкой, образуя новые

Встраивание в ДНК ВКО гена, кодирующего АГ



- Если в геном ВКО встроить чужеродный ген, кодирующий АГ патогенного микроорганизма, то он будет экспрессироваться **независимо от регуляторных и ферментных систем клетки-хозяина (макроорганизма)**.
- Можно встроить ДНК, кодирующую несколько АГ.
- Таким образом получают векторные **ПОЛИ**вакцины на основе ВКО, которые позволяют провести

иммунизацию сразу

Векторные вакцины на основе ВКО

- В геном ВКО уже удалось встроить и экспрессировать в культуре животных клеток несколько генов антигенных белков: АГ-белка вируса бешенства, АГ гепатита В, белков вируса гриппа.
- ВКО остается жизнеспособным в течение многих лет после лиофилизации (испарения воды через замораживание) и не обладает онкогенными свойствами. Поэтому широко используется для создания векторных вакцин.
- С его помощью в организм-хозяина (человека) доставляют и экспрессируют гены, кодирующие АГ-белки, которые в свою очередь индуцируют выработку АТ.

③ Генетически аттенуированные вакцины

**Вакцины, содержащие цельные
живые микроорганизмы, но с
удаленными генами,
кодирующими домены
вирулентности**

Создание генетически аттенуированных вакцин

- Возможно, если участки ДНК, кодирующие АГ, и участки ДНК, кодирующие факторы патогенности (эндотоксины, ферменты деструкции и др), разделены и расположены в различных местах генома возбудителя заболевания.
- Патогенный м/о подвергают генетической модификации:
 - делетируют (**delet** - удалять) гены, ответственные за патогенность (вирулентность) м/о;
 - но (**ВАЖНО!!!**) сохраняют АГ-кодирующие домены ДНК

Создание генетически аттенуированных вакцин

Основные требования:

- отсутствие в материале вирулентных м/о;
- являясь живыми, не должны ревертировать и становиться патогенными.

Для предупреждения ревертирования необходимо:

- делетировать, как минимум, 2 области ДНК:
кодирующую вирулентность и какую-либо жизненно важную функцию;
- вероятность их одновременного восстановления очень мала.

Генетически аттенуированная противосальмонеллезная вакцина

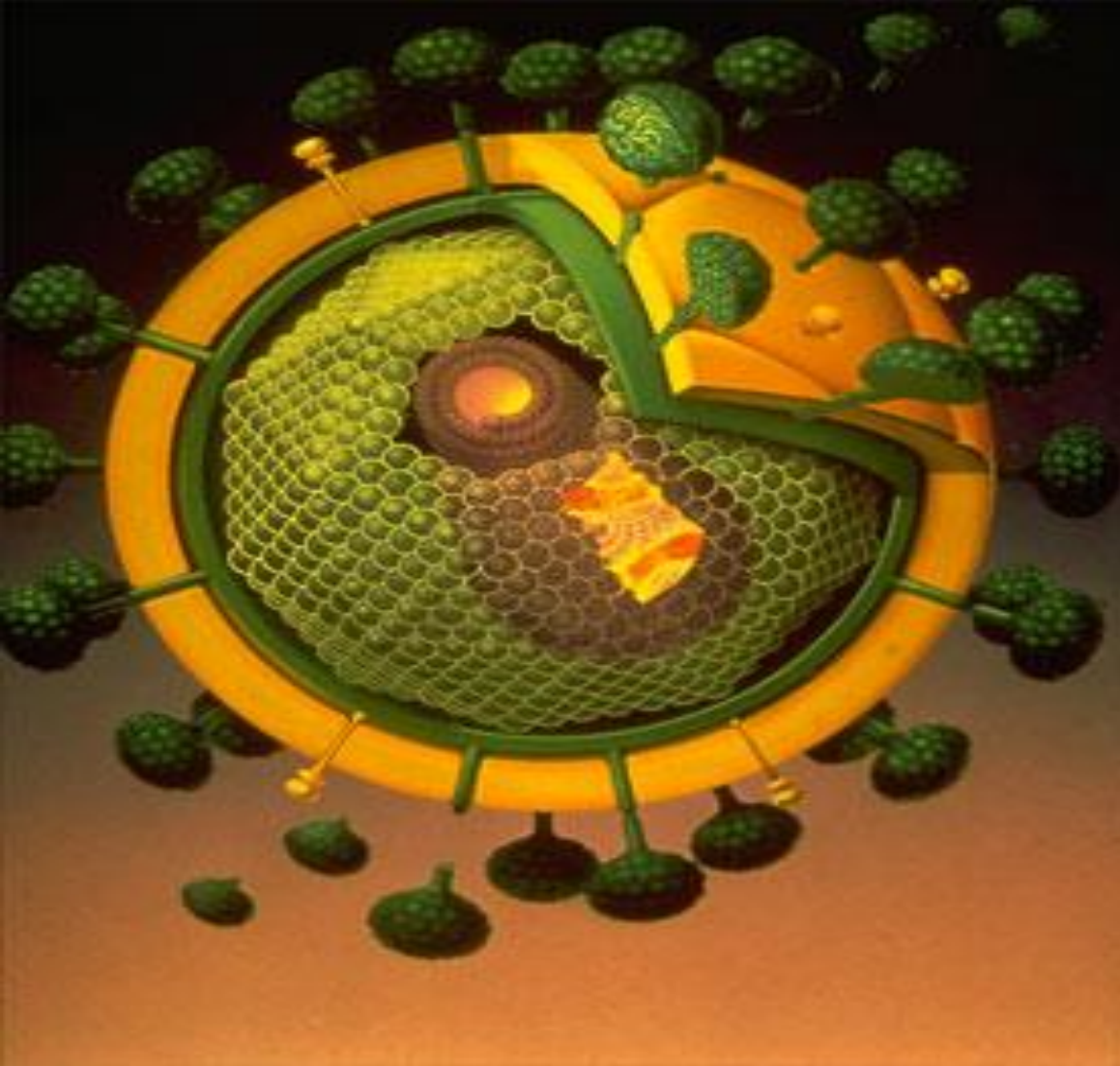
- Разные штаммы *Salmonella* вызывают острые кишечные инфекции, брюшной тиф, пищевую токсикоинфекцию.
- Аттенуированные штаммы сальмонеллы получают путем делеции отдельных доменов в генах **ARO**, кодирующих ферменты биосинтеза ароматических соединений и генах **PUR**, кодирующих ферменты некоторых стадий метаболизма пуринов.
 - Такие штаммы вызывают легкую форму инфекции и обладают в 1 000 000 раз меньшей вирулентностью.

Генетически аттенуированная живая вакцина вибриона холеры

- Актуально, т.к. вакцина на основе холерных вибрионов, убитых фенолом, обеспечивает частичную защиту на ограниченное время – не более 3-6 месяцев

ЛЕКАРСТВА ПРОТИВ СПИДА

Вакцина ВИЧ

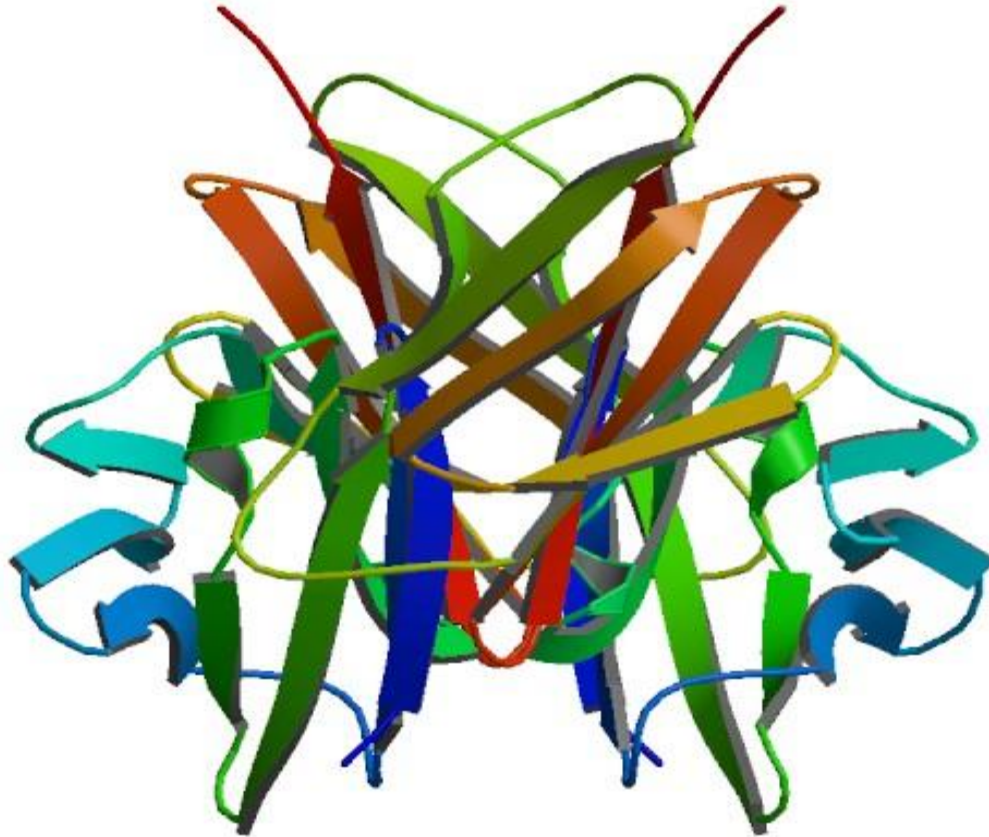


Важнейшей особенностью ретровирусов является наличие фермента обратной транскриптазы.

ВИЧ – РНК содержащий ретровирус. Малоустойчив во внешней среде и не способен к репродукции вне организма человека! Легко погибает под воздействием 5% раствора перекиси водорода, раствора хлорамина, эфира, ацетона, 70 % спирта. При температуре 56°C вирус погибает в течение 30 минут, при кипячении - мгновенно. Вместе с тем, вирус сохраняет жизнеспособность в высушенном состоянии 4-6 суток при $+22^{\circ}\text{C}$, в растворе героина около 3-х недель.

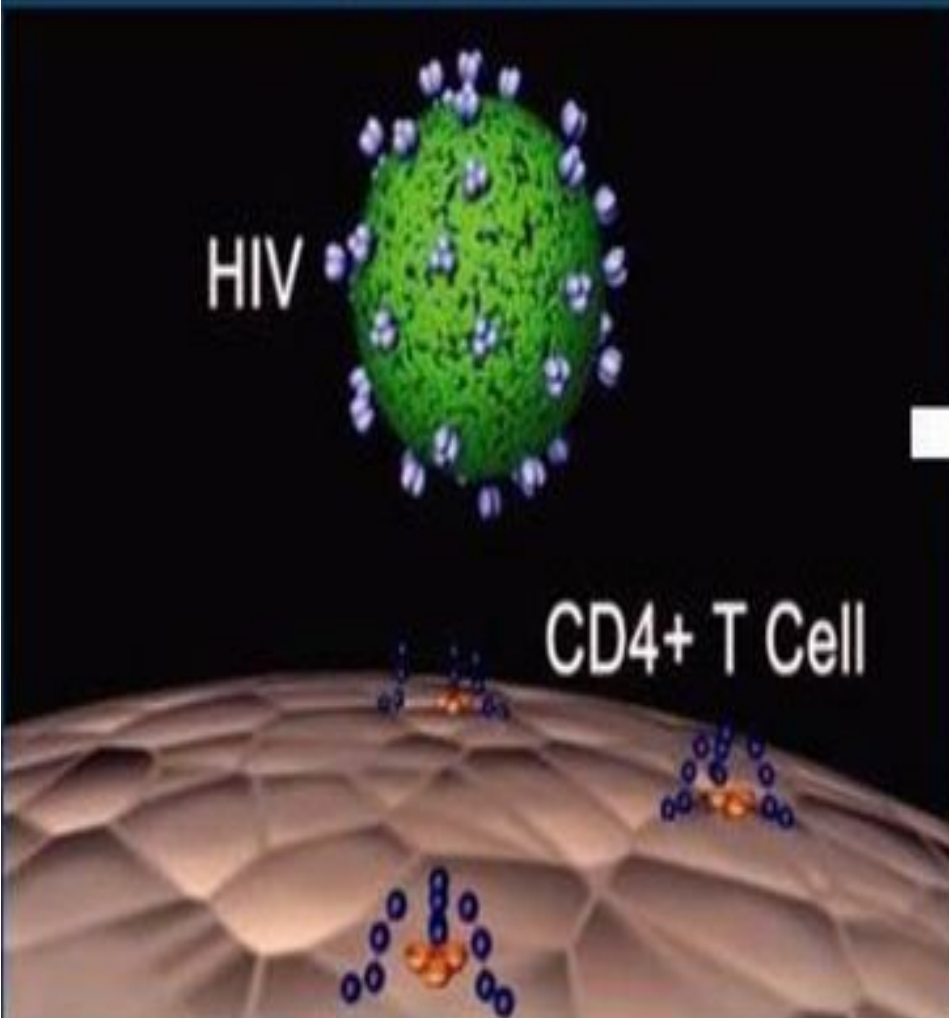
Вирус малочувствителен к ионизирующему и УФ излучению, устойчив к

***ВИЧ* поражает клетки человеческого организма,
имеющие на поверхности рецептор CD4**

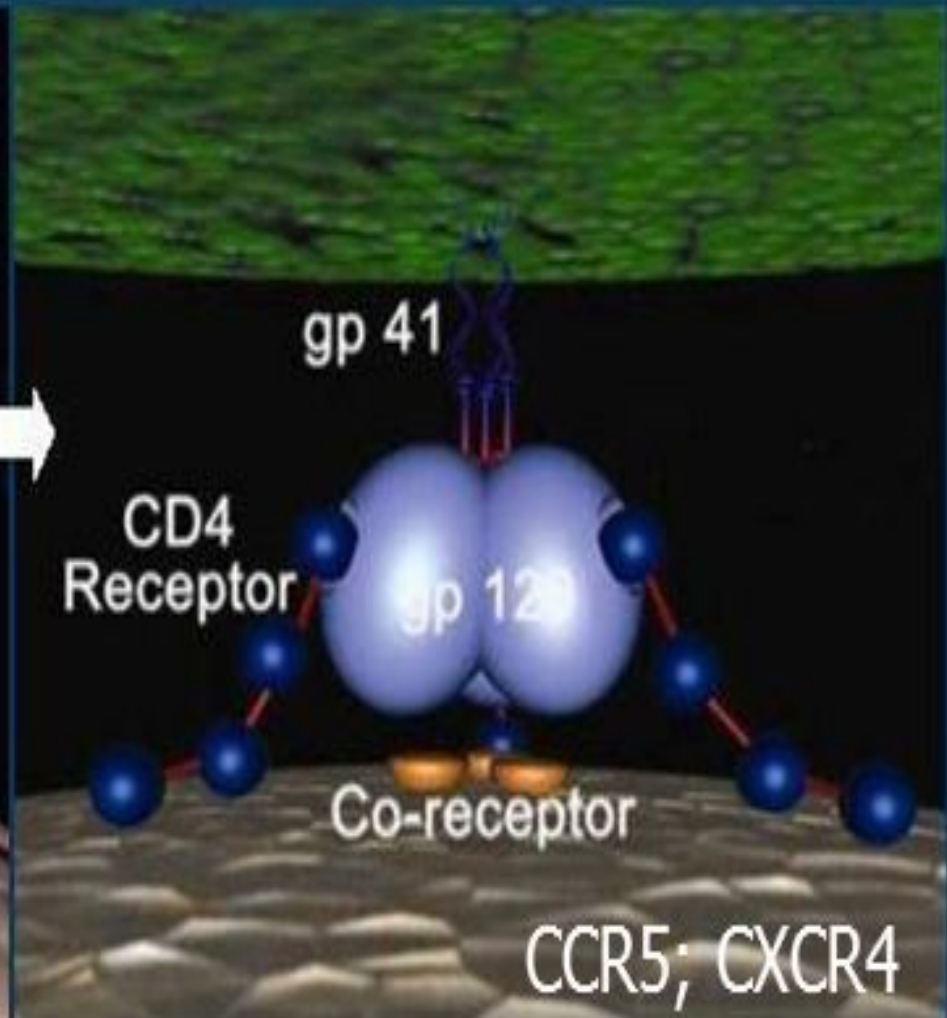


***CD4* — трансмембранный гликопротеин.
У человека закодирован в гене *CD4*.**

Approach



Attachment



Клетки, несущие CD-4 рецепторы: Т-лимфоциты-хелперы, макрофаги, сперматозоиды, дендритные, кл. Лангерганса и др.

Рецептор CD-4 является маркёром Т-хелперов (клеток иммунной системы)

Проблемы в создании вакцины анти-ВИЧ:

- репликация генома ВИЧ в инфицированных клетках человека характеризуется высокой частотой ошибок, → частые мутации;
- множество генетически различающихся субтипов → различия АГ-структуры;
- способен существовать как ПРОВИРУС, → длительный латентный период, защищен от иммунной системы пациента;
- отсутствует модель заболевания на лабораторных животных

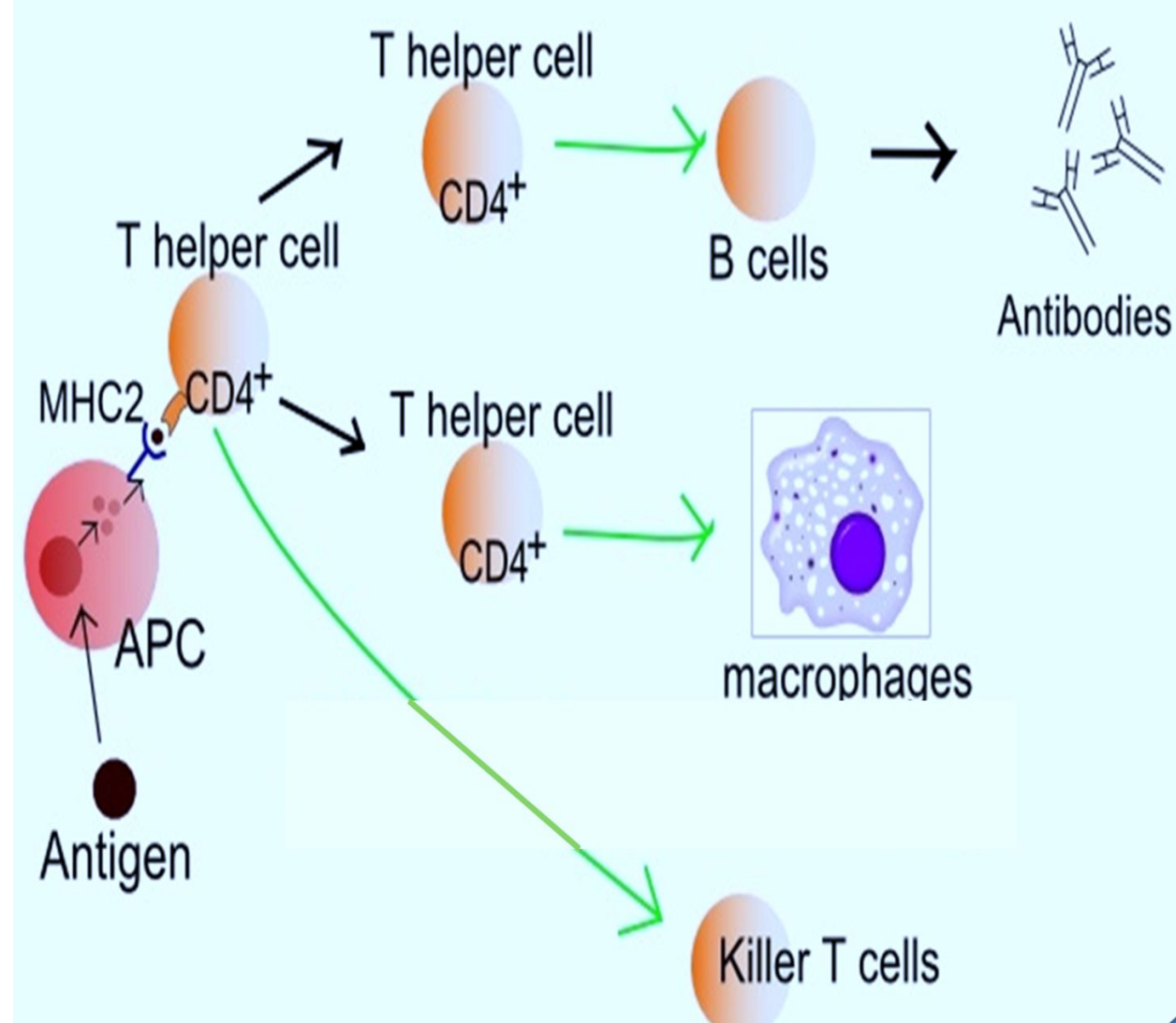
Параллельно с созданием вакцины идет поиск средств,
позволяющих замедлить патологический процесс

Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ):
зальцитабин, зидовудин и др.

Ингибиторы вирусной протеазы (разрезает
синтезируемые полипротеины Gag и Gag-Pol,
благодаря чему образуются зрелые белки ВИЧ. Без
протеазы вирионы ВИЧ остаются
неинфекционными), → утрата способности к
репликации и заражению новых клеток: **индинавир,
дарунавир** и др.

Ингибиторы вирусной интегразы (обеспечивает
встраивание вирусной ДНК в ДНК инфицированной клетки) -
ралтегравир (Raltegravir) и **элвитегравир (Elvitegravir)**

Ингибиторы слияния ВИЧ с лимфоцитами:
фузона



В норме Т_Н-клетки опсонизируют продукты разрушения АГ и презентируют фрагменты антигена другим клеткам иммунной системы при прямом контакте и гуморально (выделяя ЦИТОКИНЫ)

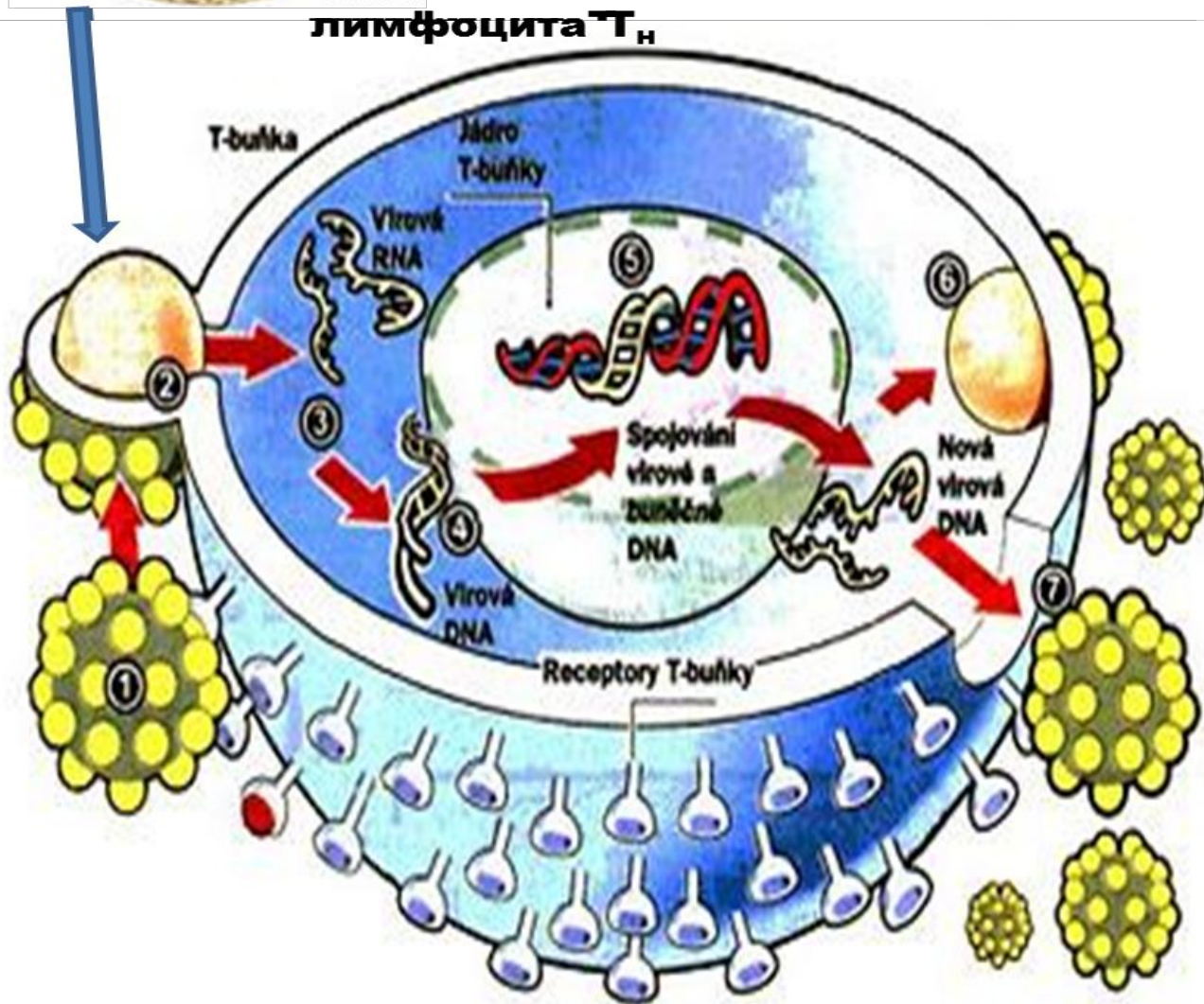
активизируют их к участию в иммунном ответе

Т - киллеры лизируют поврежд. антигеном клетки собств. организма;
 β - лимфоциты после природной генетич. рекомбинации → АТ.

ВИЧ



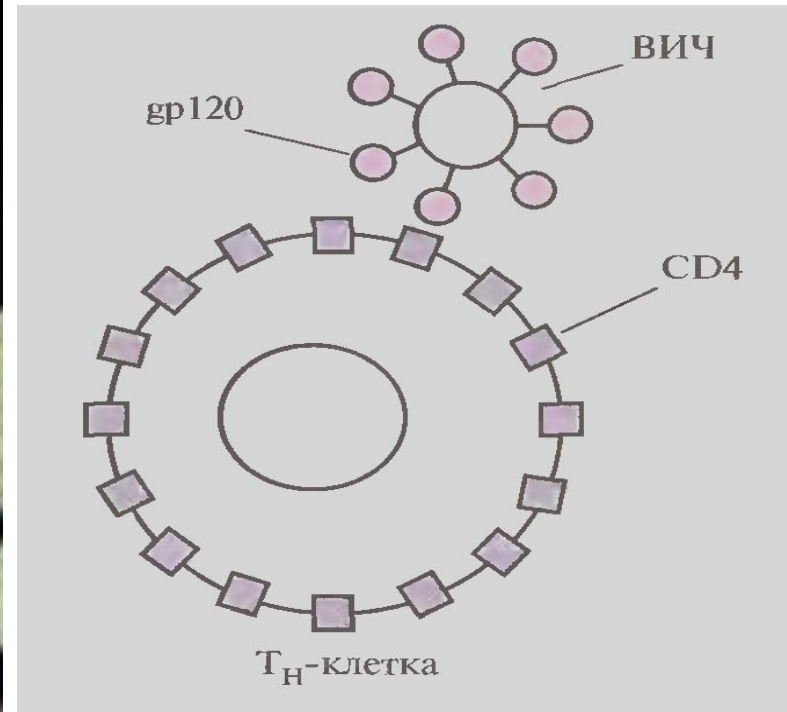
Схема атаки
лимфоцита T_H



В норме главной функцией T_H -кл. является усиление адаптивного ИММУННОГО ответа.

Однако при ВИЧ-инфекции механизм перестает функционировать.

① этап ВИЧ-инфицирования

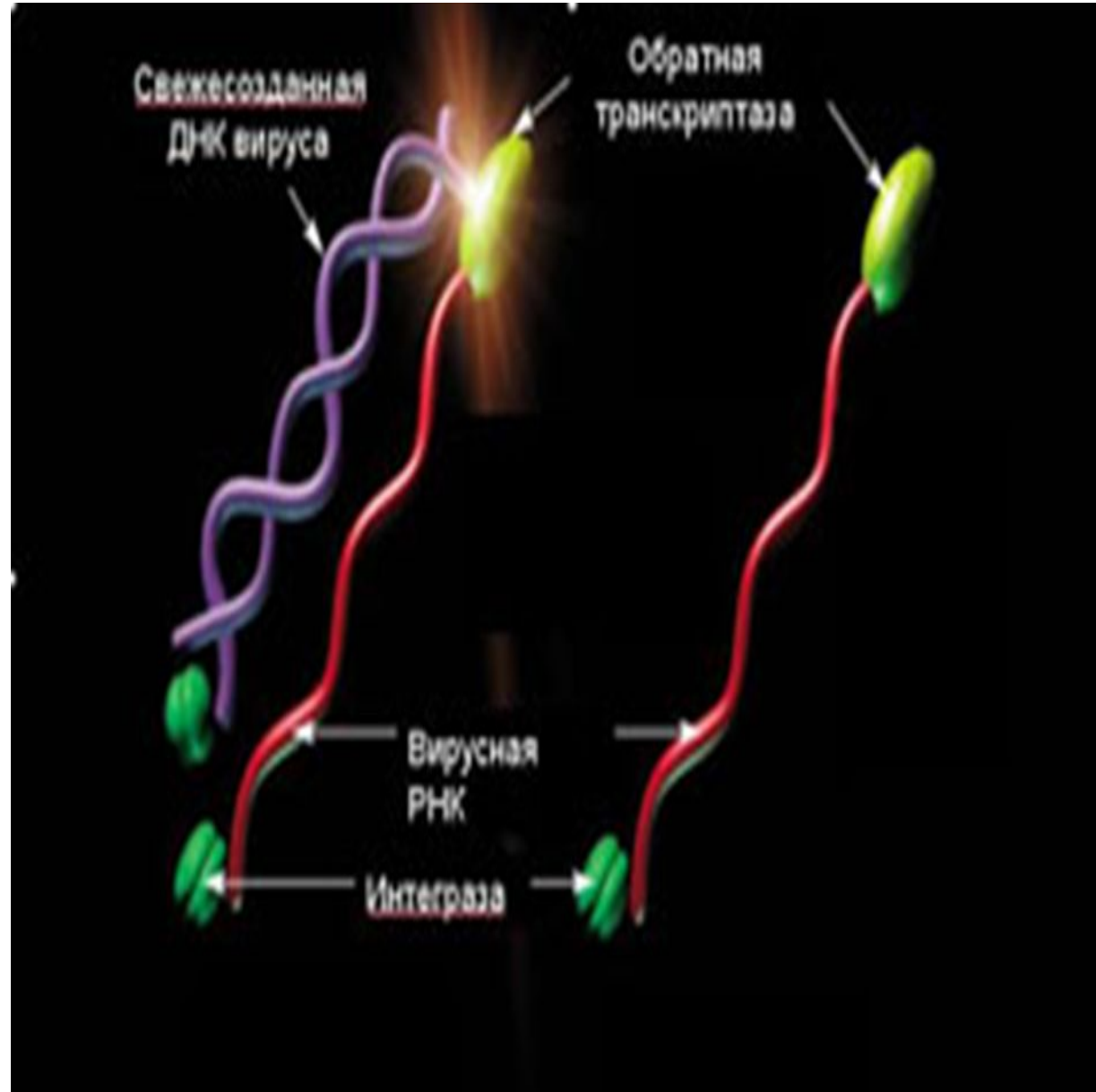


Взаимодействи
е **gp120=м.м** ВИЧ
и рецептора **CD4**
клеток Т_h

2 этап ВИЧ-инфицирования

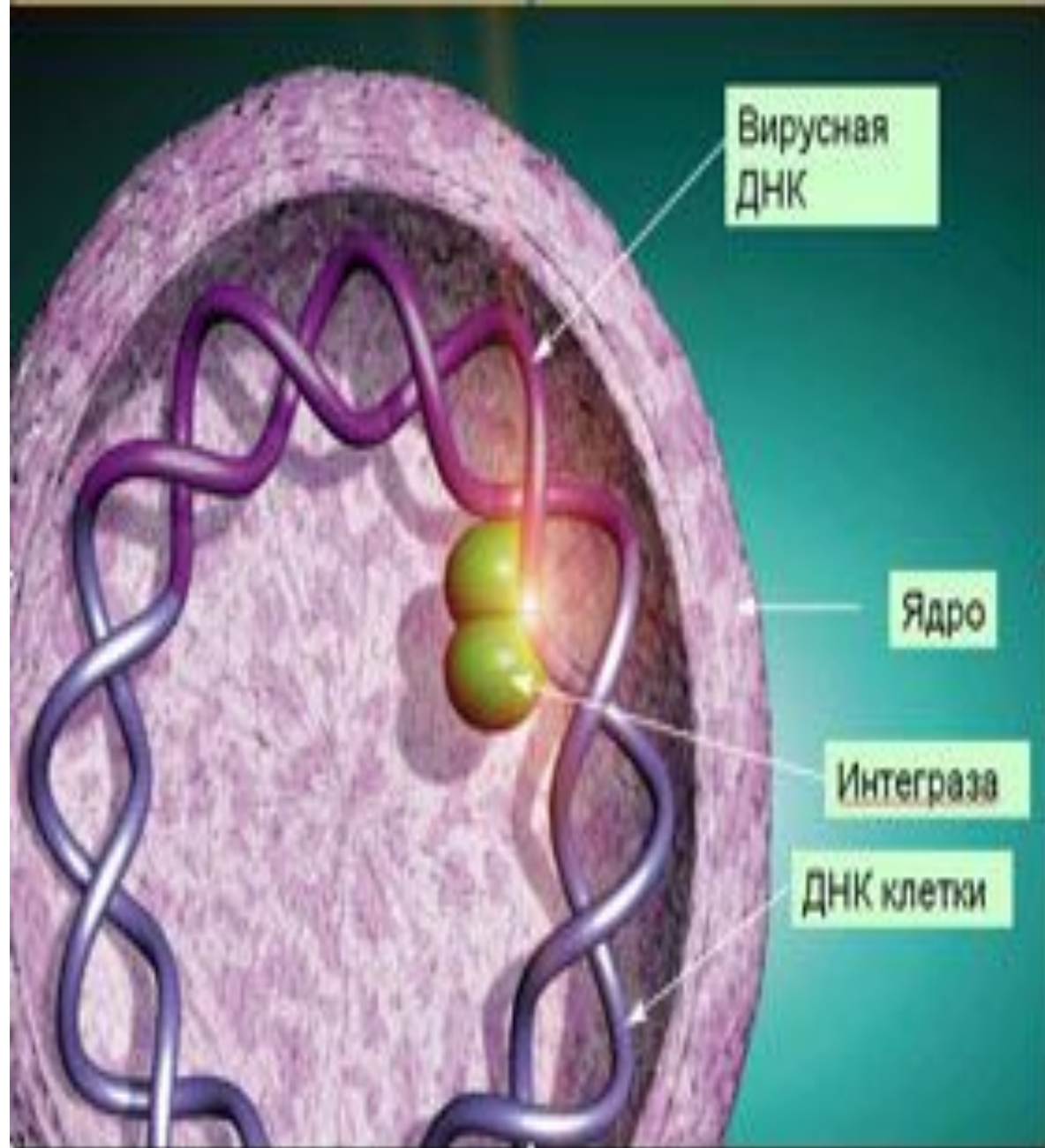
- ВИЧ → в клетку, становится защищенным от ИС организма

На матрице вирусной РНК с помощью фермента обратной транскриптазы синтезируется одноцепочечная ДНК-копия, которая затем дотраивается в двухцепочечную



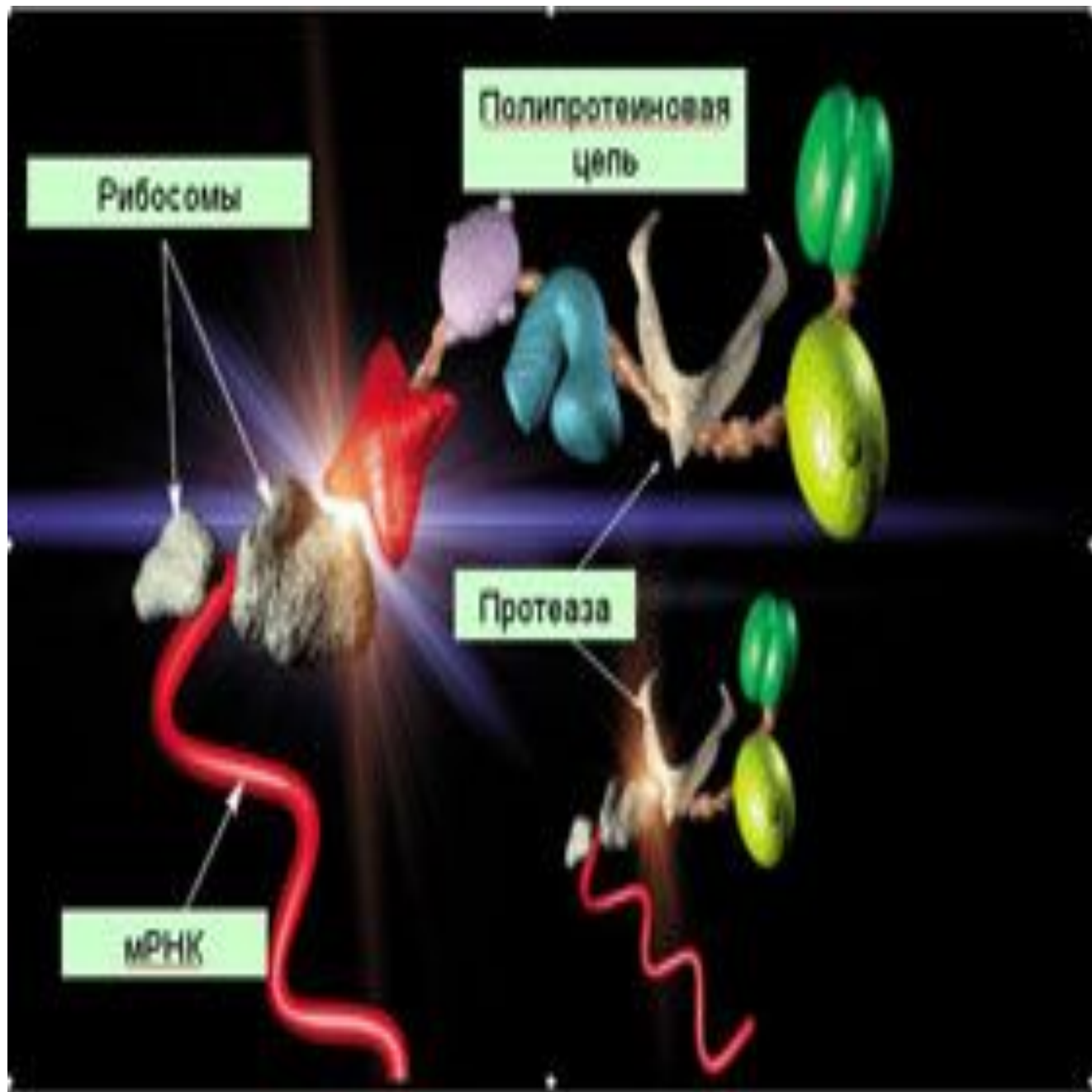
③ этап.
ДНК-копия → в ядро
клетки (действующий
фермент на данном
этапе – интеграза), где
образует кольцевую
структуру и
встраивается в ДНК
клетки.

④ этап.
ДНК-копия может
сохраняться в
клетке в течение
нескольких лет. Ее
присутствие
обнаруживается в
крови с помощью
специфических



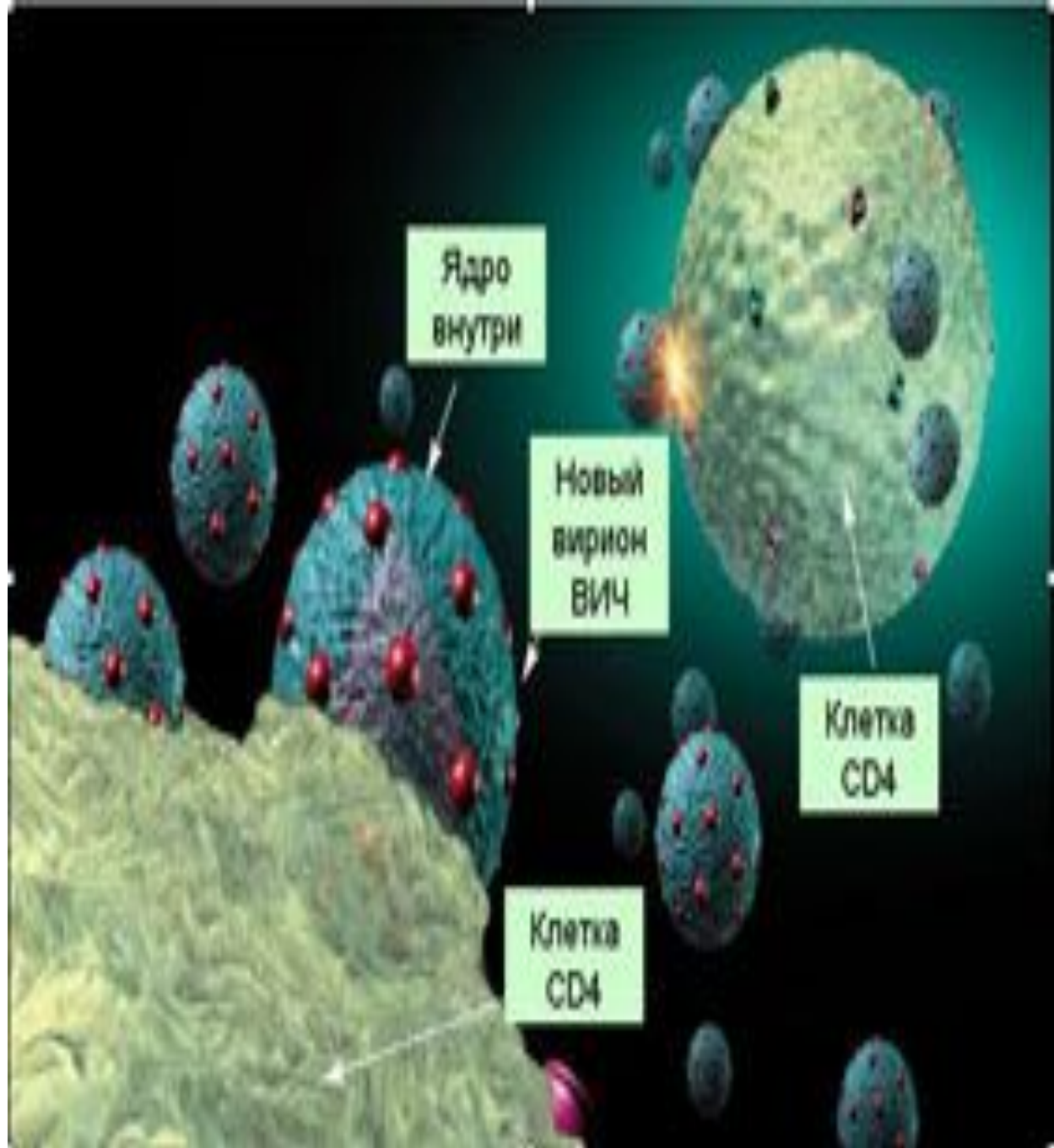
5 этап.
Вторичная
инфекция
организма
стимулирует
транскрипцию
ДНК-копии -
синтез вирусной
матричной РНК.

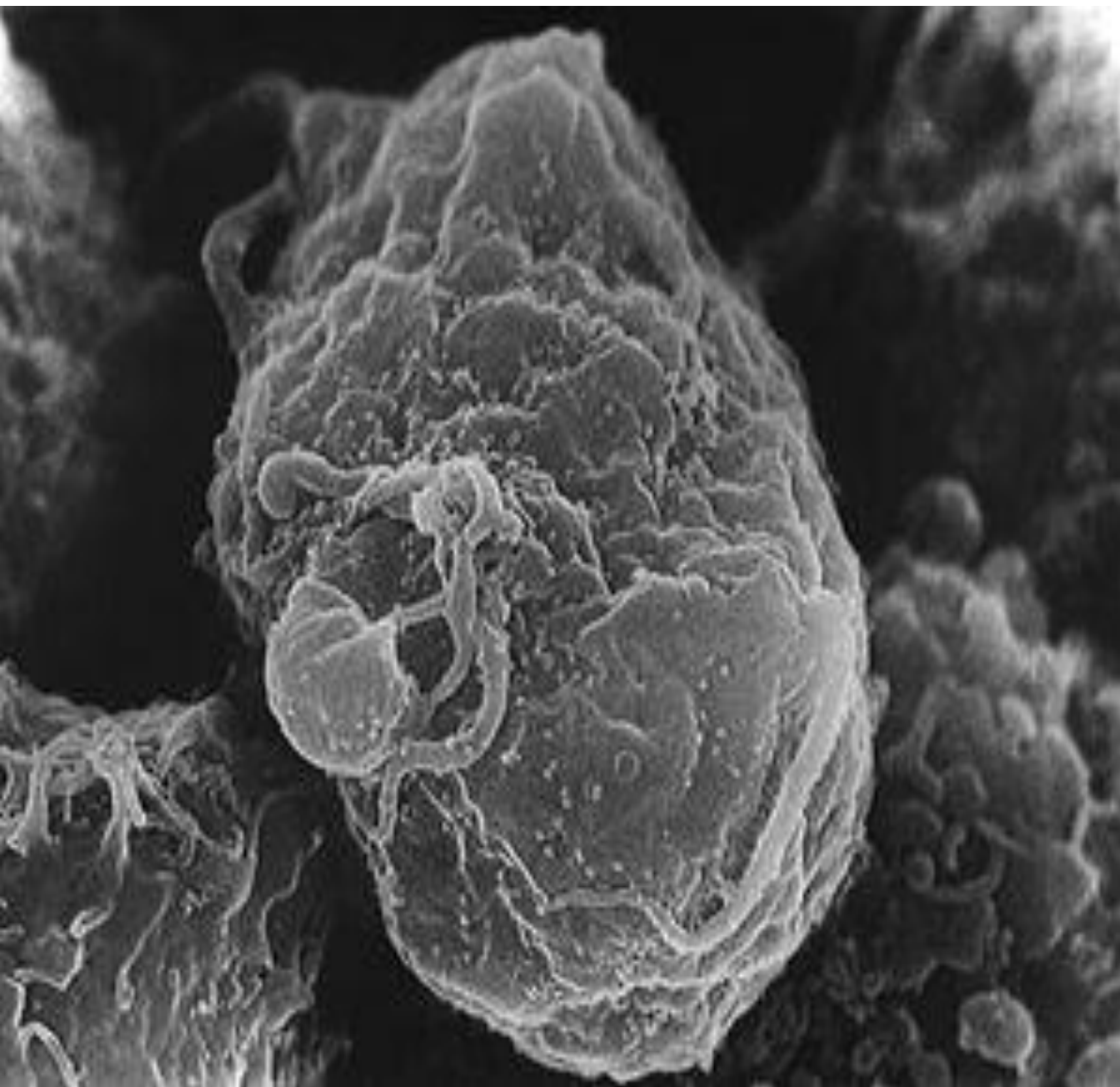
6 этап. На
вирусной мРНК
клеточные
рибосомы
осуществляют
синтез вирусных
белков.



7 этап.

Из вновь синтезированных вирусных белков и вирусной РНК происходит сборка новых вирусных частиц; выход их из клетки заканчивается гибелью клетки.





Изображение, сделанное растровым электронным микроскопом. В центре кадра находится заражённый Т-лимфоцит. Многочисленные светлые круглые выпуклости на его поверхности — места сборки и отпочковывания вирионов ВИЧ

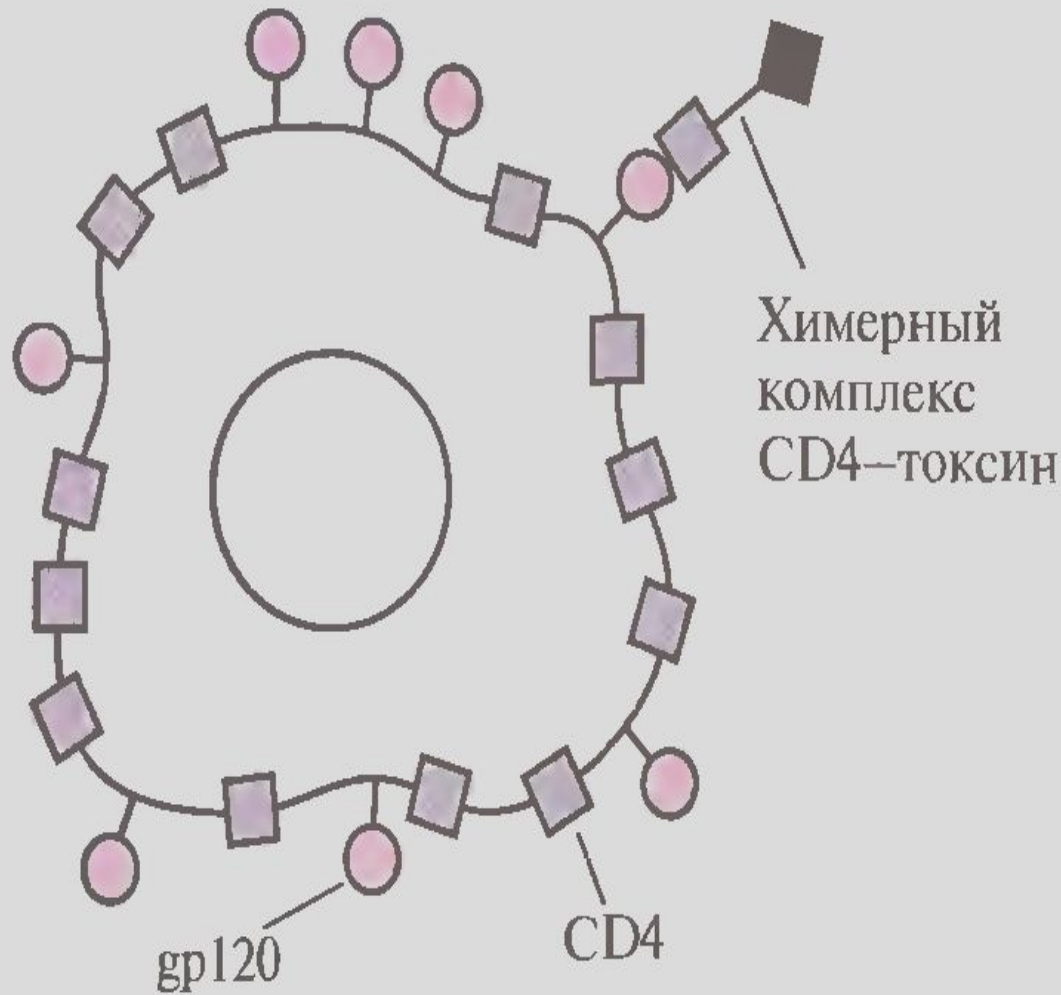
Возможные пути защиты Т_Н-клеток от ВИЧ

1. In vitro поражение Т_Н-клеток вирусом блокируется антителами к CD4;
2. процесс замедляется также при избытке белка CD4

но ВИЧ не погибает ни в 1, ни во 2 случае;

3. Создание химерного белка, состоящего из фрагмента молекулы CD4 и Fc-фрагмента АТ. Такой белок синтезирован, называется **CD4 - иммуноадгезином**

Возможные пути защиты Тн-клеток от ВИЧ



Т_н –хеллер, атакуемый
ВИЧ.

Схематическое

CD4-иммуноадгезин

Фрагмент CD4

связывает gp120 →
блокирует ВИЧ и
инфицированные Т_н
клетки.

Fc-белок антитела:

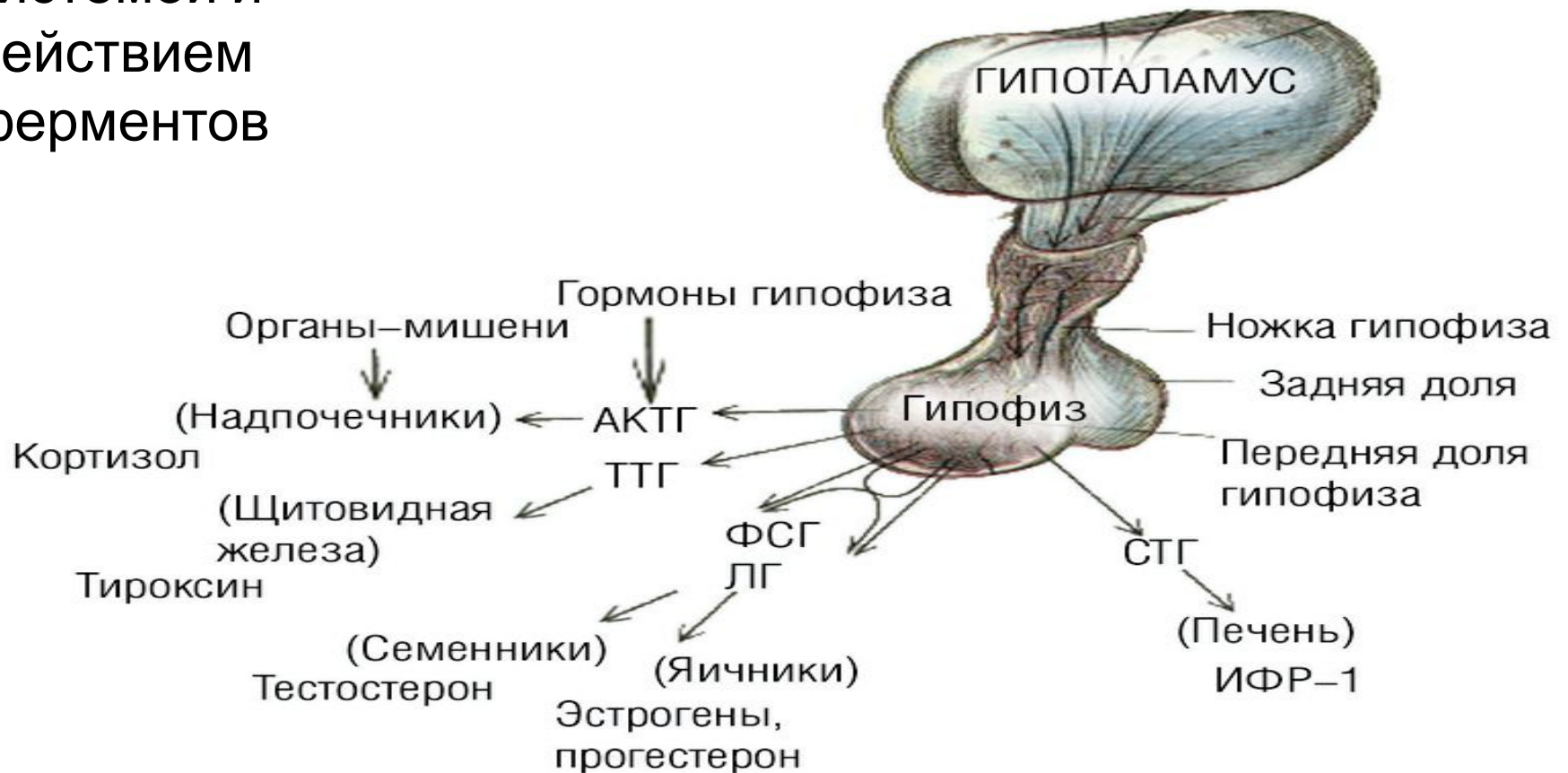
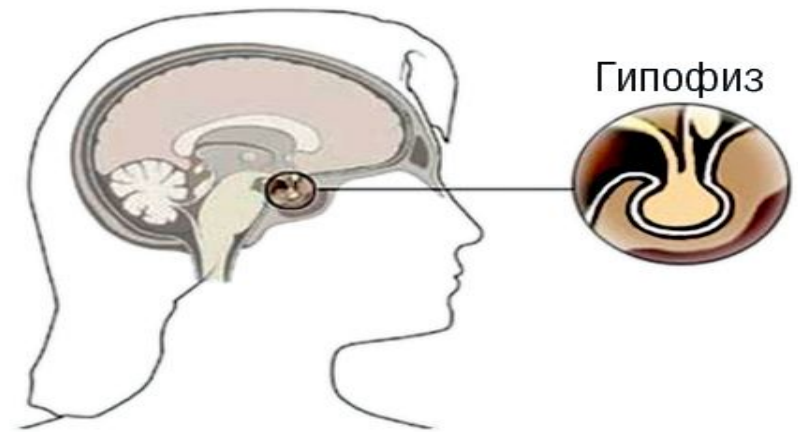
- обеспечивает
связывание с кл.,
несущими Fc-рецептор
к АТ и → реакции ИС,
(уничтожение ВИЧ и
пораженной клетки);

- замедляет
разрушение **CD4** в
плазме крови

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ ГОРМОНАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Гормоны — сигнальные химические вещества, вырабатываемые клетками тела, поступающие в кровь и оказывающие регулирующее влияние на обмен веществ и физиологические функции клеток в других частях тела»

В регуляции
процессов обмена
веществ гормоны
занимают
промежуточное звено
между нервной
системой и
действием
ферментов



Химическая природа и пути действия гормонов

- **Простые и сложные белки, пептиды - гормоны гипофиза, панкреаса и др.**
 - **Стероидные гормоны - коры надпочечников, половые стероиды**
 - **Производные аминокислот - адреналин, гормоны щитовидной железы, эпифиза**
- **через мембранные рецепторы и вторичные посредники**
 - **проникая в клетку, через рецепторы цитоплазмы и ядра**
 - **через мембранные рецепторы и вторичные посредники**

ЛИПОФИЛЬНЫЕ ГОРМОНЫ

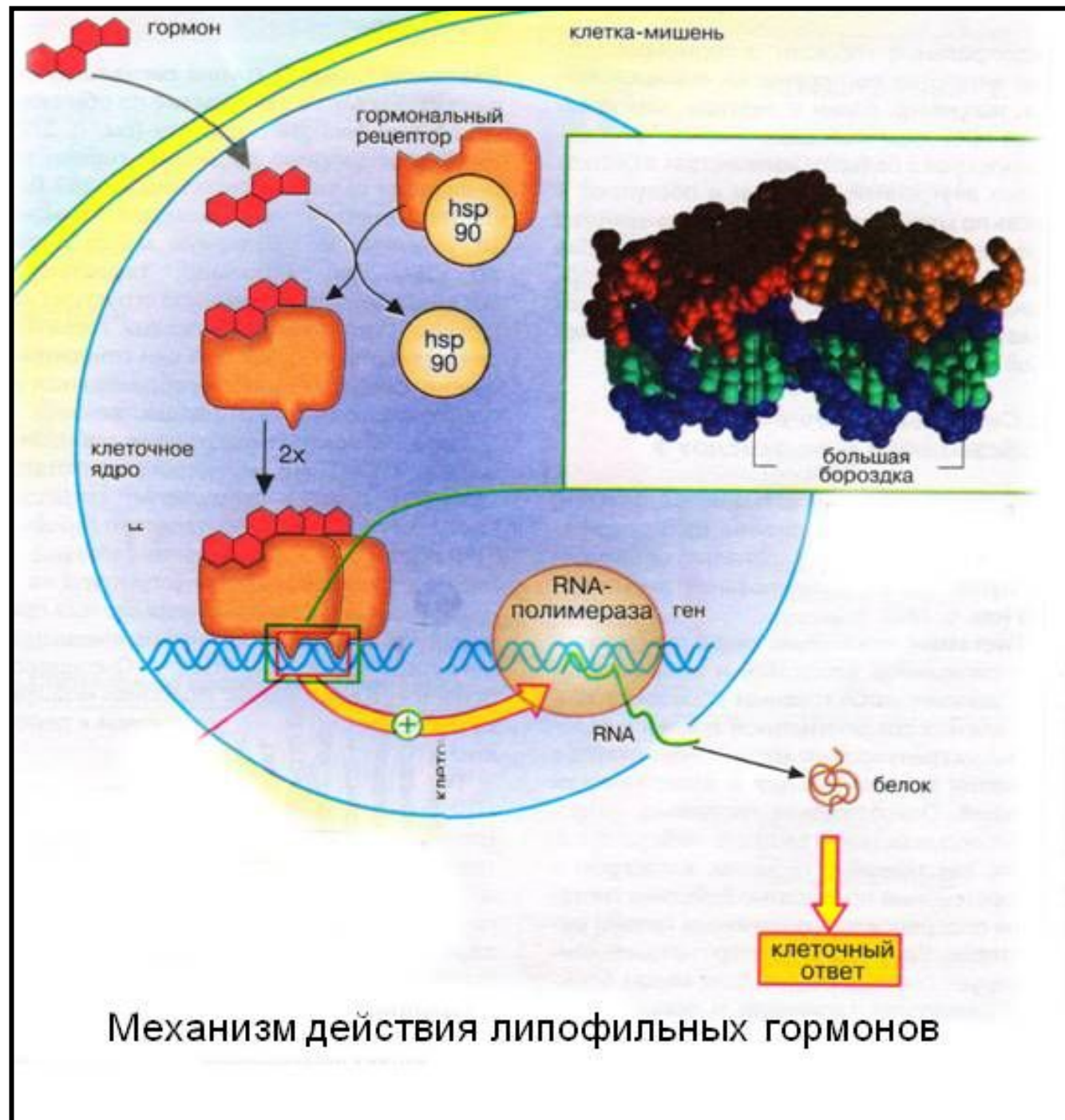
стероидного строения,
(половые, глюко-
и минералокортикоиды),
а также гормоны
щитовидной железы

Проникают через
мембрану КЛЕТКИ.

Связываются с
внутриклеточны
ми рецепторами

Регулируют
транскрипцию
отдельных генов

Транспортируют
ся с белками крови
к мишени
переносчиками



ГИДРОФИЛЬНЫЕ ГОРМОНЫ

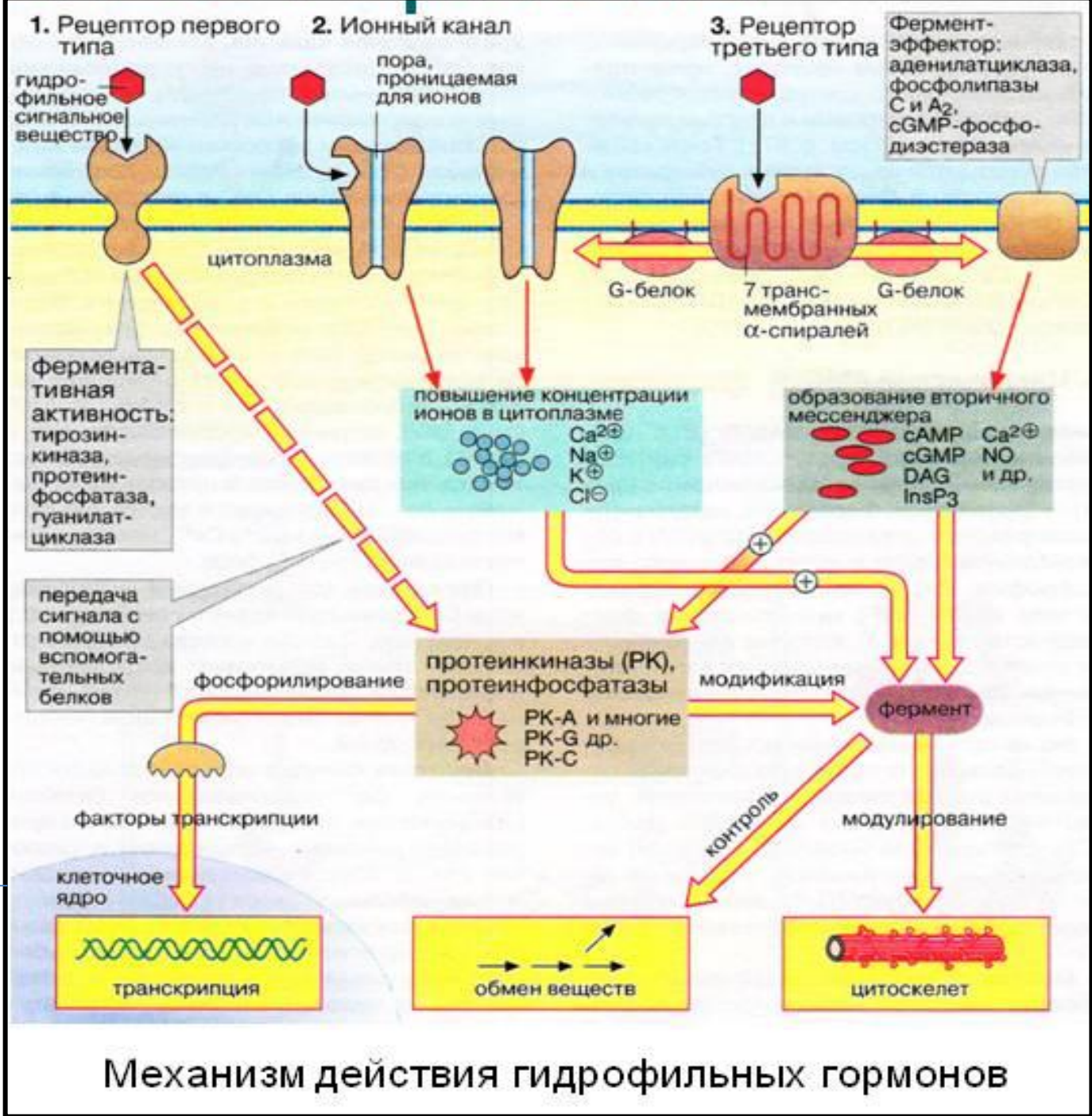
Имеют пептидную природу или являются производными аминокислот

Способны накапливаться в клетках желез

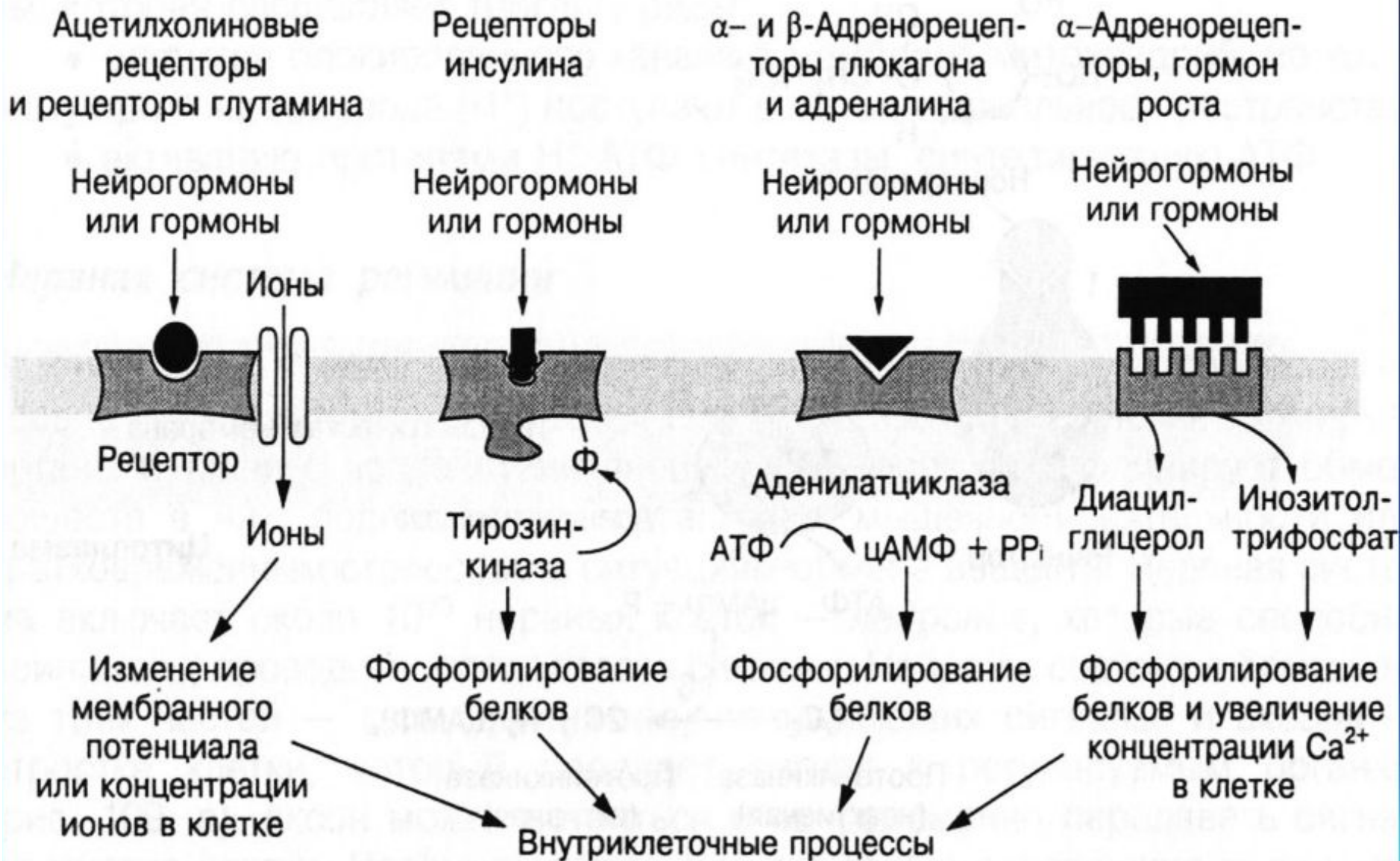
Не проникают в клетку

Связываются с рецептором, находящимся на мембране

Транспортируются в потоке крови без переносчиков



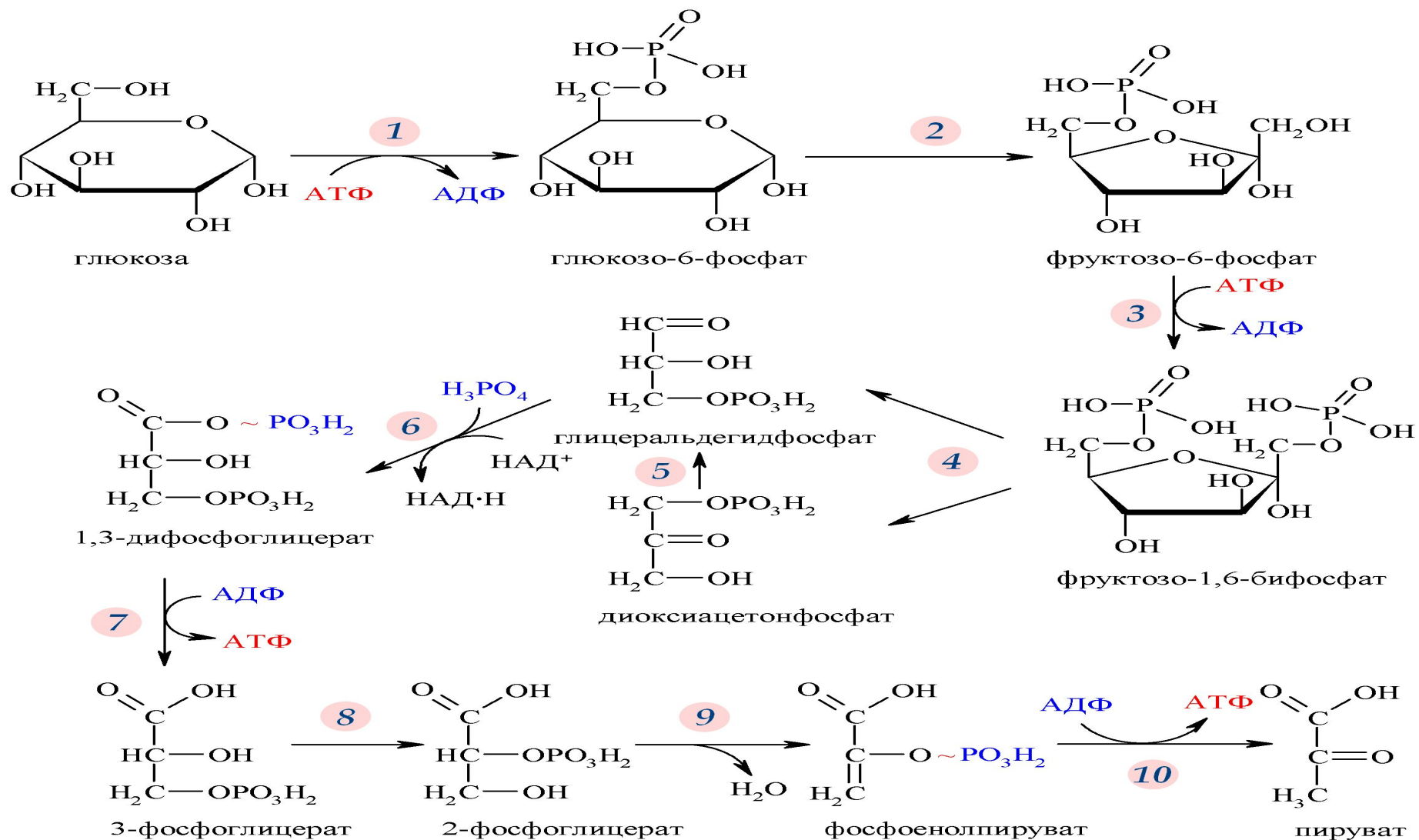
Механизмы передачи гормонального действия на внутриклеточные процессы



И Н С У Л И Н



1. Увеличивает проницаемость плазматических мембран клеток для глюкозы.
2. Активирует ферменты гликолиза (см. след. рис.).
3. Стимулирует образование в печени и мышцах из глюкозы гликогена.
4. Усиливает синтез жиров и белков.
5. Подавляет активность ферментов, расщепляющих гликоген и жиры



Ферменты гликолиза: 1 — Гексокиназа 2 — Глюкозо-6-фосфатизомераза
 3 — 6-Фосфофруктокиназа 4 — Альдолаза 5 — Триозофосфатизомераза
 6 — Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа 7 — Фосфоглицераткиназа 8 — Фосфоглицеромутаза 9 — Енолаза 10 — Пируваткиназа



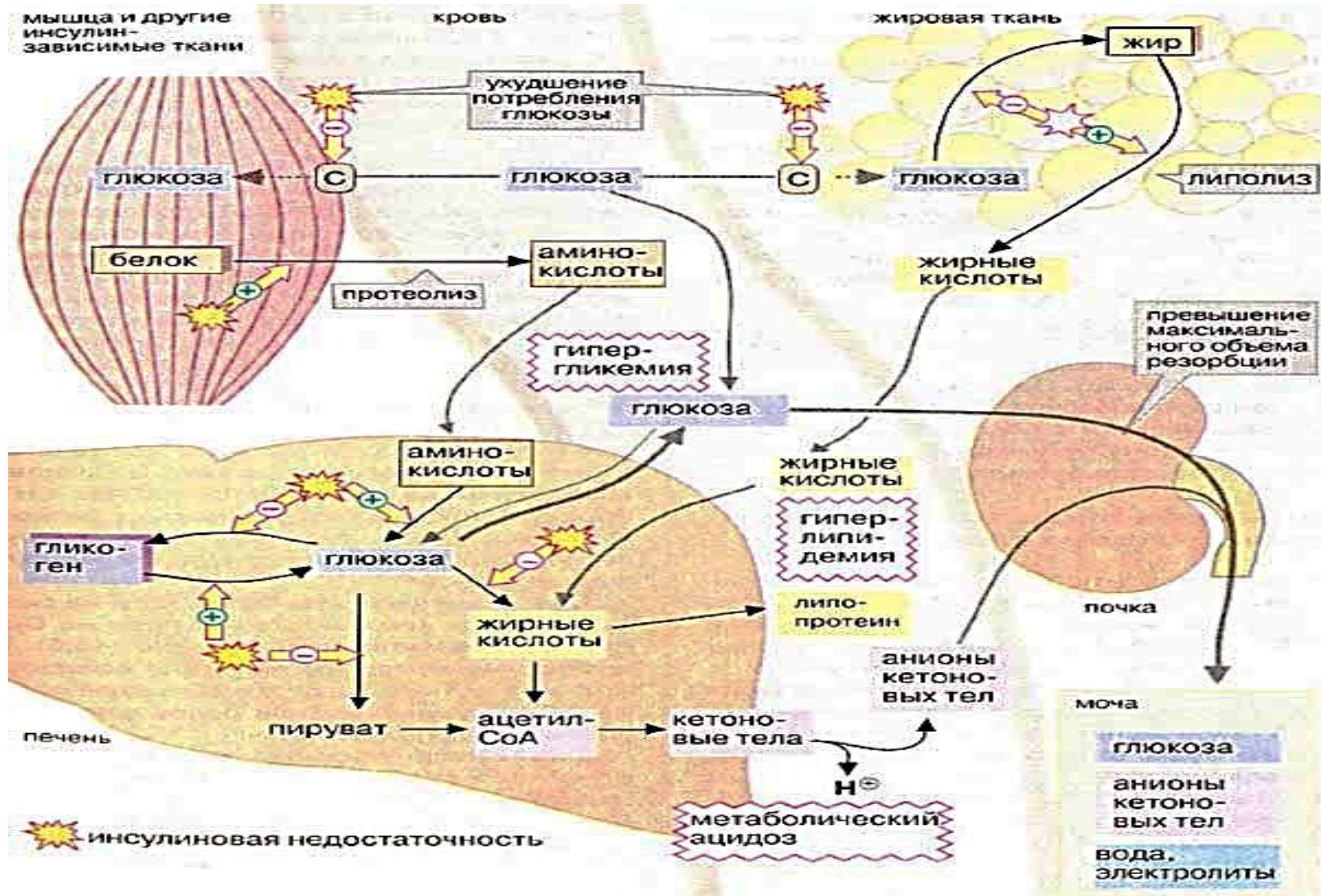
Инсулин вырабатывается в бета-клетках островков Лангерганса поджелудочной железы.



70% матричной РНК, выделенной из этих клеток, кодируют именно инсулин.

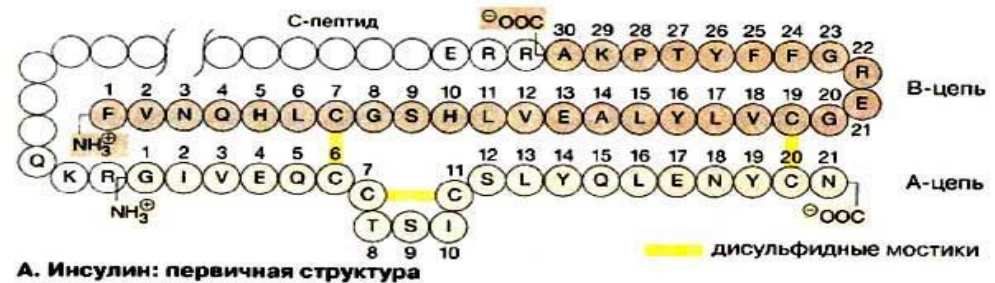
Инсулин секретируется в ответ на стимуляторы секреции инсулина (**глюкозу, маннозу, аминокислоты – лейцин, аргинин**). Человеческая поджелудочная железа содержит до 8 мг инсулина (200 биол. Ед; 1 мг = 28 БЕ).

ПОСЛЕДСТВИЯ ДЕФИЦИТА ИНСУЛИНА





Человеческий инсулин



**Структура инсулина
расшифрована в 1954 г. англ.
биохимиком
Ф. Сэнджером**

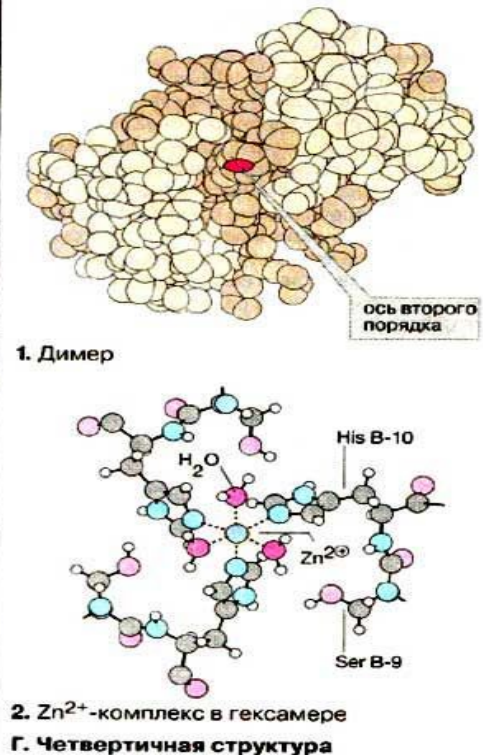
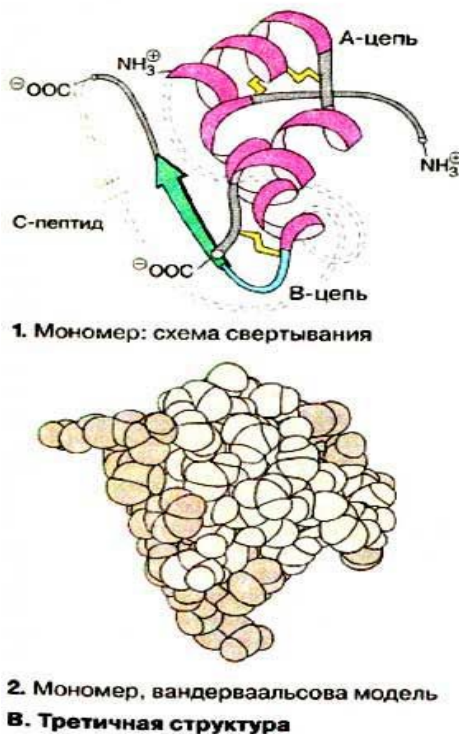
Инсулин это полипептид с м.м.
5808;

- 51 аминокислота
- 2 полипептидные цепи,
соединенные дисульфидными
мостиками:

цепь А - 21 аминокислота

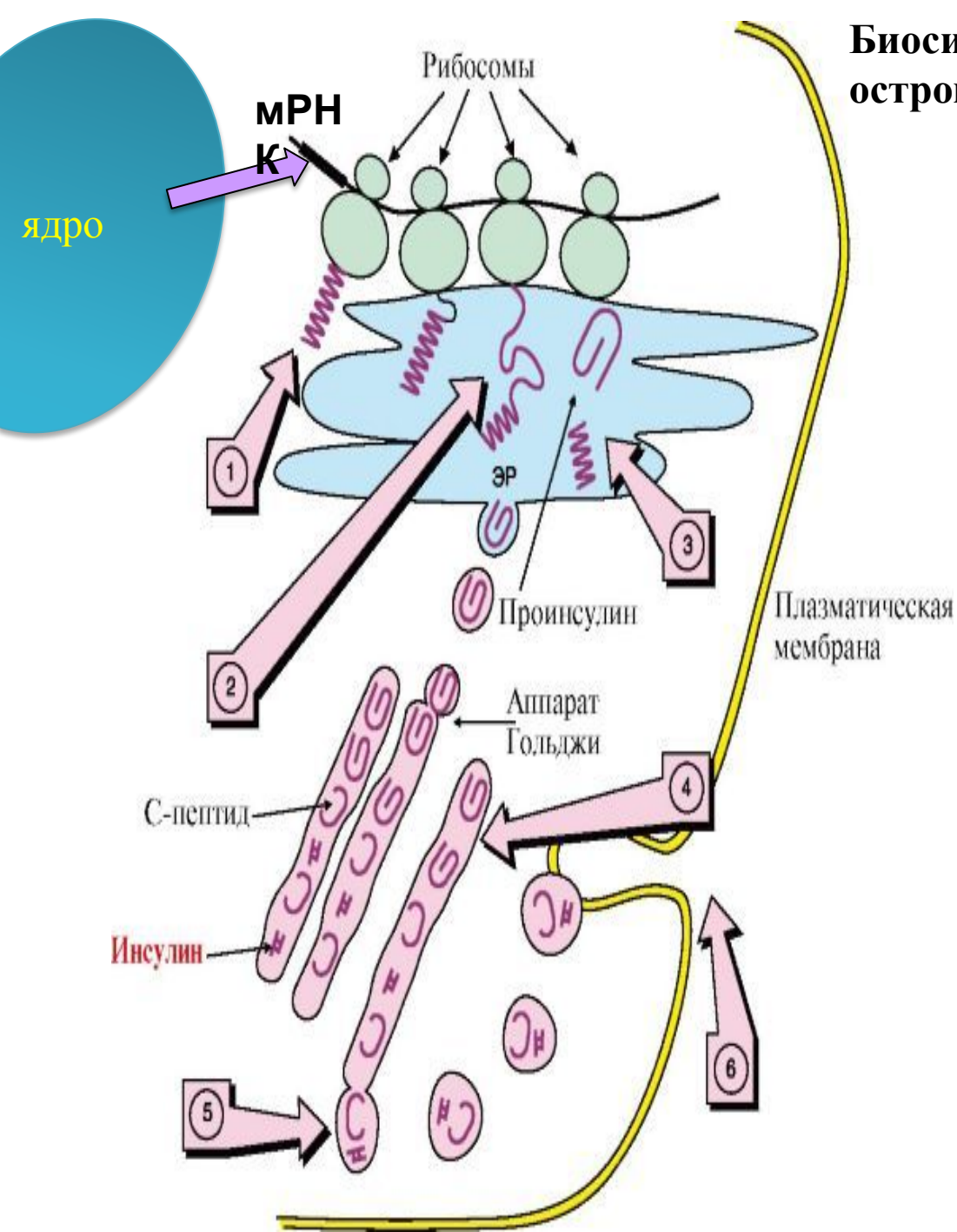
цепь Б – 30 аминокислот

**Аминокислотный состав цепей
видоспецифичен**



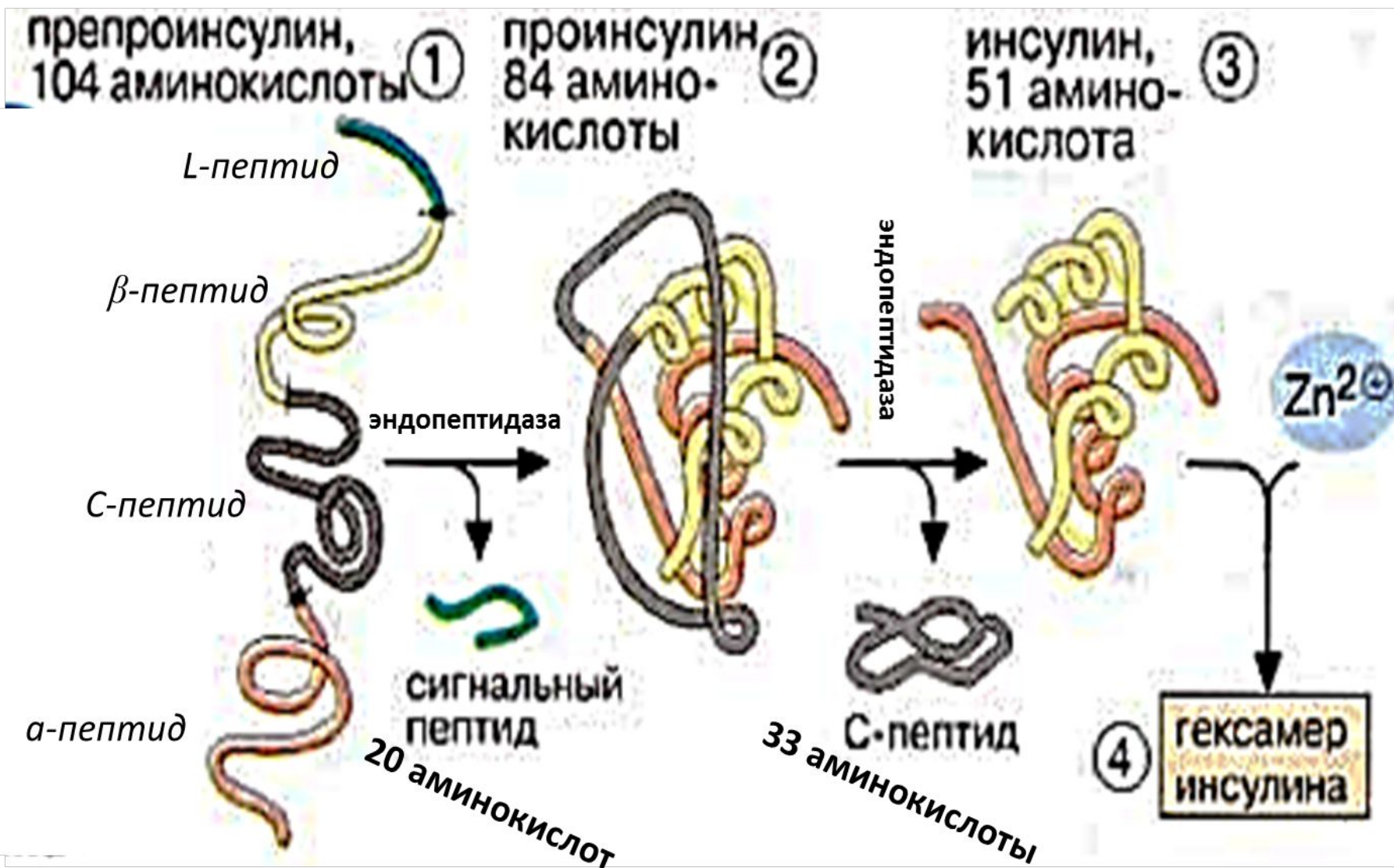
СИНТЕЗ ИНСУЛИНА В КЛЕТКАХ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Биосинтез инсулина в β -клетках островков Лангерганса

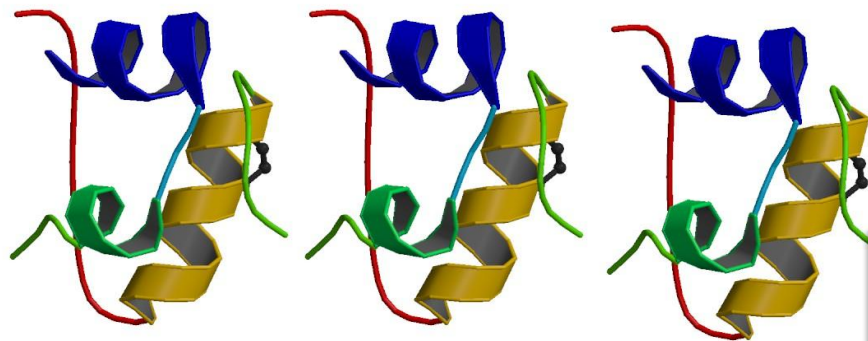
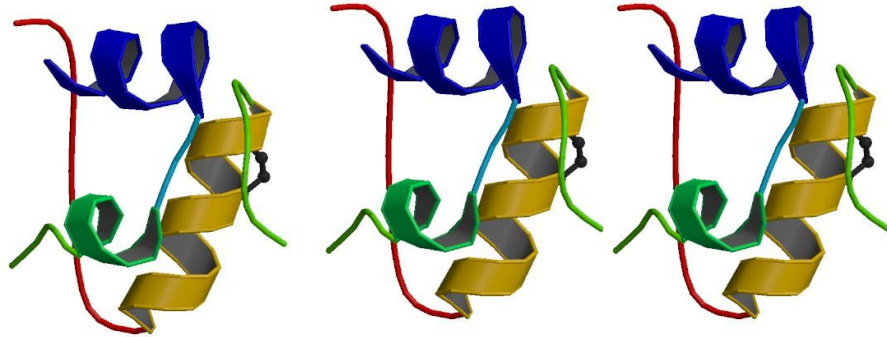


- 1 - синтез полипептидной цепи препроинсулина происходит на полирибосомах эндоплазматического ретикулума (ЭР);
- 2 - сигнальный пептид отщепляется по завершении синтеза полипептидной цепи и образуется проинсулин;
- 3 - проинсулин → из ЭР в аппарат Гольджи и расщепляется на инсулин и С-пептид;
- 4 - Молекулы инсулина, соединяются с ионами цинка и образуют кристаллические гексамерные агрегаты.
5. Кристаллы инсулина включаются в секреторные гранулы и депонируются,
- 6 – зрелые гранулы постепенно выделяются путем экзоцитоза

Биосинтез инсулина в β -клетках островков Лангерганса



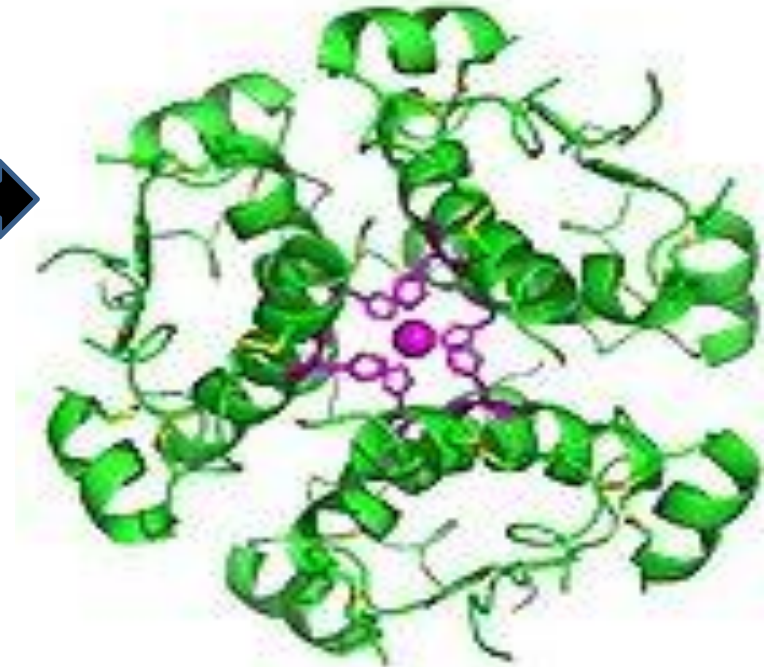
МОНОМЕРЫ инсулина



Биологически активные
молекулы инсулина

Структура кристалла инсулина, депонируемого в β -клетках островков ЛАНГЕРГАНСА.

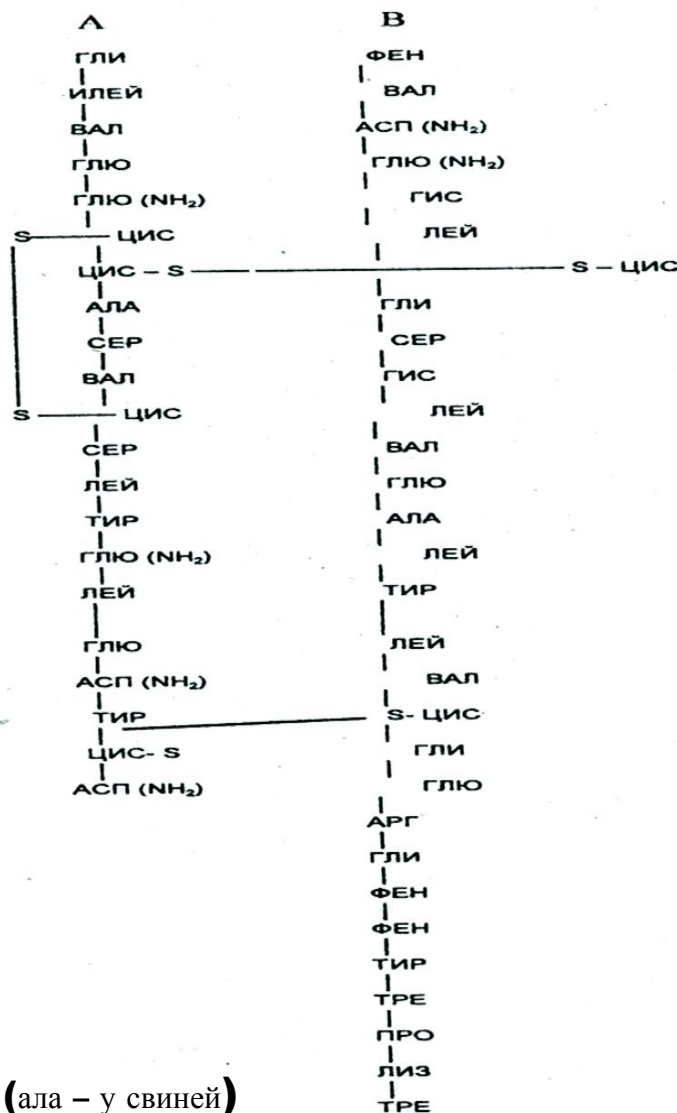
Image of six insulin molecules assembled in a hexamer, highlighting the threefold [symmetry](#), the [zinc](#) ions holding it together, and the [histidine](#) residues involved in zinc binding. Insulin is stored in the body as a hexamer, while the active form is the monomer.



После экзоцитоза кристаллы инсулина, **попадают в межклеточное пространство и кровотока**. Изменение физических свойств среды приводит к отщеплению цинка и распаду кристаллического неактивного инсулина на отдельные молекулы, которые и обладают биологической активностью.

БИОСИНТЕЗ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ИНСУЛИНА

1 1980 г.
датская
фармкомпания
«Novo» –
моноинсулин
(сод. 99%)



Моноинсулин

Ферментативно
е замещение 30-
й аминокислоты
в цепи В
инсулина свиней
(у свиней – это
аланин) на
треонин (у
человека) и
последующая
хроматографи-
ческая очистка

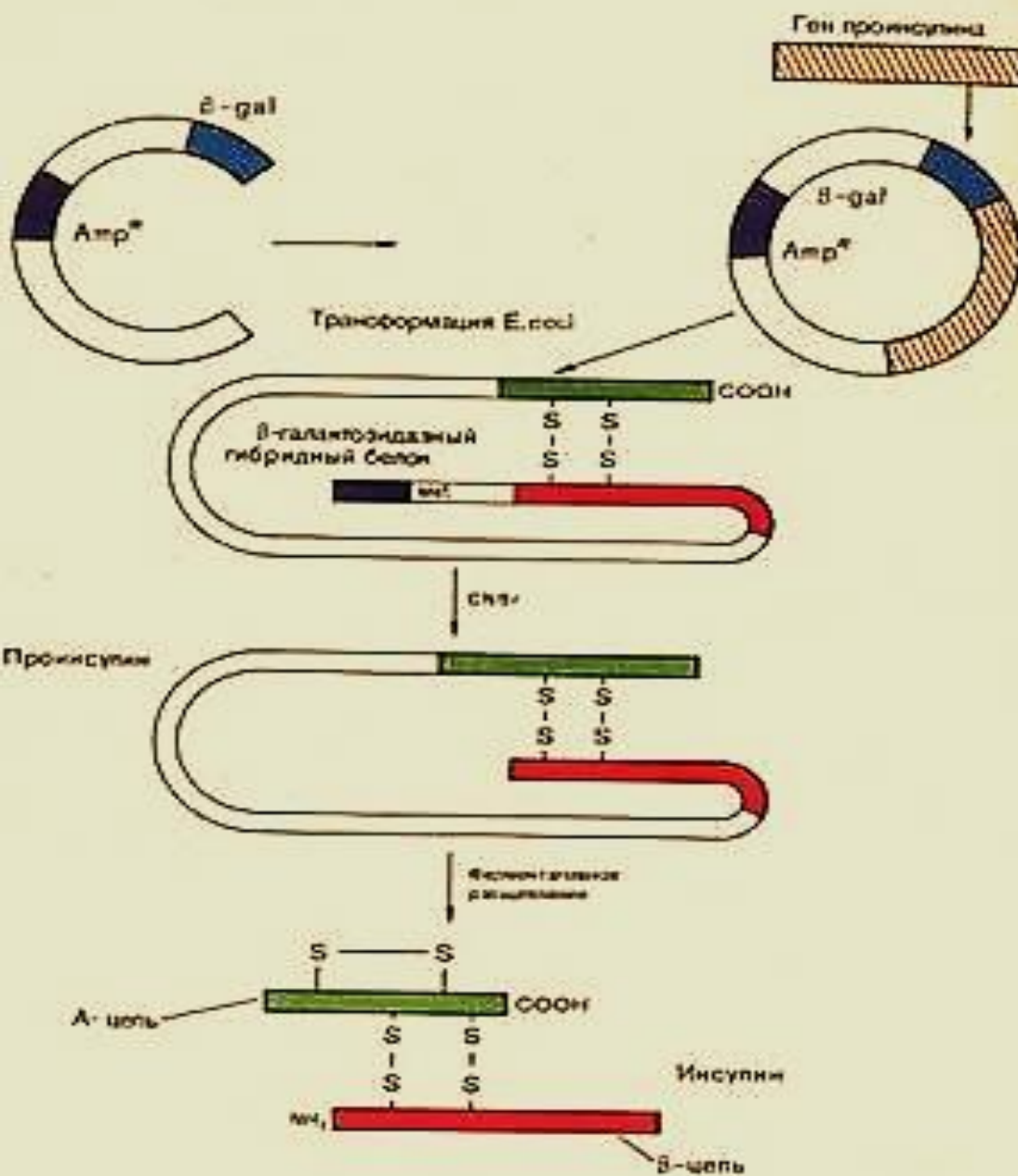
БИОСИНТЕЗ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ИНСУЛИНА

(ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ СХЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ)

- ② Синтез α - и β -цепей инсулина в клетках *E. Coli* с последующим соединением их в молекулу гормона (США, Великобритания)
- ③ Синтез проинсулина в клетках *E. Coli* с последующим преобразованием в инсулин (РАН ИБОХ) – Биотек, Пенза

Микробиологический синтез

инсулина:



- ❑ Химическим путем создают синтетический ген проинсулина. На N-конце гена - кодон ТАС (метионин), а на С-конце - два стоп-кодона (терминатор).
- ❑ Ген присоединяют к фрагменту гена β -галактозидазы *E. coli* в С-концевой части. Образующийся гибридный ген имеет свой промотор и свой рибосом-связывающий участок
- ❑ Встраивают в плазмиду *BpR322* с помощью ДНК-лигазы
- ❑ Гибридный ген трансформируют в клетку-хозяина
- ❑ Выделяют и культивируют трансформированные клетки
- ❑ Проинсулин, в составе **β -галактозидазного гибридного белка** выделяют и подвергают химико-ферментативной трансформации в той же последовательности, что и *in vivo*:
 - отщепляют β -галактозидазный фрагмент,
 - проводят **окислительный сульфитолиз с последующим восстановительным замыканием 3-х дисульфидных связей**
 - Ферментативно (эндопептидаза)

Очистка синтетического инсулина

- Важно очистить инсулин от проинсулина, который индуцируют выработку **антиинсулиновых антител**.
- Используется хроматографическая очистка:
 - Ионообменная,
 - Гелевая
 - ВЭЖХ.
 - Наиболее эффективна аффинная хроматография

Стандартизация инсулина

- По чистоте классифицируют препараты инсулина на 4 группы, в зависимости от содержания проинсулина:
 - обычные, содержат проинсулин более 1%
 - монопиковые – менее 0,3% (**Гельфильтрационная хроматография**)
 - улучшенные монопиковые – менее 0,005%
 - монокомпонентные – менее 0,001%
- Полный контроль производства генноинженерного инсулина включает:
 - контроль стабильности рекомбинантного штамма и плазмиды,
 - отсутствие постороннего генетического материала в препарате,
 - идентичность экспрессируемого гена
 - и т.д., всего 22 показателя.

ИНСУЛИНЫ

Инсулины короткого действия (начало действия обычно через 30-60 мин; максимум действия через 2-4 ч; продолжительность действия до 6-8 ч):

- ❏ инсулин растворимый [человеческий генно-инженерный] (Актрапид НМ, Гансулин Р, Ринсулин Р, Хумулин Регуляр);
- ❏ инсулин растворимый [человеческий полусинтетический] (Биогулин Р, Хумодар Р);
- ❏ инсулин растворимый [свиной монокомпонентный] (Актрапид МС, Монодар, Моносунсулин МК).

Инсулины ультракороткого действия (гипогликемический эффект развивается через 10-20 мин после п/к введения, пик действия достигается в среднем через 1-3 ч, длительность действия составляет 3-5 ч):

- ❏ инсулин лизпро (Хумалог);
- ❏ инсулин аспарт (НовоРалид Пенфилл, НовоРалид ФлексПен);
- ❏ инсулин тулизин (Алидра).

Препараты инсулина комбинированного действия (бифазные препараты) (гипогликемический эффект начинается через 30 мин после п/к введения, достигает максимума через 2-8 ч и продолжается до 18-20 ч):

- ❏ инсулин двухфазный [человеческий полусинтетический] (Биогулин 70/30, Хумодар К25);
- ❏ инсулин двухфазный [человеческий генно-инженерный] (Гансулин 30Р, Гансулин М 30, Инсуман Комб 25 ГТ, Микстарт 30 НМ, Хумулин М3);
- ❏ инсулин аспарт двухфазный (НовоМикс 30 Пенфилл, НовоМикс 30 ФлексПен).

Препараты инсулина пролонгированного действия включают в себя препараты средней продолжительности действия и препараты длительного действия.

Инсулины средней длительности действия (начало через 1,5-2 ч; пик спустя 3-12 ч; продолжительность 8-12 ч):

- ❏ инсулин-изофан [человеческий генно-инженерный] (Биосулин Н, Гансулин Н, Гансулин Н, Инсуман Базал ГТ, Инсуран НПХ, Протафан НМ, Ринсулин НПХ, Хумулин НПХ);
- ❏ инсулин-изофан [человеческий полусинтетический] (Биогулин Н, Хумодар Б);
- ❏ инсулин-изофан [свиной монокомпонентный] (Монодар Б, Протафан МС);
- ❏ инсулин-цинк суспензия составная (Монотард МС).

Инсулины длительного действия (начало через 4-8 ч; пик спустя 8-18 ч; общая продолжительность 20-30 ч):

- ❏ инсулин гларгин (Лантус);
- ❏ инсулин детемир (Левемир Пенфилл, Левемир ФлексПен).

Соматотропный гормон

Обратимся к литературе. И на сей раз к приключенческой. Но вовсе не замысловатый сюжет повести Еремея Парнова «Ларец Марии Медичи» привлек наше внимание к ней. Дело здесь в ином, во вполне банальной жизненной ситуации, в которой по воле автора оказываются главные герои. Их, как и положено, двое — он и она, Вера Фабиановна и Лев Минеевич. Она — высокая, властная и по сей день замечательно красивая старуха, он — маленький, пухленький старичок с детскими ручонками. И тот и другой не раз и не два задумывались на склоне лет, почему же, собственно, так и не соединились их судьбы? А виной тому была так, безделица, совсем пустячок — маленький рост Льва Минеевича. Стоит ли дальше рассуждать по этому поводу? Или и так всем все понятно?



Между тем беде Льва Минеевича, появившись он на свет лет эдак на 65 попозже, вполне можно было бы помочь. По крайней мере, искусственно синтезируемый *соматотропин* (гормон роста), **производимый в организме гипофизом**, важнейшей железой эндокринной системы, сегодня — реально существующий препарат. И, как очевидно из вышеприведенной информации, производство его весьма доходное, а сам он — предмет коммерции многих фирм, занимающихся сбытом биотехнологической продукции.

Передняя доля гипофиза – тропные гормоны
СОМАТОТРОПНЫЙ ГОРМОН
Влияние СТГ на белковый обмен

- способствует поступлению АК в клетки,
- угнетает катаболизм белков и АК
- активизирует биосинтез белка, ДНК и РНК.

Влияние СТГ на углеводный обмен

- контринсулярный гормон - активизирует инсулиназу печени (способствует расщеплению инсулина)
- активизирует выход глюкозы из печени
- угнетает превращение глюкозы в жир

Влияние СТГ на липидный обмен

- стимулирует расщепление жира (липолиз)
- стимулирует окисление жирных кислот.

«Открытие» соматотропина произошло задолго до XX столетия. Правда, врачи и алхимики средневековья не предполагали, какое именно активное начало содержится в экстракте, приготовленном из железы, что расположена у самого основания черепа. Но зато они знали, как из него сделать экстракт и как с его помощью вырастить чудовищно гигантских крыс.

Экспериментировали с гипофизом и в XIX столетии, а в XX веке гипофизы умерших или погибших по разным причинам людей стали для медиков и фармакологов единственным источником соматотропина, с помощью которого они возвращали нуждающимся в помощи детям, в некотором смысле обделенным природой, высокий рост. А вместе с ним — красоту и уверенность в себе.

Но курс лечения долг и эффективен только при наличии нужных количеств дефицитного гормона. Под словами «нужных количеств» здесь имеются в виду вполне конкретные цифры: **полный курс лечения**, обеспечивающий мальчику или девочке нормальное развитие, предполагает такое количество соматотропина, которое в состоянии наработать **100—150 человеческих гипофизов**. А где их столько взять?

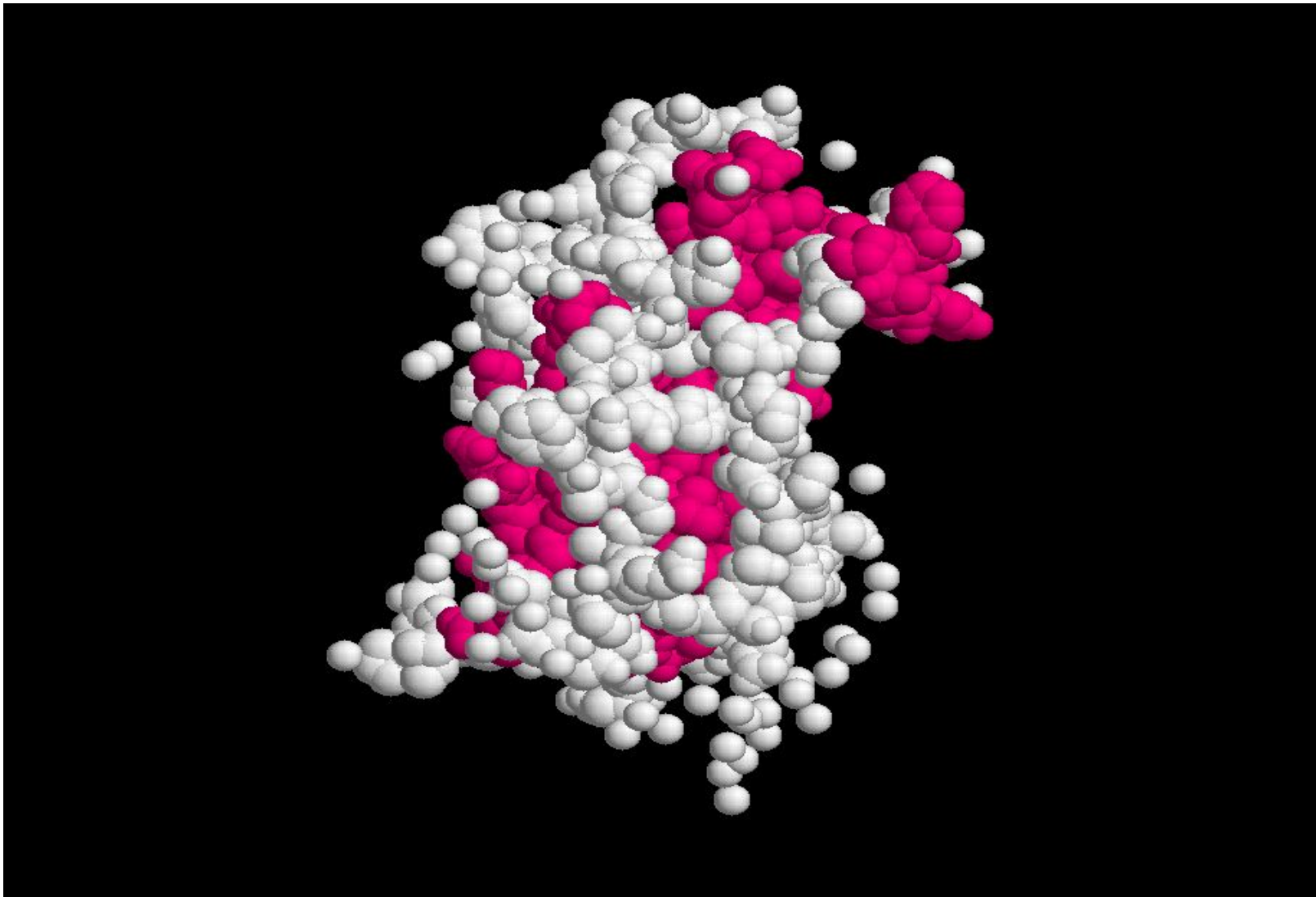
Ну зачем же так категорично ставить вопрос, возможно, поправит меня читатель, ведь никто не запрещает специалистам воспользоваться гипофизами животного происхождения, они ведь тоже продуцируют соматотропин.

В том-то и дело, что человеку нужен только человеческий гормон роста. Препарат животного происхождения (точнее, выделенный из гипофиза крупного рогатого скота) ему не подходит, поскольку гормон роста — видоспецифический.

Правда, как и во всяком правиле, здесь тоже есть исключение. Крыса, например, на соматотропин любого происхождения реагирует как на свой собственный, столь пластична и легко приспособляема ее природа.

Но человек — не крыса; его «любой» гормон не устраивает. Значит, уповать придется только на чужью белу. Вот почему до недавнего времени все

Рукотворный синтезатор белков (*метод Меррифилда — твердофазного синтеза белков. Вспомните, ученый «пришивал» к поверхности твердого носителя собираемые в определенной последовательности аминокислоты полипептидов*) ПОКА НЕ ИДЕТ НИ В какое сравнение с естественным, природным синтезатором — живой клеткой, в котором белки производятся по аналогичной схеме, а вот ошибки исключаются вовсе. Ведь в клетке без усталости трудится, не зная ни смен, ни вахт, собственное ОТК — самоконтроль. Вот почему по точности и эффективности с клеточным производством не может сравниться ничто на свете — в ней молекула управляет молекулой.



Структура соматотропного гормона (СТГ)

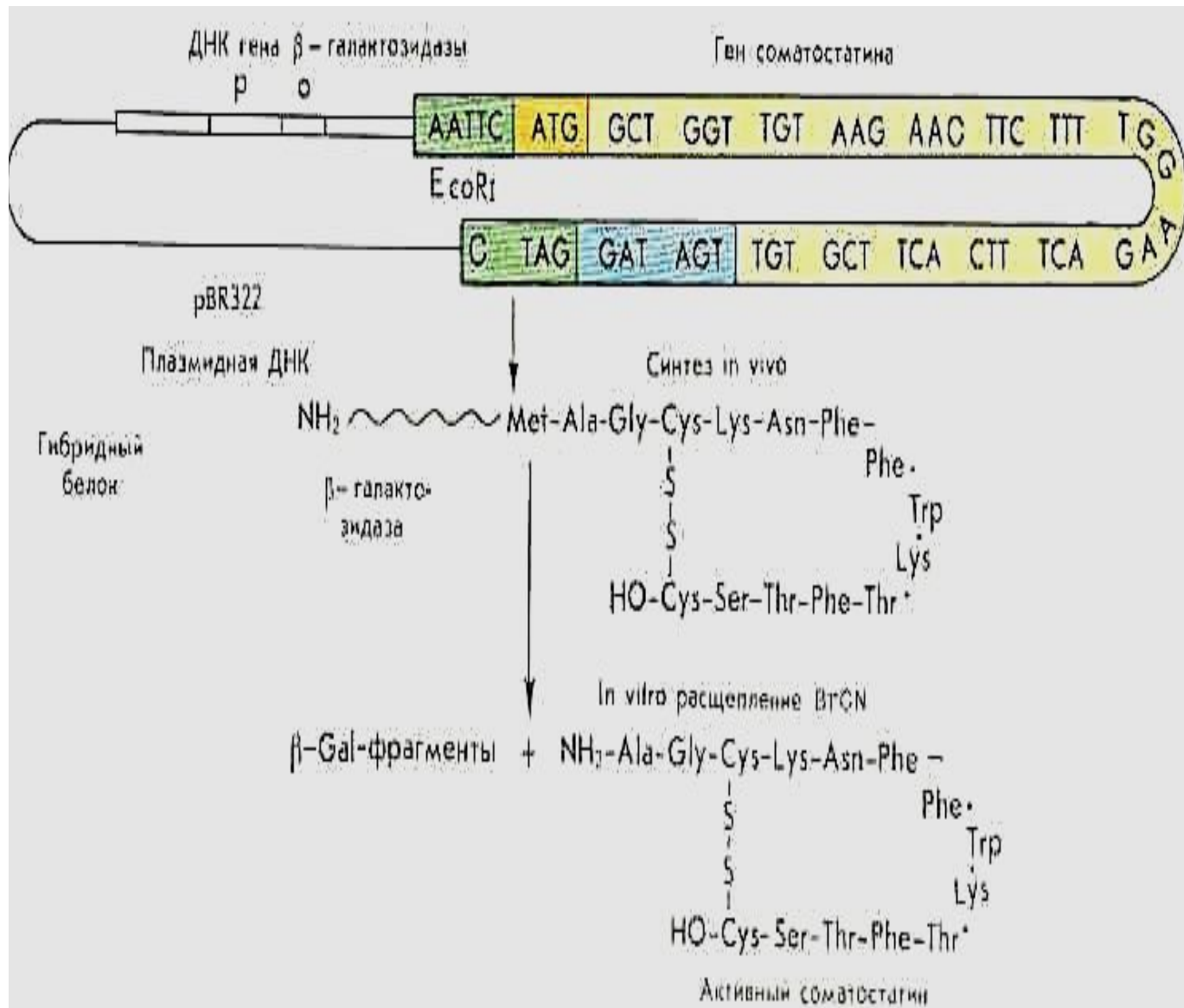
СОМАТОТРОПНЫЙ ГОРМОН (СТГ)

- Состоит из 191 амк. **Регулирует рост человека**, применяется и для лечения ожогов, переломов, язв.
- 1963 – получали из трупного материала, всего 4-6 мг соматотропина из 1 трупа. Этого количества катастрофически не хватало.
- Кроме того были частыми явления заражения гипофизарного материала нейротоксическим вирусом с очень длительным инкубационным периодом. Этот вирус нередко приводил к летальному исходу реципиентов гормона трупного происхождения.
- СТГ, выделяемого из трупных В **1985** г. ВОЗ запретила применение человеческих гипофизов.
- В 1980 г. фирмой «Genentech» получен **рекомбинантный СТГ – соматрем**. Отличается более высокой активностью от искусственно получаемого гипофизарного ввиду более высокой степени очистки.

- Схема экспрессии чужеродных генов довольно проста, но на практике возникают следующие проблемы (см. биосинтез инсулина).
- **Регуляторные сигналы эукариот сильно отличаются от регуляторных сигналов бактерий** и не узнаются бактериальными РНК-полимеразами и рибосомами. При клонировании в бактериях ДНК эукариотической клетки экспрессия не происходит, поскольку в бактериальной клетке **отсутствует система "сплайсинга"**.
- Поэтому для осуществления экспрессии эукариотического гена соответствующая кДНК присоединяется в составе векторной молекулы к регуляторным элементам бактерии - промотору и рибосом-связывающему участку (последовательность Шайн-Дальгарно).
- Присоединение ведется таким образом, что кодирующая часть эукариотического гена присоединяется к кодирующей части бактериального гена так, чтобы сохранялась "рамка" считывания. В этом случае образуются гибридные белки, содержащие в N-концевой части бактериальный белок или его часть, а в C-

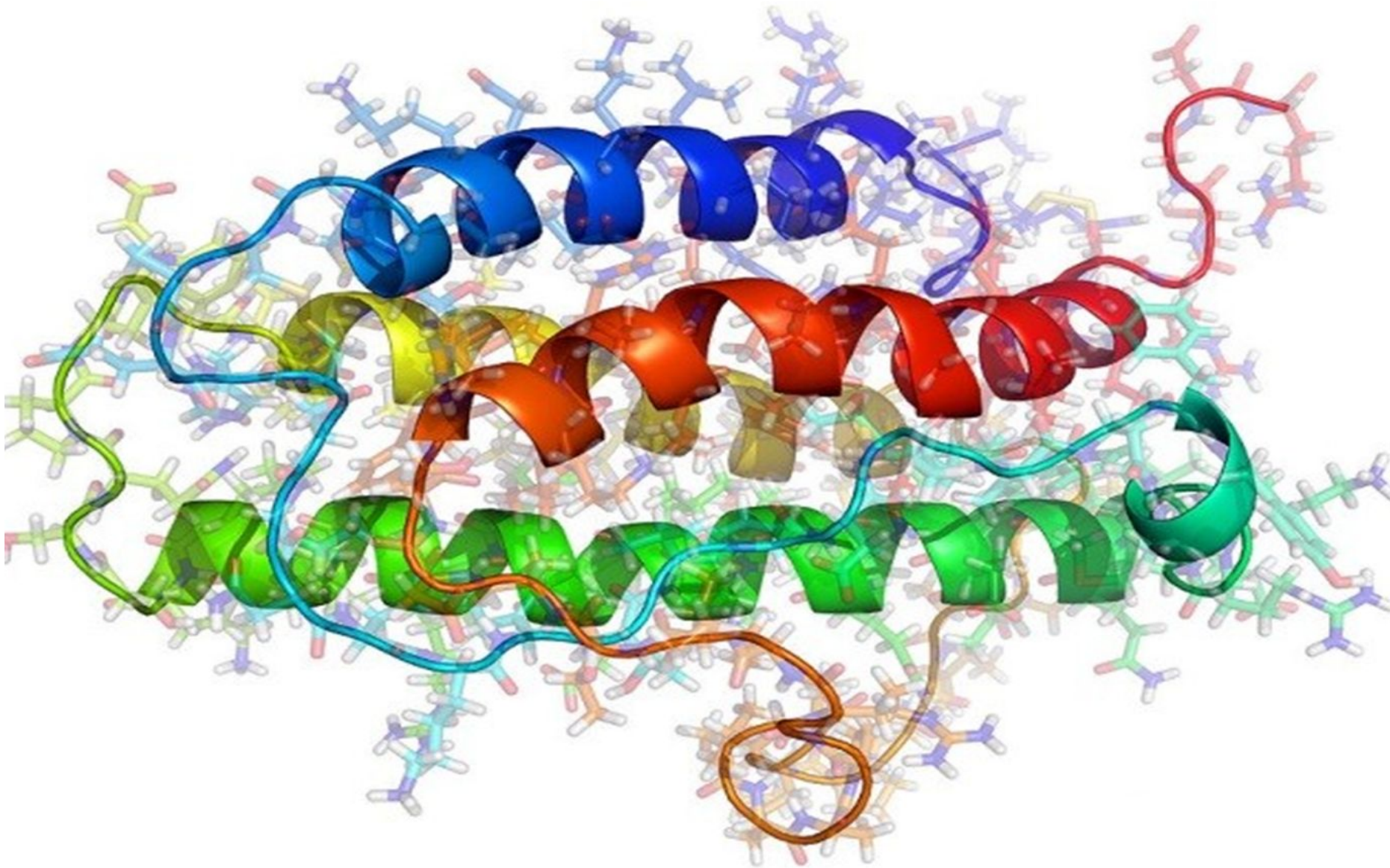
- Получение гонадотропного гормона в клетках *E. coli* разработано К. Итакурой и Г. Бойером.
- Аминокислотная последовательность этого гормона была известна биотехнологам, и исходя из нее, согласно генетическому коду, была выведена структура соответствующего искусственного гена.
- После этого был осуществлен его синтез: ген содержал на N-конце кодон АТС, кодирующий метионин, и липкий конец, соответствующий расщеплению рестриктазой *EcoRI* - ААТТ, а на С-конце - два стоп-кодона.
- Этот фрагмент ДНК был присоединен к фрагменту гена бета-галактозидазы *E. coli*, содержащему в С-концевой части участок расщепления *EcoRI*, и вместе со своим промотором и оператором был встроен в плазмиду pBR322. В результате такого соединения получен гибридный ген, в котором С-концевая часть гена бета-галактозидазы заменена "геном" соматостатина. Между геном бета-галактозидазы и собственно геном соматостатина находится колон метионина.

Получение гонадотропного гормона соматостатина через гибридный белок - бета-галактозидазу



- В образующемся химерном белке соматостатин отделен от галактозидазной части остатком метионина.
- Поскольку соматостатин (ЛВ) не содержит метиониновых остатков, то химерный белок расщепляют бромцианом и отделяют соматостатин в виде целого пептида

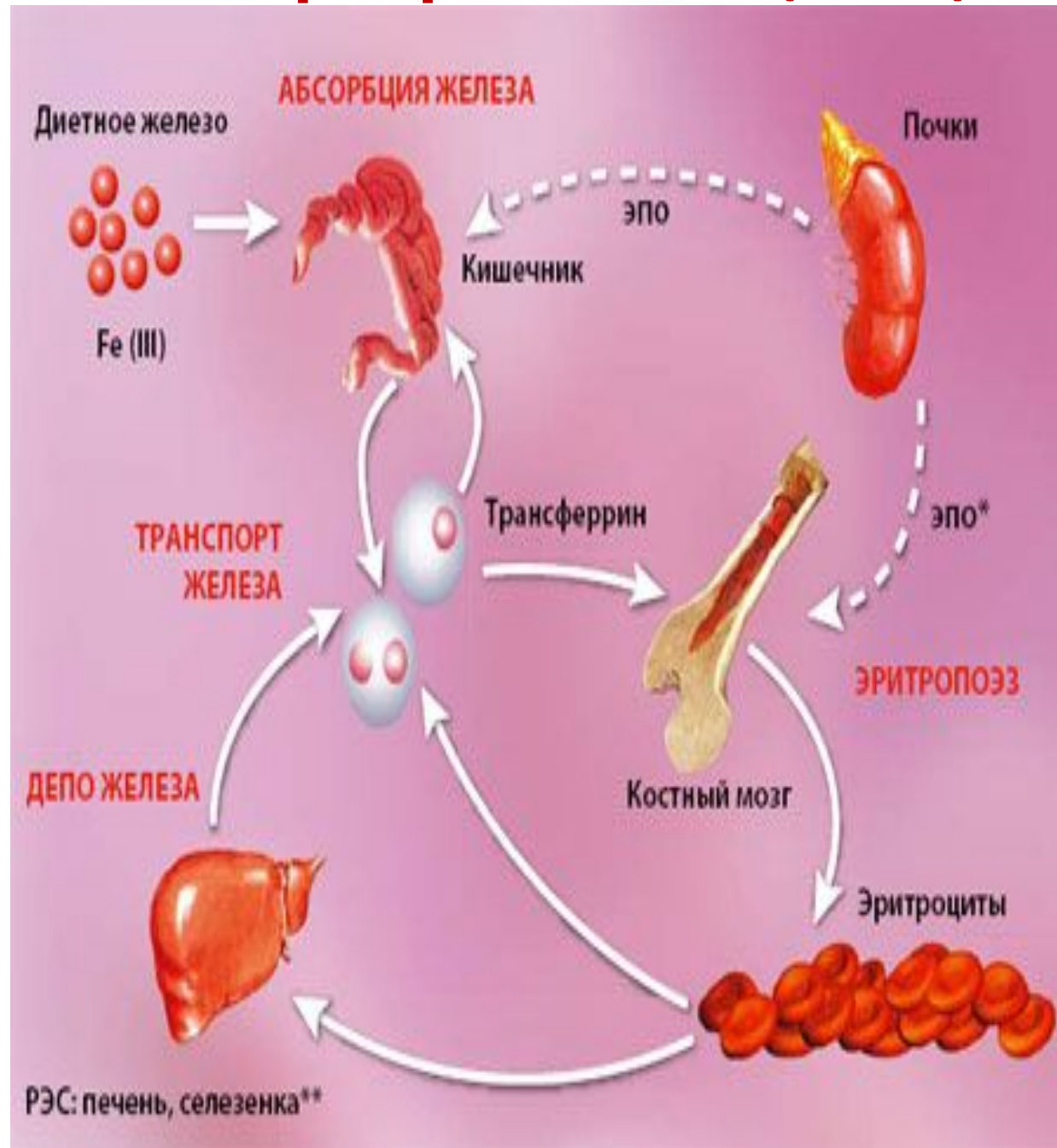
Эритропоэтин



Структура молекулы эритропоэтина (ЕРО). 165 амк, М.м.
30400. Высокогликозилирован (до 40% от М.м.)

Эритропоэтин (ЕРО)

- Вырабатывается в почках в ответ на тканевую гипоксию.
- Воздействует на специфич. рецепторы костного мозга и стимулирует пролиферацию, [МИТОЗ](#) и созревание [эритроцитов](#).
- Секреция эритропоэтина почками ↑ при кровопотере, разл. [анемических](#) состояниях (железо-, фолат-, В12-дефицитных анемиях, анемиях, связанных с поражениями [костного мозга](#) и др.), при гипоксических состояниях.
- Как ЛС показан больным с почечной недостаточностью и выраженной анемией, ↑уровень гемоглобина,

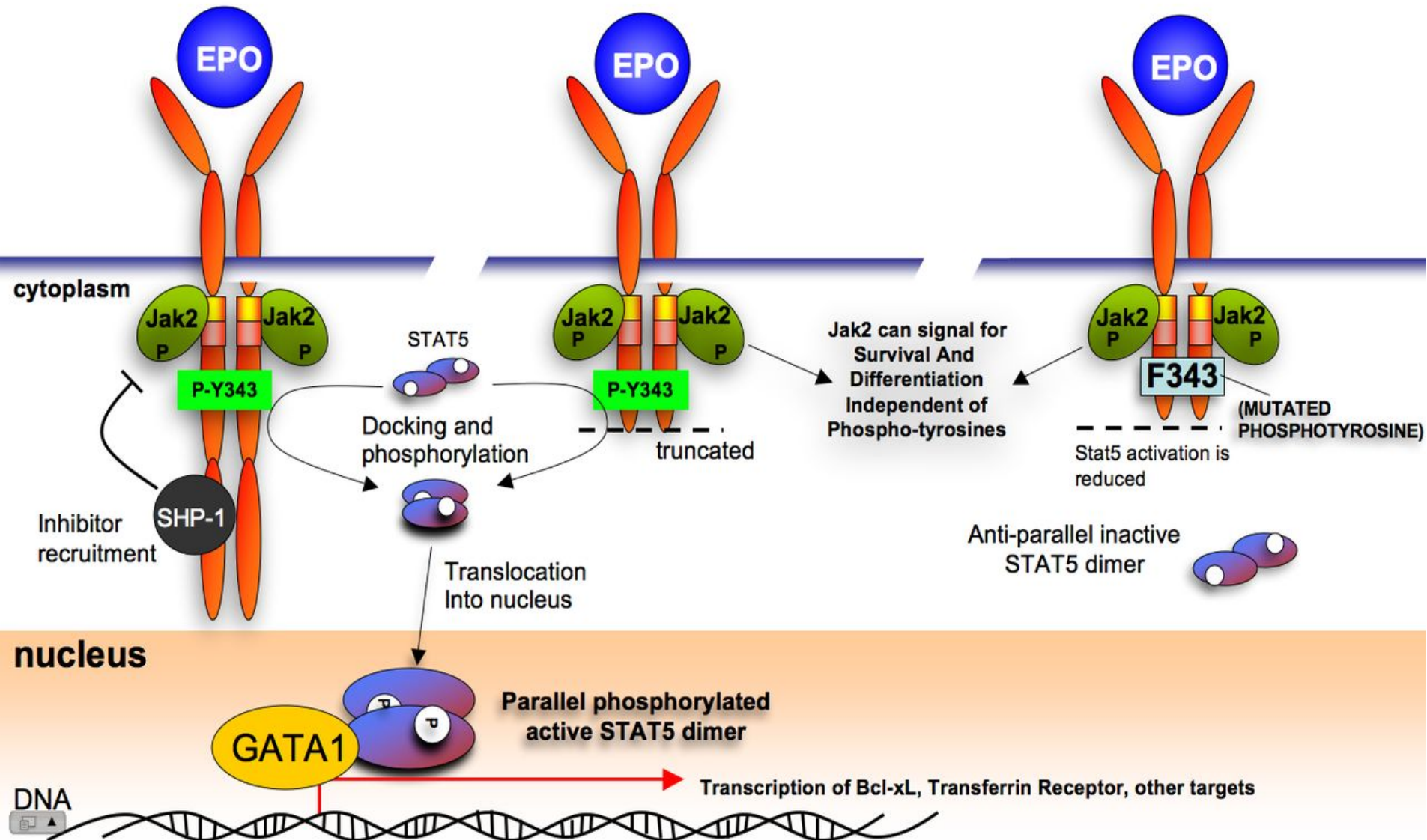


Truncated Epo Receptors

EpoR Wild-type

EpoR-H

EpoR-HM



- Получение значимых количеств из почек невозможно из-за низкого его содержания.
- В 1985 году Лин с соавт. выделили ген эритропоэтина человека из [геномной библиотеки](#) фага и показали, что ген эритропоэтина кодирует производство ЕРО в клетках млекопитающих.
- Рекомбинантный человеческий ЕРО получают в культуре клеток *млекопитающих*. Очистка - ионно-обменной и иммунно-афинной хроматографией, производитель - Amgen (США).
- В РФ НПО «Микроген» - рекомбинантный эритропоэтин человека с сывороточным альбумином в виде раствора на изотоническом *цитратном буфере* под названием «Эритропоэтин»