

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
**Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова** Министерства здравоохранения Российской  
Федерации  
(Сеченовский Университет)

**Методические материалы и рекомендации по дисциплине:**

**ОСНОВЫ РАЗРАБОТКИ И ПРОИЗВОДСТВА ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ**

основная профессиональная образовательная программа  
высшего образования - программа специалитета

33.05.01 Фармация

Кафедра организации и технологии производства иммунобиологических препаратов  
Институт трансляционной медицины и биотехнологии  
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН»

# Основы разработки и производства иммунобиологических лекарственных препаратов

## Современные иммунобиологические лекарственные препараты (ИЛП)

### Применение ИЛП в диагностике

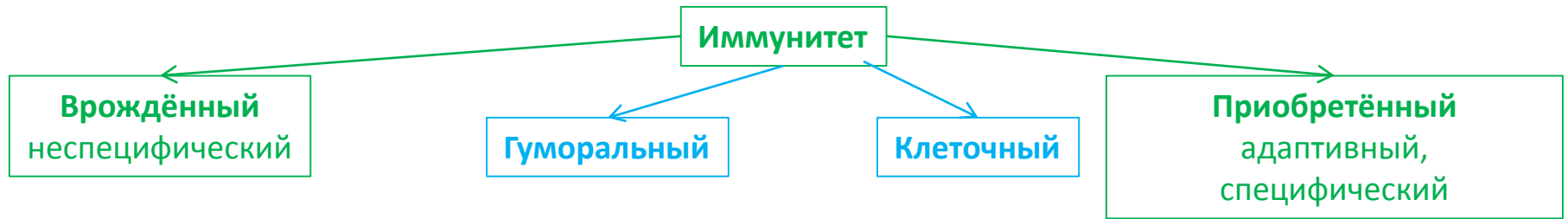
**Диагностика**

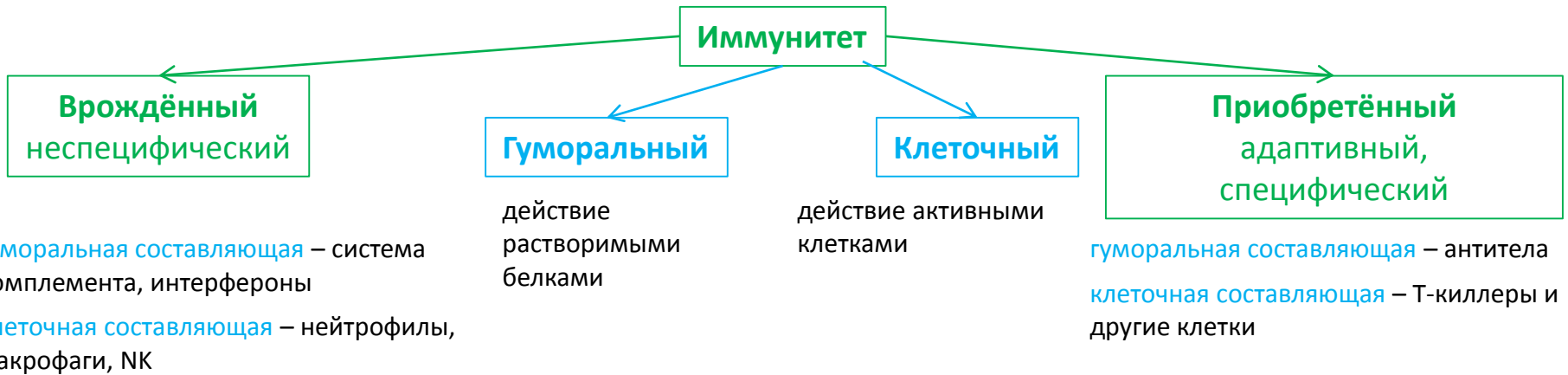
```
graph TD; A[Диагностика] --> B[Иммунный ответ]; A --> C[Антигены возбудителей];
```

**Иммунный ответ**

**Антигены  
возбудителей**

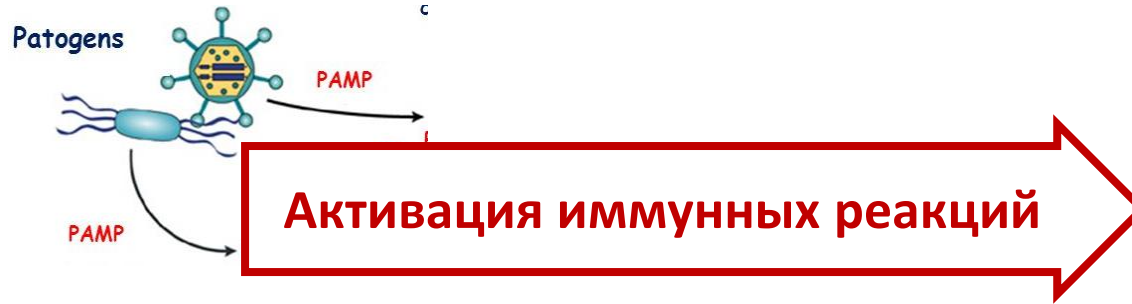
**Что в иммунитете можно измерить?**





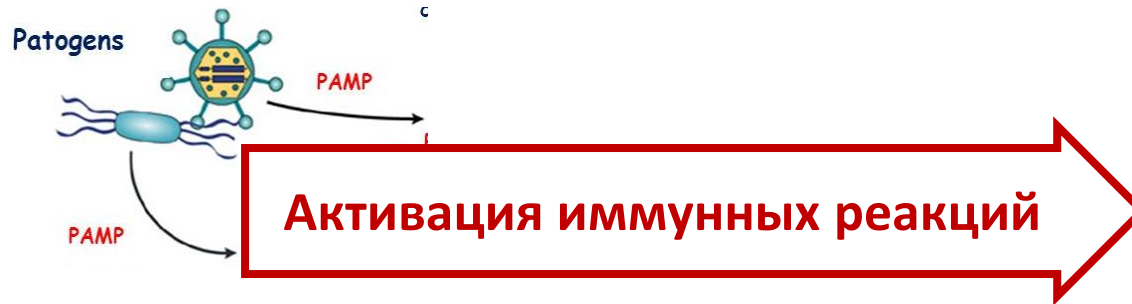
**Что можно искать при диагностике патогенов?**

# Распознавание чужеродный элементов с помощью PAMP



- патогены содержат уникальные компоненты, не характерные для клеток хозяина
- патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns, PAMP)

# Распознавание чужеродный элементов с помощью PAMP



- патогены содержат уникальные компоненты, не характерные для клеток хозяина
- патоген-ассоциированные молекулярные паттерны у млекопитающих (pathogen-associated molecular patterns, PAMP)
  - формилированный Met бактерий
  - бактериальные и грибковые углеводы (липополисахарид, LPS, грамотрицательных бактерий; маннан, хитин клеточной стенки грибов)
  - липотейхоевые кислоты из грамположительных бактерий
  - пептидогликаны клеточной стенки бактерий
  - полипептиды (флагеллин жгутиков бактерий)
  - уникальные компоненты (гликозилфосфатидилинозитол *Plasmodium*)
  - нуклеиновые кислоты (оцДНК или дцРНК)
  - мотив CpG, фланкированный 5'-Pu и 3'-Pu (редок у позвоночных)

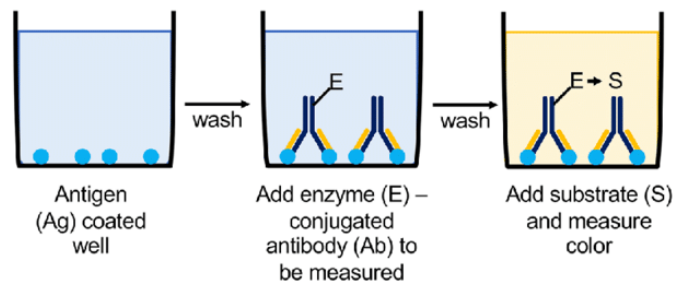
# ИФА

## Иммуноферментный анализ

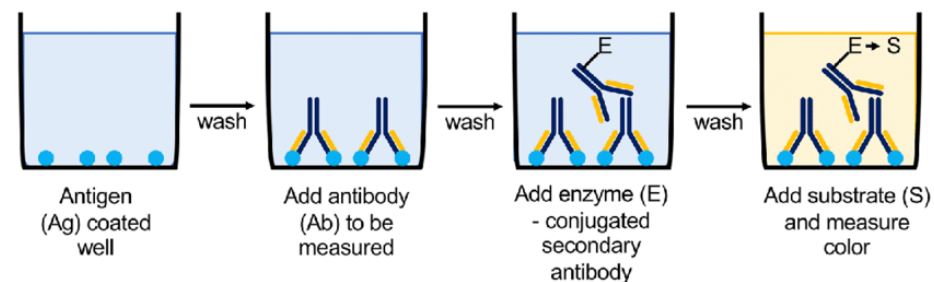
# ELISA

## Enzyme-linked immunosorbent assay

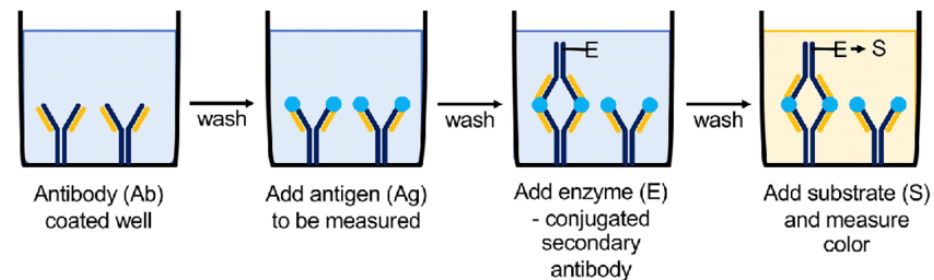
(a) Direct ELISA



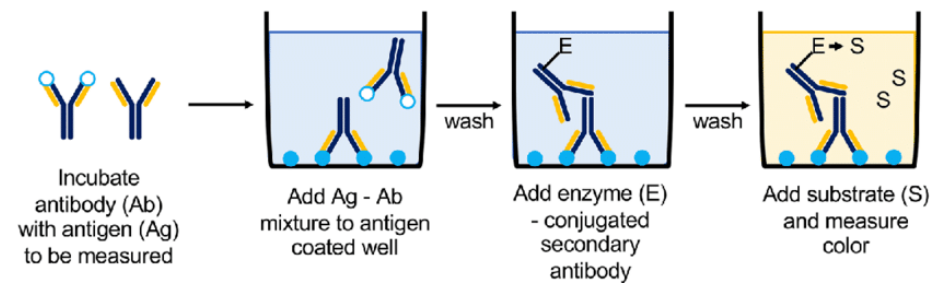
(b) Indirect ELISA



(c) Sandwich ELISA



(d) Competitive ELISA



# ИФА

## Иммуноферментный анализ

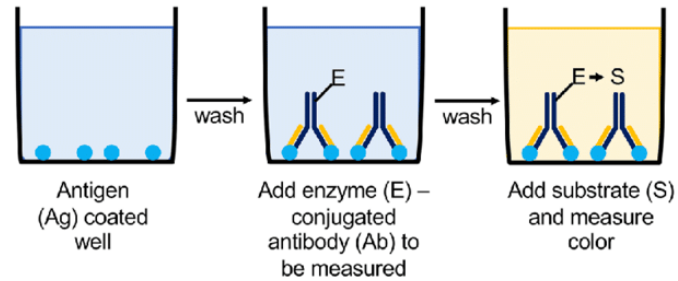
Что можно определять

каким методом?

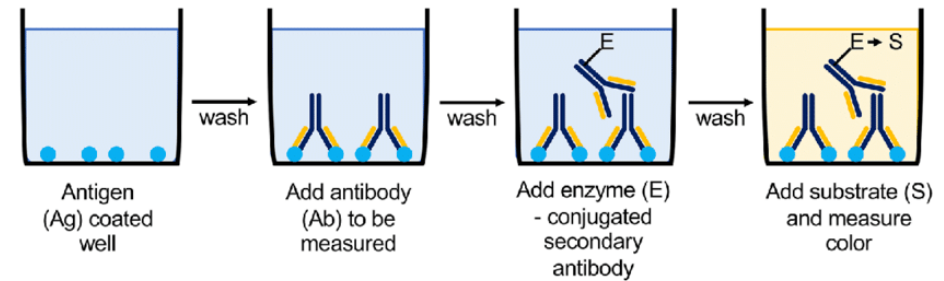
Антиген?

Антитела?

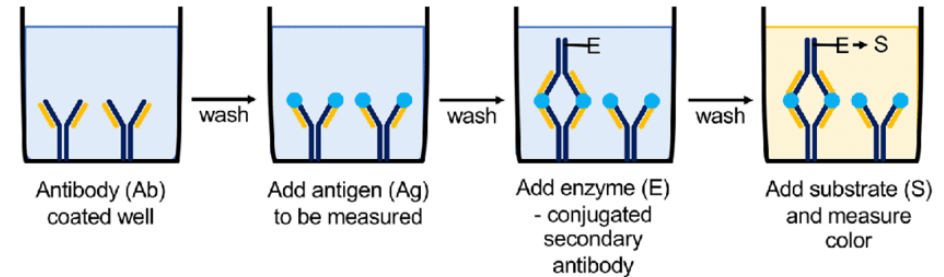
(a) Direct ELISA



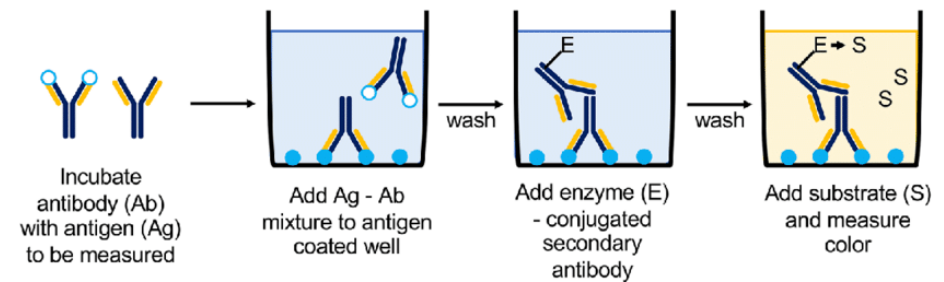
(b) Indirect ELISA



(c) Sandwich ELISA



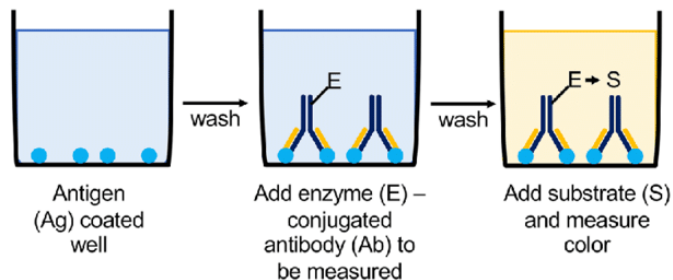
(d) Competitive ELISA



# ИФА

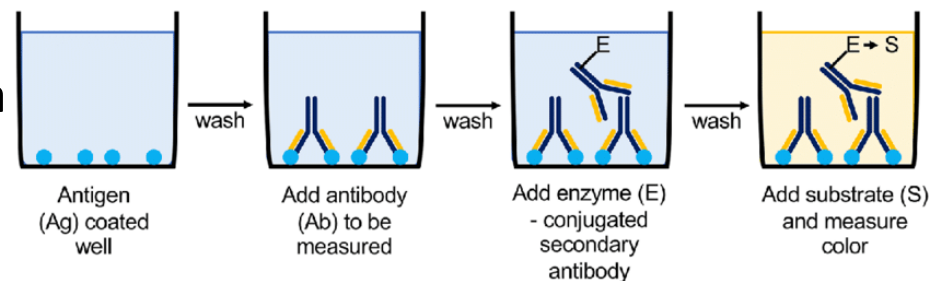
## Иммуноферментный анализ

Антиген



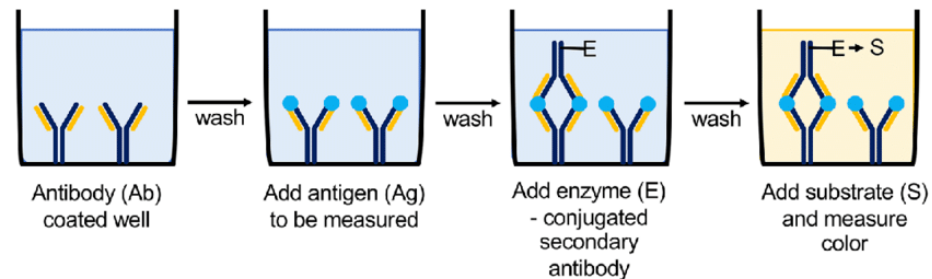
(b) Indirect ELISA

Антитела



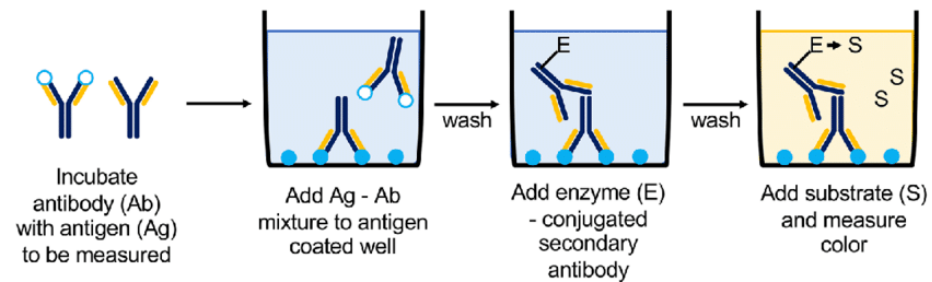
(c) Sandwich ELISA

Антиген/Антитела



(d) Competitive ELISA

Антитела



# ИФА

## Иммуноферментный анализ – параметры при разработке

**1. специфичность** – выявление только искомым Ab или Ag

**2. чувствительность** – выявления min количеств

**Для этого:**

- снижение неспецифического связывания – ОП отр  $\rightarrow$  min ( $\approx 0$ )
- увеличение силы детектируемого сигнала – ОП полож/ОП отр  $\rightarrow$  max

**$\rightarrow$  производительность (цена/результат)**

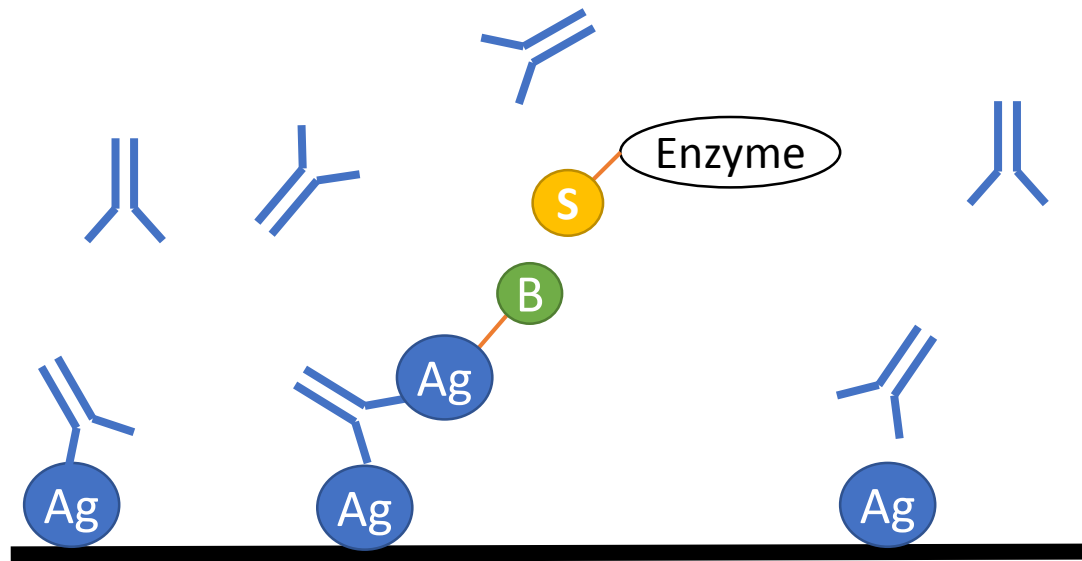
**$\rightarrow$  применимость (возможность для массового использования)**



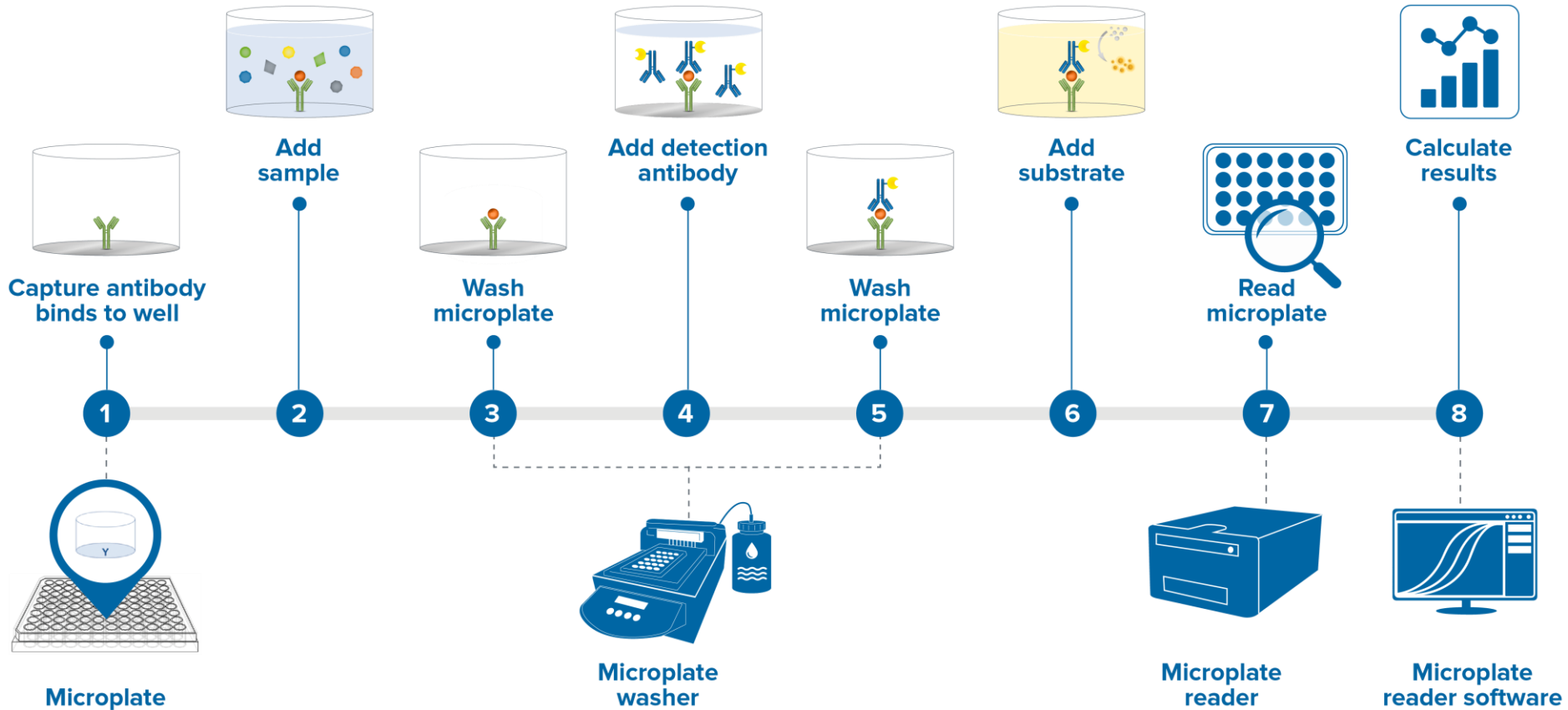
# Состав ИФА тест-системы



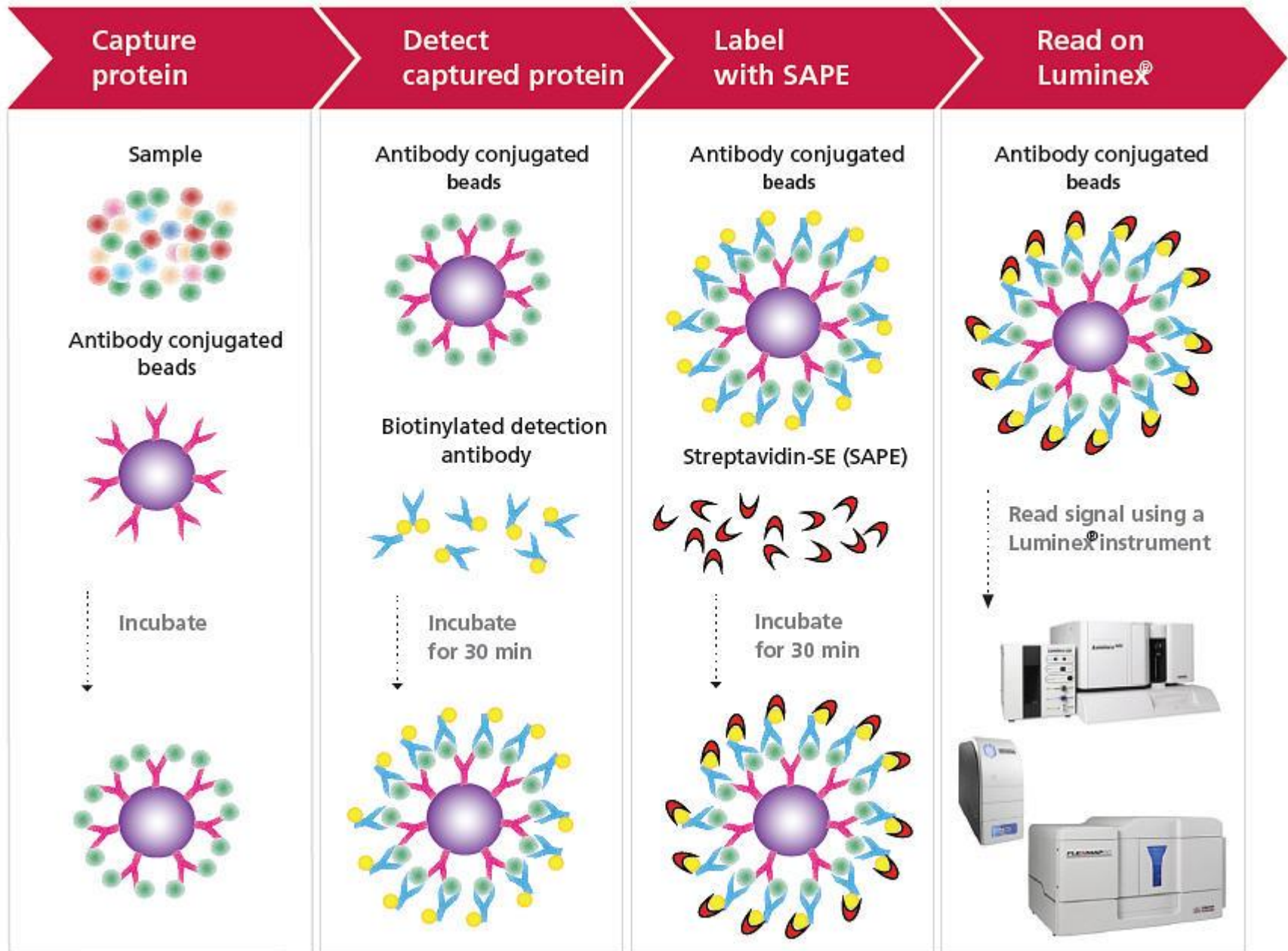
# Принцип ИФА тест-системы для выявления антител Биотин/стрептавидин



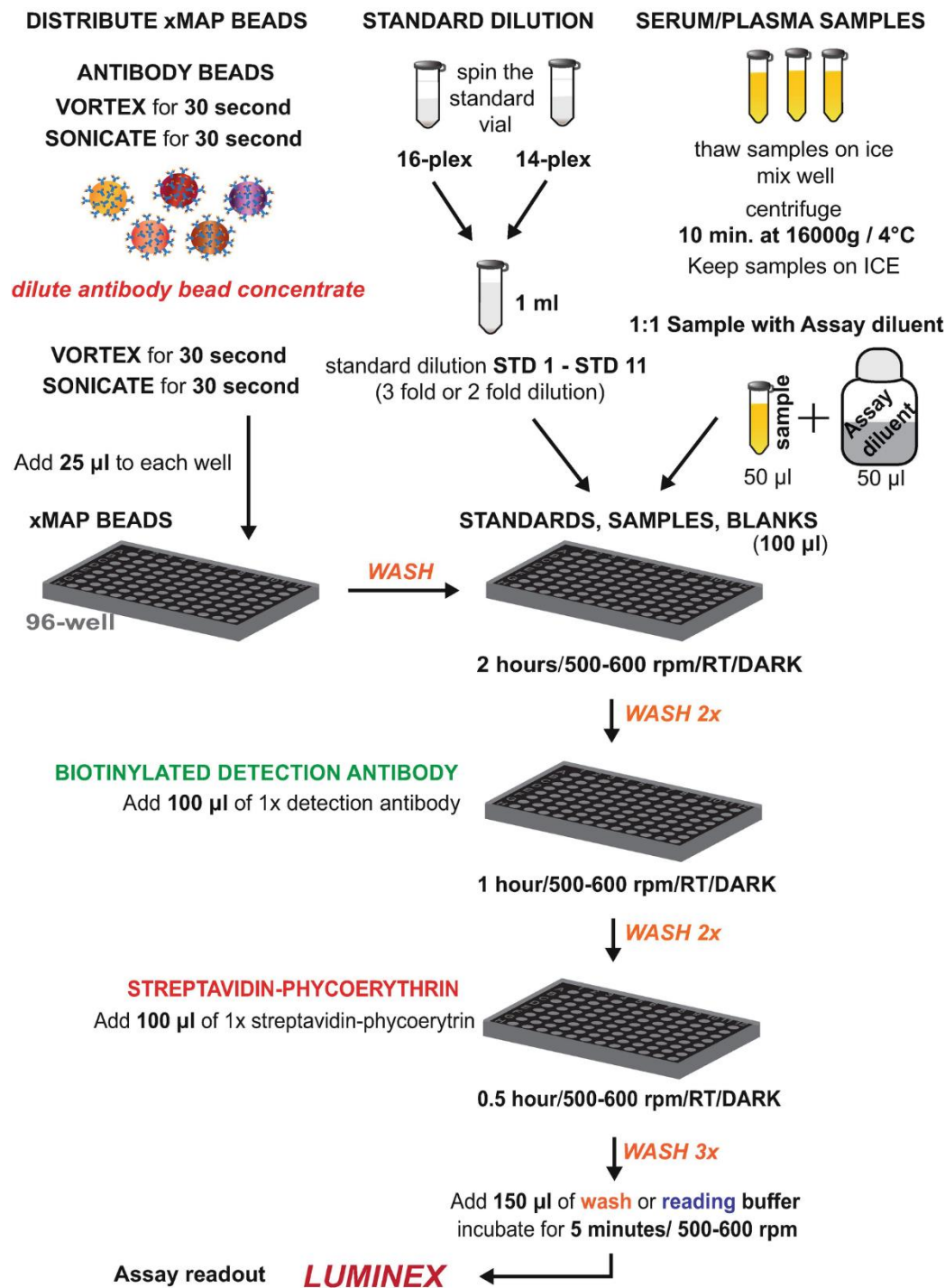
# Общая схема постановки ИФА



# Принцип действия ИФА LumineX



# Общая схема постановки на Luminex



# Реакция нейтрализации

## Титр антител

**Титр** – разведение сыворотки, которое защищает от заражения 50% или 100% клеток

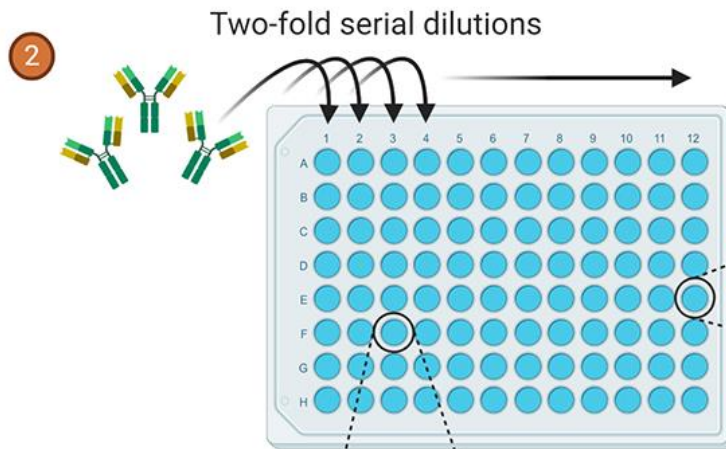
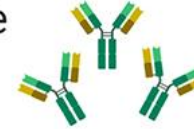
Может колебаться в зависимости от:

- состояния клеток
- дозы вируса
- дня учёта
- и др.

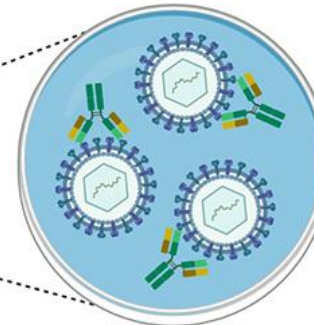
# Реакция нейтрализации

## Титр антител

- 1 Collect serum from immunized animal and heat inactivate (contains antibodies that neutralize virus infection)

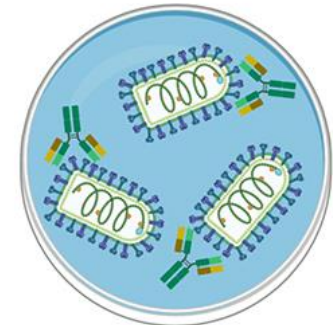


- 3 Add virus



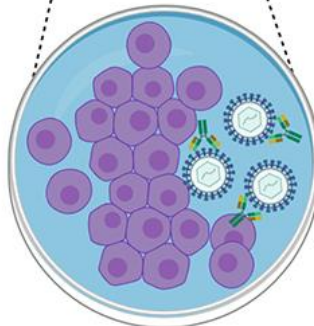
live SARS-CoV-2

or

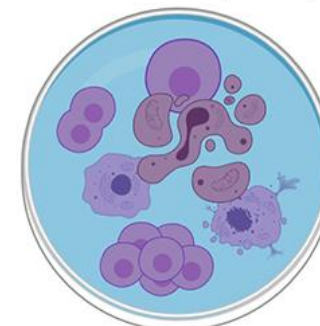


pseudovirus  
expressing spike

- 4 Add cells



- 5 Measure cytopathic effect (CPE)



- clumping
- inclusion bodies
- pyknosis
- syncytia
- swelling



# **Определение специфических белков иммунитета и патогенов**

# Цитокины

```
graph TD; A[Цитокины] --> B[провоспалительные]; A --> C[воспалительные]; A --> D[противовоспалительные (супрессорные)]; A --> E[регуляторные]; B --- B_desc[мобилизация воспалительного ответа]; B --- B_list[IL-17A, -18, -19, -20, -31, TWEAK]; C --- C_desc[воспаление]; C --- C_list[IL-1α, -1β, -6, -22, -23, TNFα]; D --- D_desc[ограничение развития воспаления]; D --- D_list[IL-10, -35]; E --- E_desc[регуляция иммунного ответа, поддержание гомеостаза и выживаемости клеток, активация пролиферации клеток]; E --- E_list[IL-1, -3-5, -7, -9, -11-16, -21 и др., TL1A и др.];
```

**провоспалительные**  
мобилизация  
воспалительного ответа

IL-17A, -18, -19, -20, -31  
TWEAK

**воспалительные**  
воспаление

IL-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , -6, -22, -23  
TNF $\alpha$

**противовоспалительные**  
(супрессорные)  
ограничение развития  
воспаления

IL-10, -35

**регуляторные**

регуляция иммунного ответа,  
поддержание гомеостаза и  
выживаемости клеток,  
активация пролиферации клеток

IL-1, -3-5, -7, -9, -11-16, -21 и др.  
TL1A и др.

# Интерфероны (ИФН)

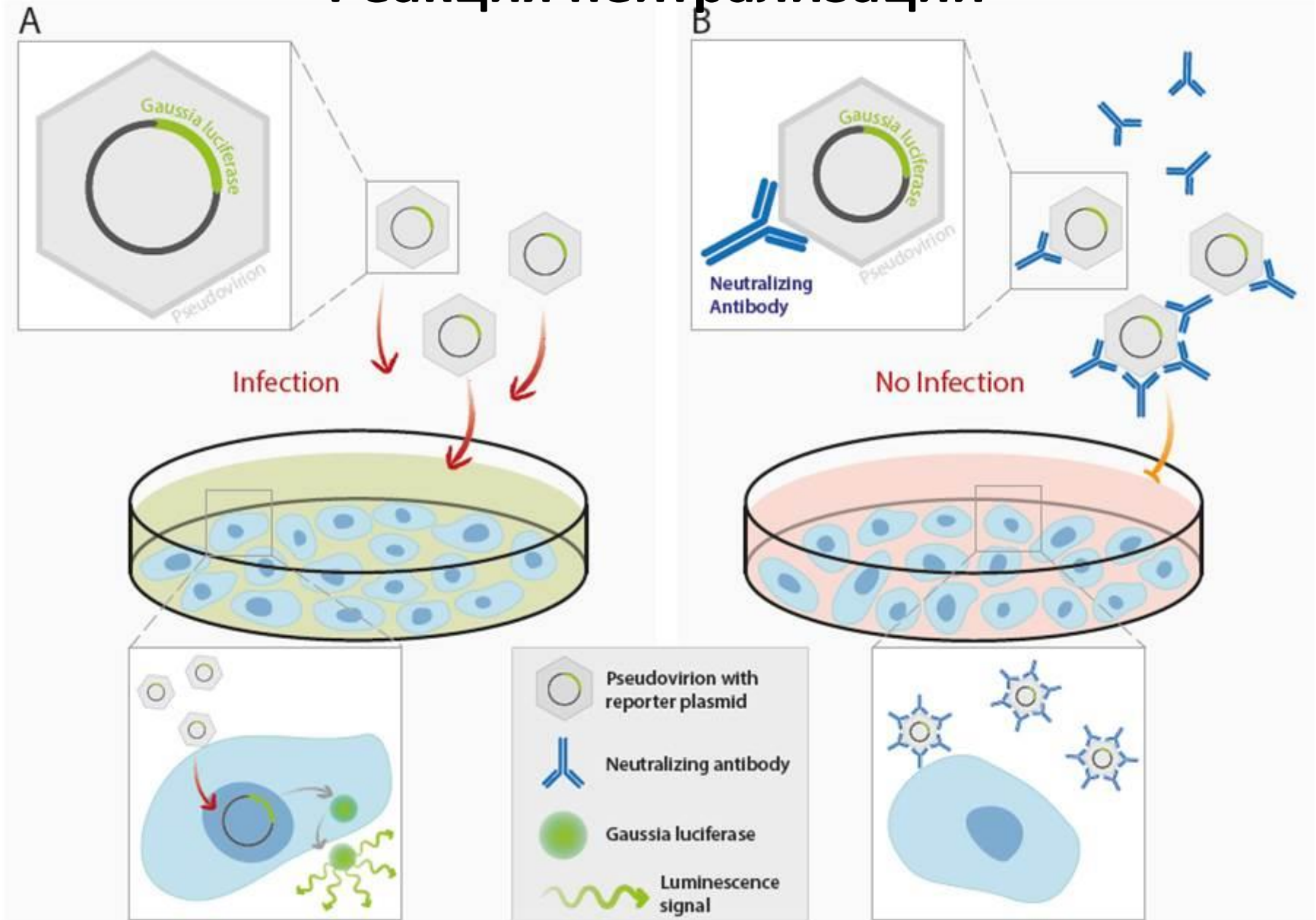
- группа сигнальных белков - цитокинов, высвобождаемых клетками в ответ на присутствие патогенов
- зараженная вирусом клетка высвобождает ИФН для перевода соседних клетки в т.н. «противовирусное состояние», чтобы повысить их противовирусную защиту – противовирусное состояние

**Интерфероны типа I:** IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\epsilon$ , - $\kappa$ , - $\omega$  – связываются с конкретным рецепторным комплексом на клеточной поверхности IFN- $\alpha/\beta$  (IFNAR) из цепей IFNAR1 и IFNAR2

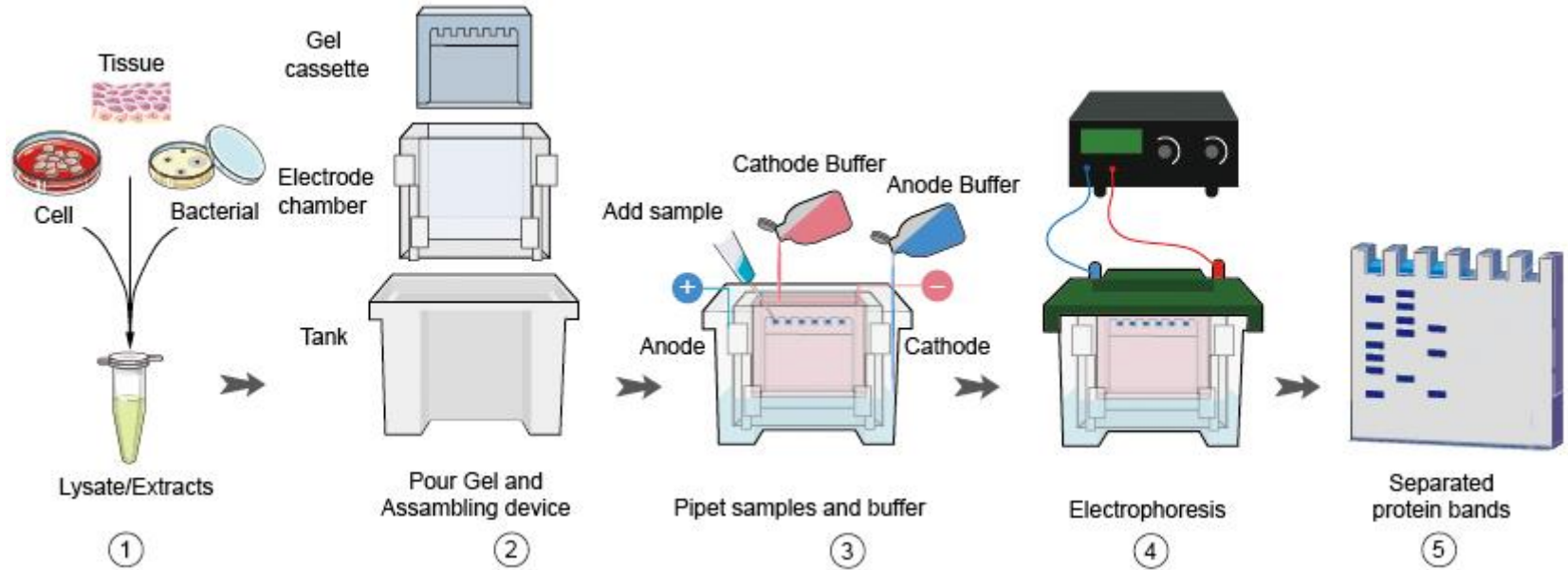
Экспрессия IFN типа I может индуцироваться практически во всех типах клеток

**Интерферон типа II (IFN- $\gamma$  у людей):** экспрессируются иммунными клетками (Т-, NK, DCs и др.), индуцируется цитокинами (IL-12)

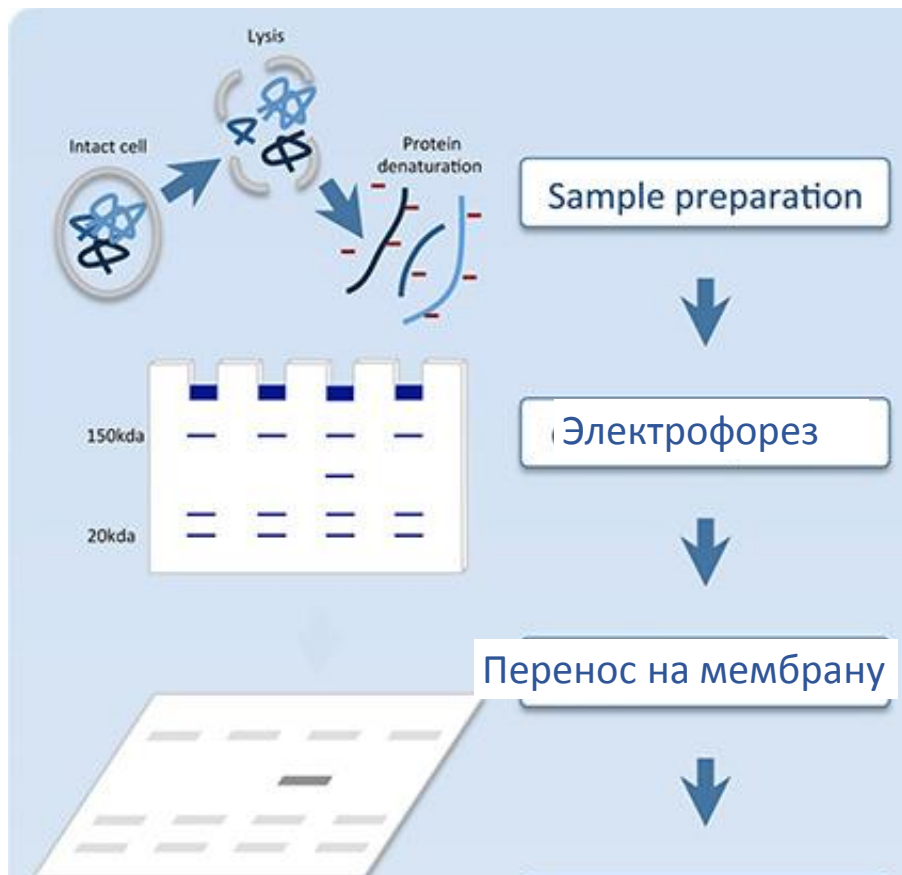
# Реакция нейтрализации



# Электрофорез в полиакриламидном геле с SDS

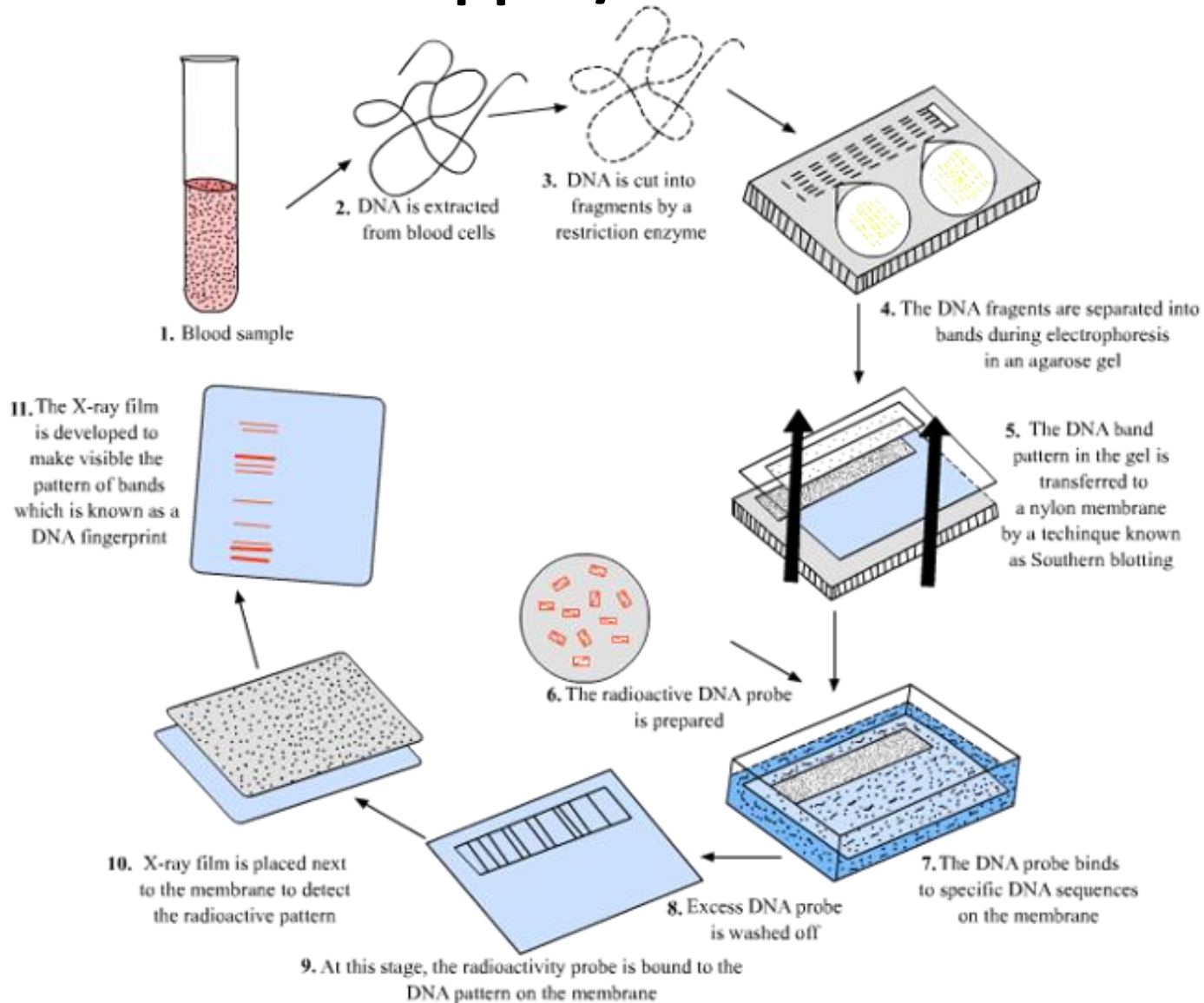


# Western blot



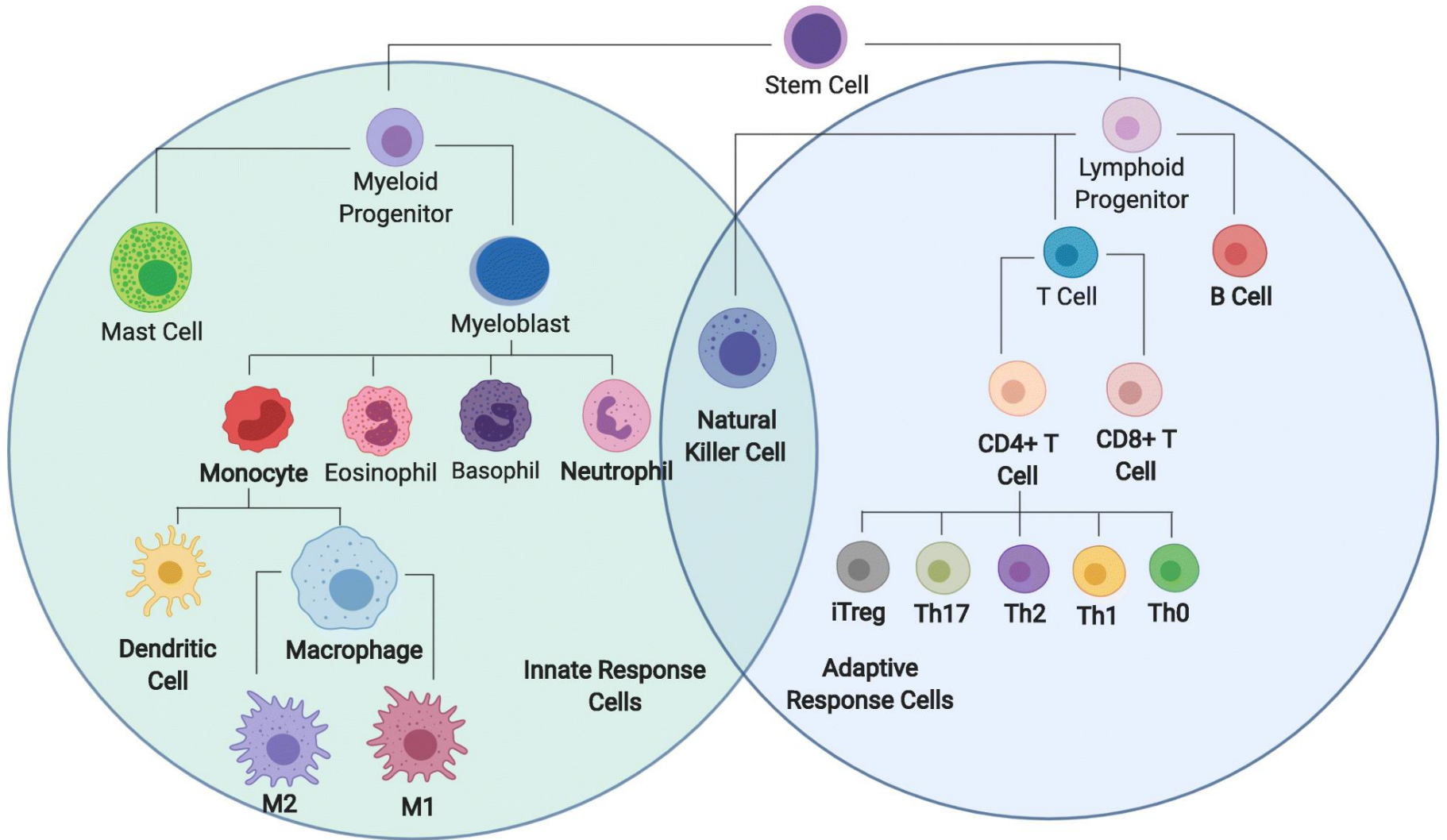
# Notthern/Southern blots

## ДНК/РНК



Steps in DNA fingerprinting technique

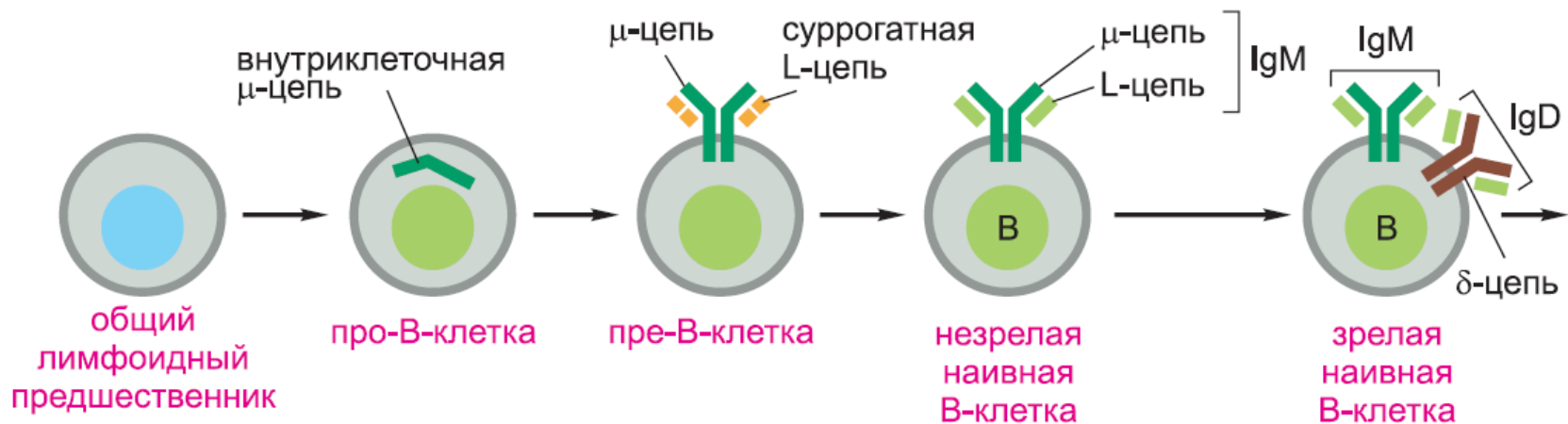
# Клетки иммунной системы



# Классы антител

IgA, IgD, IgE, IgG и IgM

каждому из них присущ свой собственный класс тяжелых цепей:  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ , соответственно



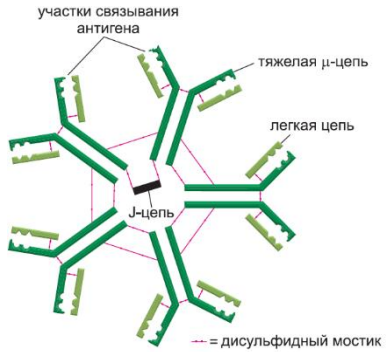
Развитие в костном мозге

Циркуляция по периферическим органам лимфатической системы

**IgM**, содержат тяжелые  $\mu$ -цепи, всегда синтезируются первыми в развивающихся В-клетках, хотя в конечном счете (когда их стимулирует антиген) многие В-клетки переключаются на производство антител других классов

**IgD** молекулы клеточной поверхности с таким же участком связывания антигена, что и у молекул IgM, почти не секретируются из клеток

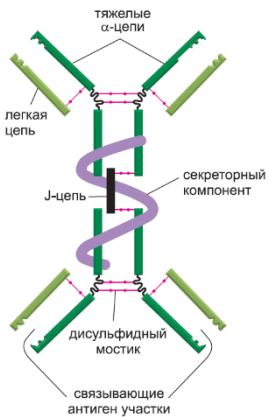
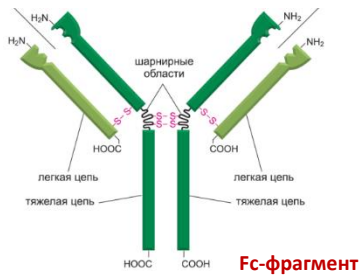
# Классы антител



## СВОЙСТВА

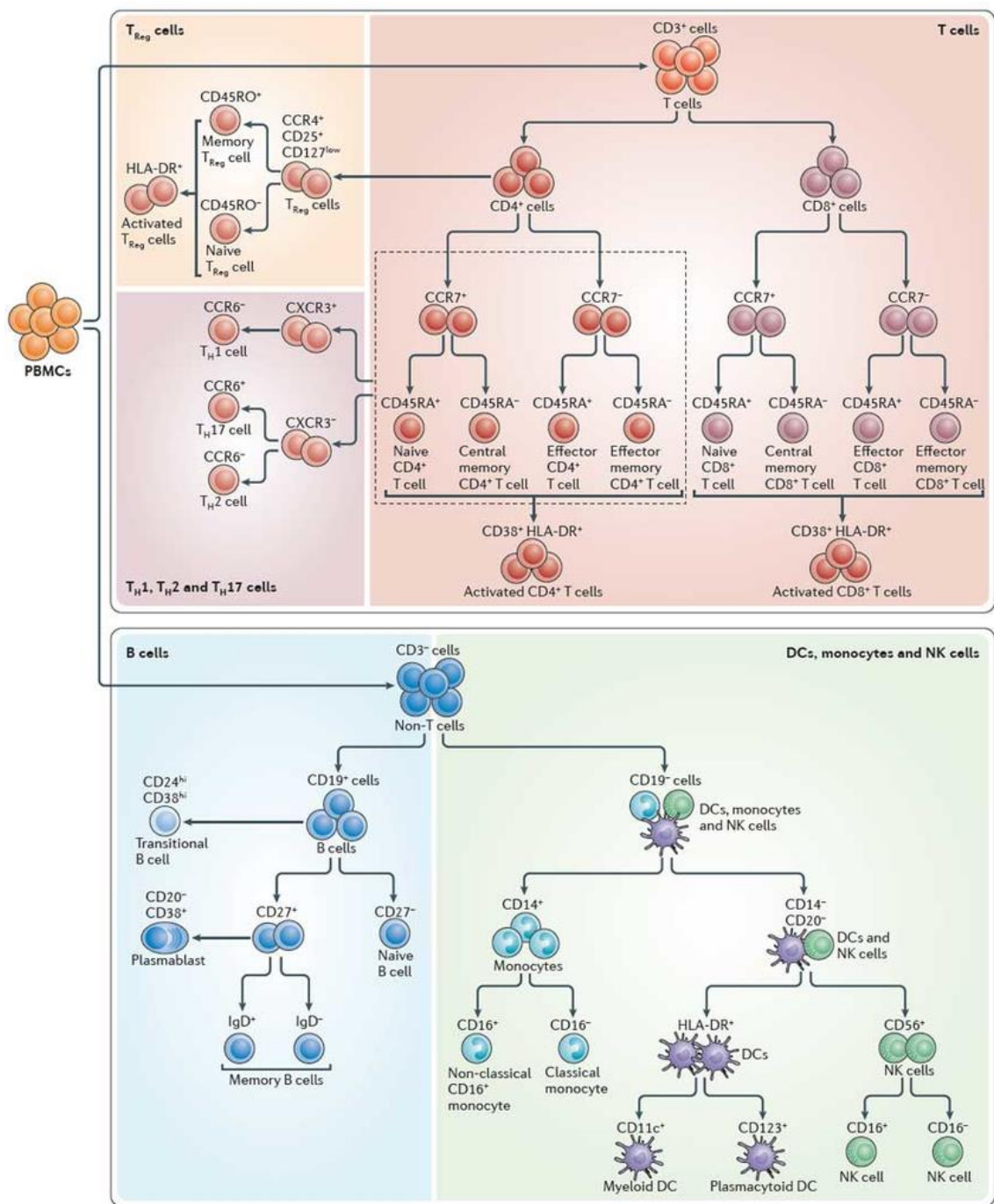
## КЛАСС АНТИТЕЛ

	IgM	IgD	IgG	IgA	IgE
Тяжелые цепи	$\mu$	$\delta$	$\gamma$	$\alpha$	$\epsilon$
Легкие цепи	$\kappa$ или $\lambda$	$\kappa$ или $\lambda$	$\kappa$ или $\lambda$	$\kappa$ или $\lambda$	$\kappa$ или $\lambda$
Число четырехцепочечных единиц	5	1	1	1 или 2	1
Процентная доля от общего числа Ig крови	10	<1	75	15	<1
Активация системы комплемента	++++	–	++	–	–
Прохождение плацентарного барьера	–	–	+	–	–
Связывание с макрофагами и нейтрофилами	–	–	+	–	–
Связывание с тучными клетками и базофилами	–	–	–	–	+

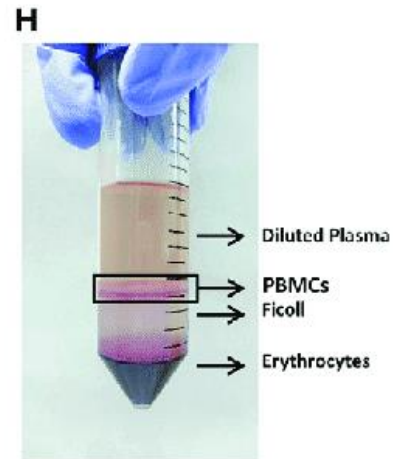


# Современные методы анализа гуморального и клеточного иммунитета

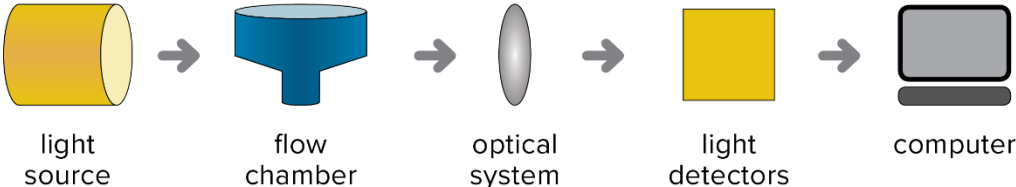
1. Цитокины и интерфероны – ИФА сыворотки крови
2. Анализ выработки антител различных классов в сыворотке крови – определяют в реакции преципитации в геле с антиглобулиновыми сыворотками
3. Общее и относительное число лимфоцитов и других иммунных клеток – ОАК
4. Фагоцитарная активность лейкоцитов – количество фагоцитирующих клеток и фагоцитарный показатель, то есть среднее количество микробных клеток, поглощенных одним лейкоцитом
5. Содержание клеток с различными CD на поверхности – проточная цитометрия (используются меченые моноклональные флюоресцирующие сыворотки к специфическим поверхностным антигенным маркерам CD)
  - рецептор CD3 — рецептор всех Т-лимфоцитов
  - рецепторы CD19, CD20, CD21, CD72 — рецептор В-лимфоцитов
  - рецептор CD4 — рецептор Т-хелперов
  - рецептор CD8 — рецептор Т-киллеров
  - рецептор CD16 — рецептор NK-клеток (натуральных киллеров)
  - Базовая – по различным CD
  - Специфическая – активация моноцитов периферической крови (peripheral blood monocyctic cells, PBMC) *ex vivo* с последующим анализом популяций



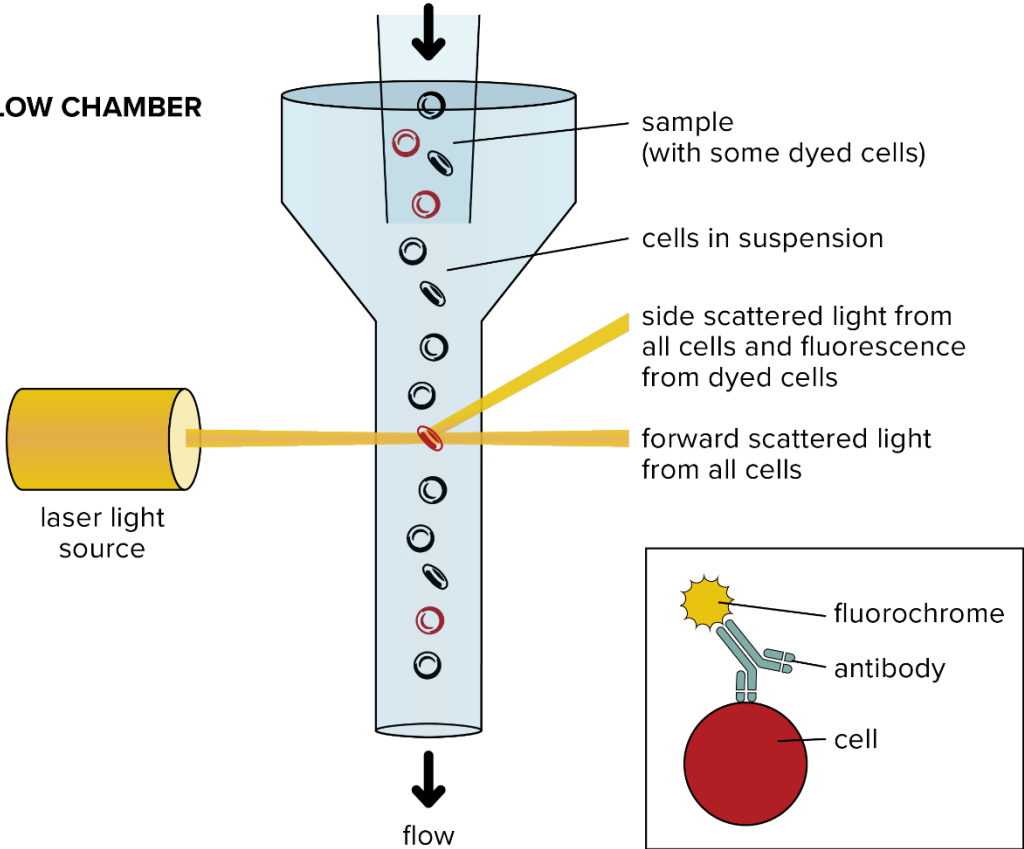
# Выделение РВМС (peripheral blood mononuclear cells, МОНОЦИТОВ периферической крови)



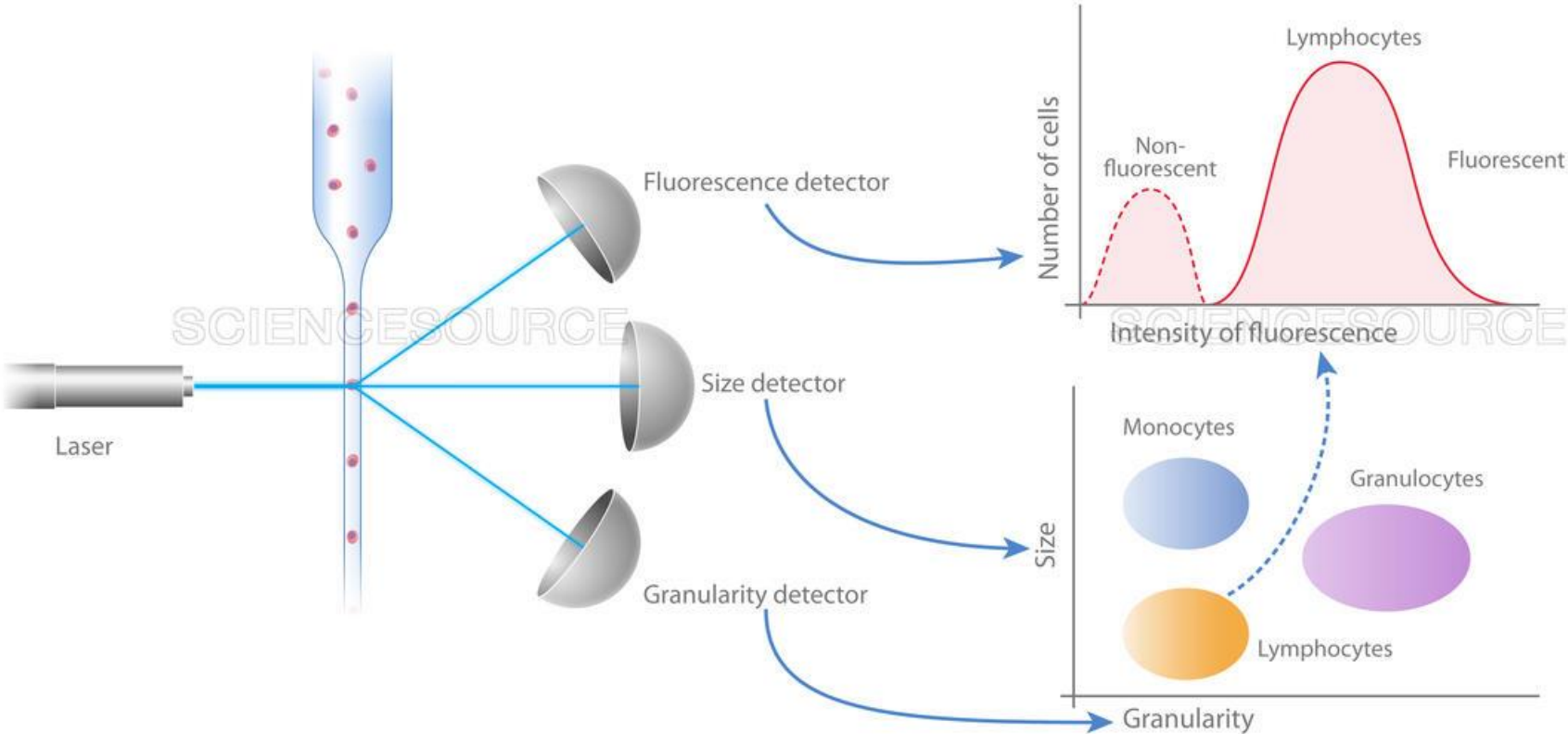
# Проточная цитометрия



## FLOW CHAMBER



# Проточная цитометрия

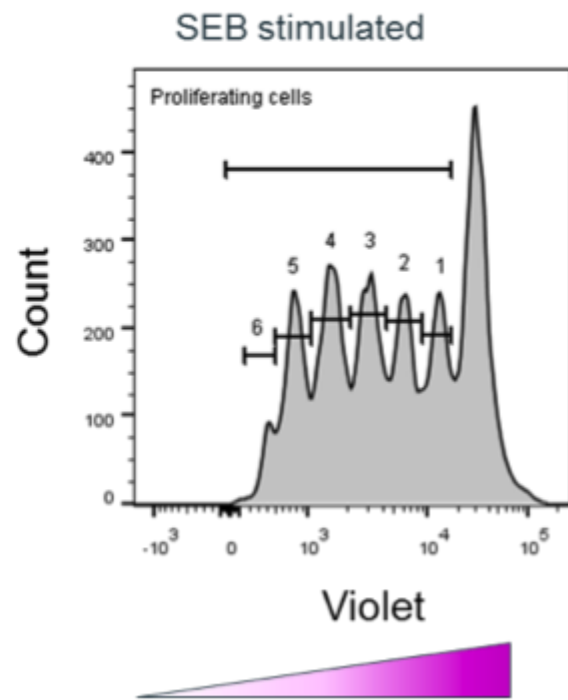
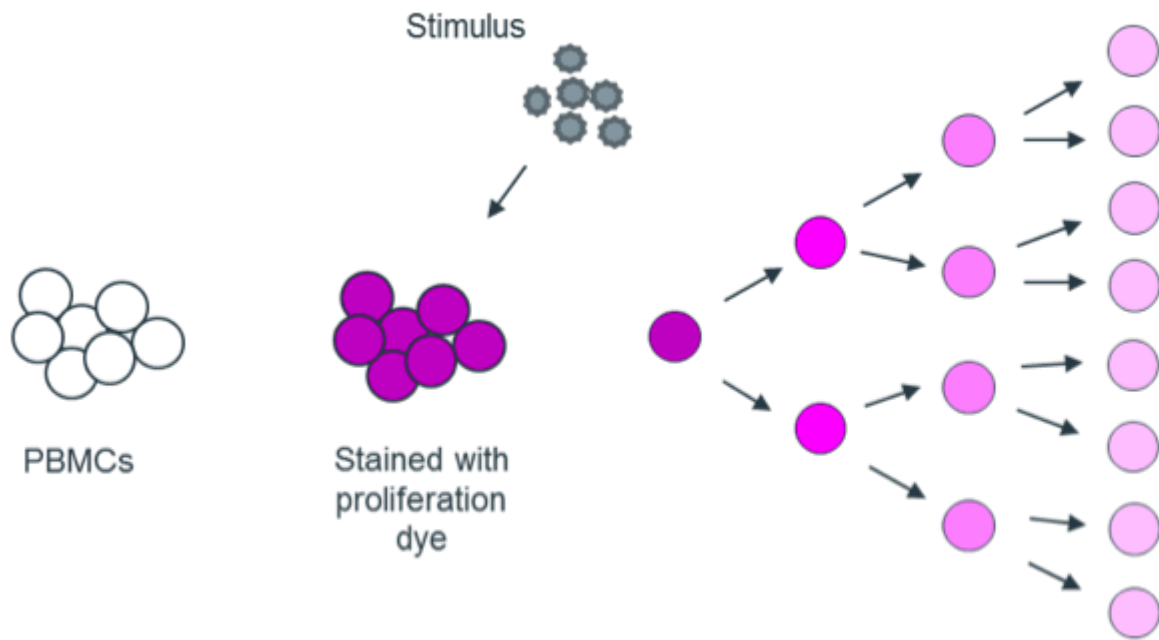


OURCE

SCIENCESSOURCE

SCIEN

# Пролиферация РВМС в присутствии специфического антигена



# Современные методы анализа гуморального и клеточного иммунитета

1. Цитокины и интерфероны – ИФА сыворотки крови
2. Анализ выработки антител различных классов в сыворотке крови – определяют в реакции преципитации в геле с антиглобулиновыми сыворотками
3. Общее и относительное число лимфоцитов и других иммунных клеток – ОАК
4. Фагоцитарная активность лейкоцитов – количество фагоцитирующих клеток и фагоцитарный показатель, то есть среднее количество микробных клеток, поглощенных одним лейкоцитом
5. Содержание клеток с различными CD на поверхности – проточная цитометрия (используются меченые моноклональные флюоресцирующие сыворотки к специфическим поверхностным антигенным маркерам CD)
  - рецептор CD3 — рецептор всех Т-лимфоцитов
  - рецепторы CD19, CD20, CD21, CD72 — рецептор В-лимфоцитов
  - рецептор CD4 — рецептор Т-хелперов
  - рецептор CD8 — рецептор Т-киллеров
  - рецептор CD16 — рецептор NK-клеток (натуральных киллеров)
  - Базовая – по различным CD
  - Специфическая – активация моноцитов периферической крови (peripheral blood monocyctic cells, PBMC) *ex vivo* с последующим анализом популяций