

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

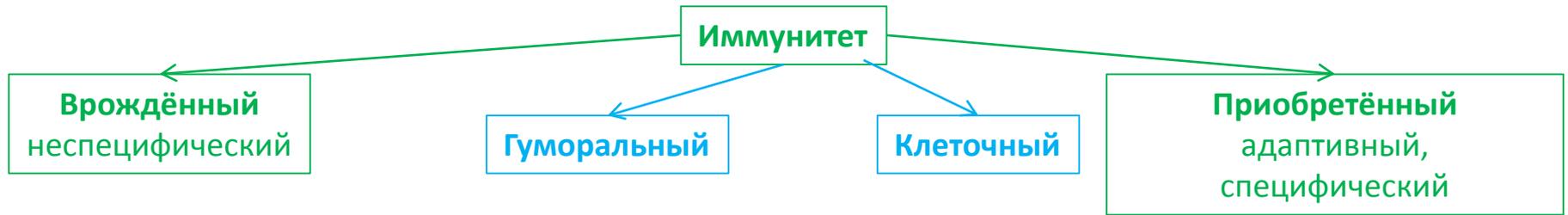
Диагностика

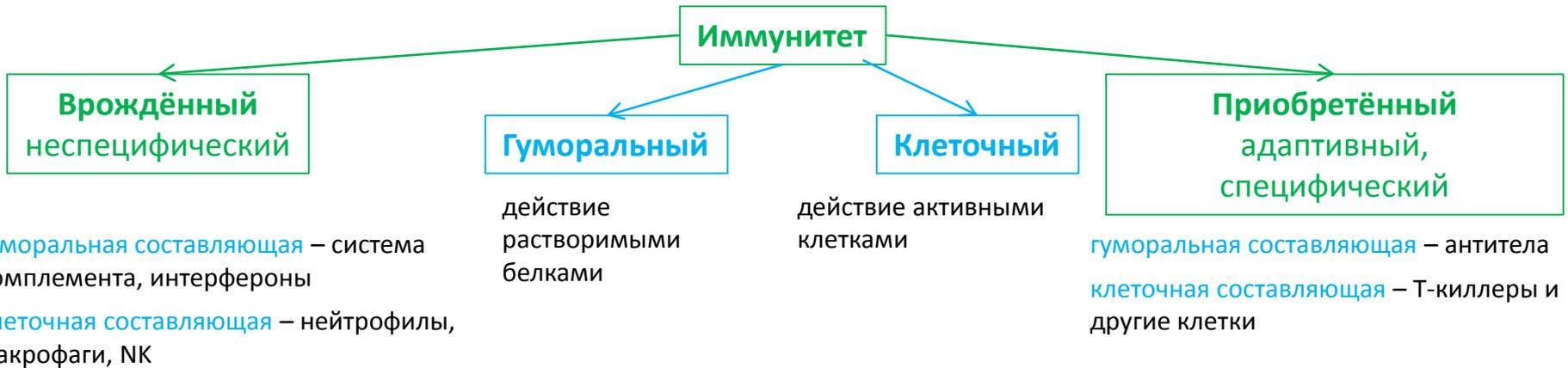
```
graph TD; A[Диагностика] --> B[Иммунный ответ]; A --> C[Антигены возбудителей];
```

Иммунный ответ

**Антигены
возбудителей**

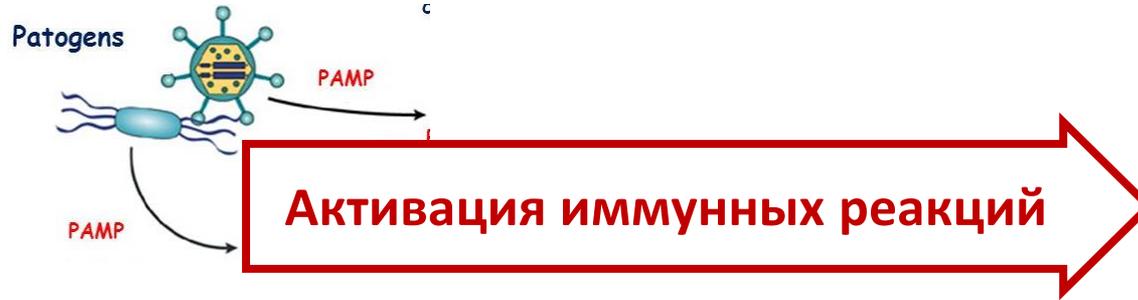
Что в иммунитете можно измерить?





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)

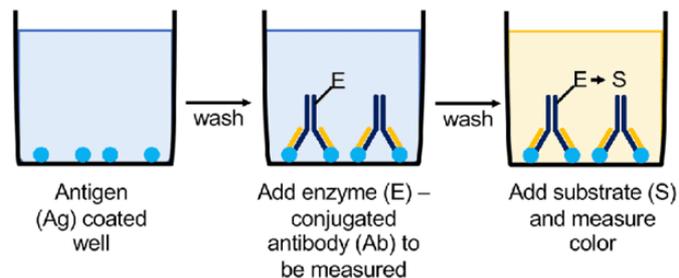
ИФА

Иммуноферментный анализ

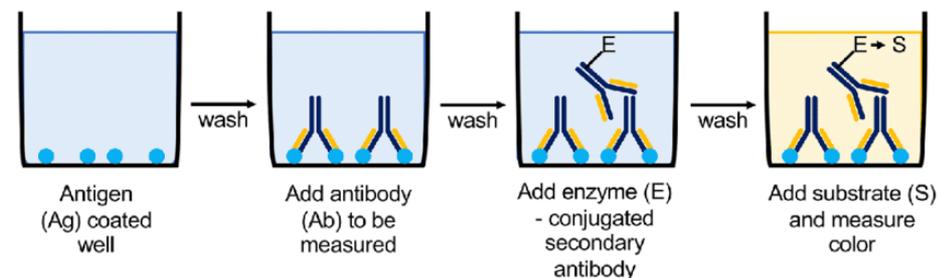
ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay

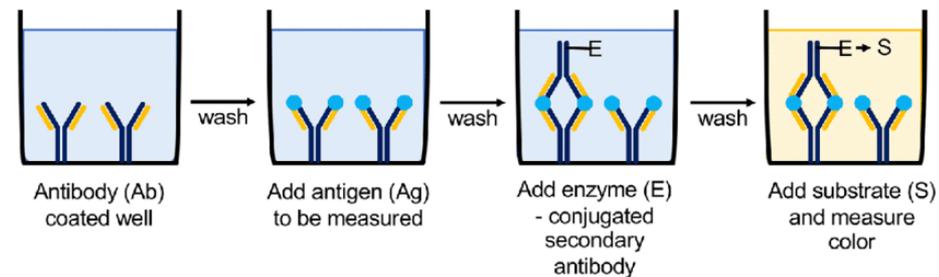
(a) Direct ELISA



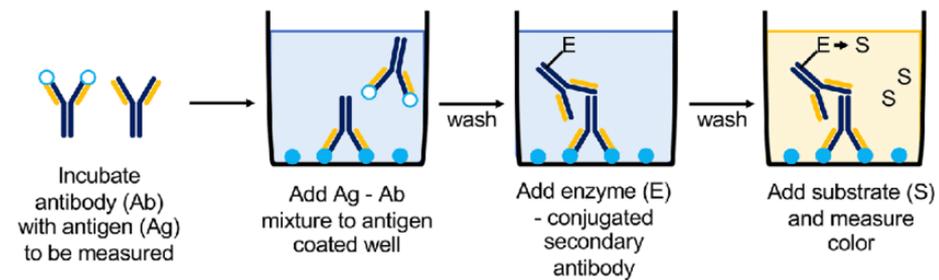
(b) Indirect ELISA



(c) Sandwich ELISA



(d) Competitive ELISA



ИФА

Иммуноферментный анализ

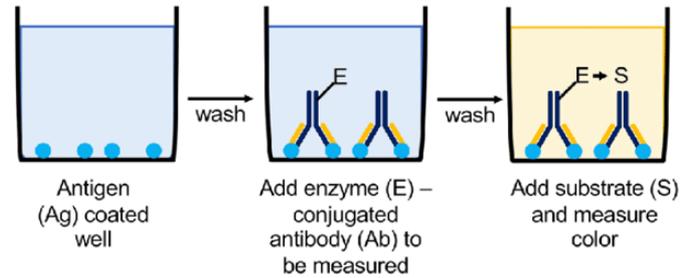
Что можно определять

каким методом?

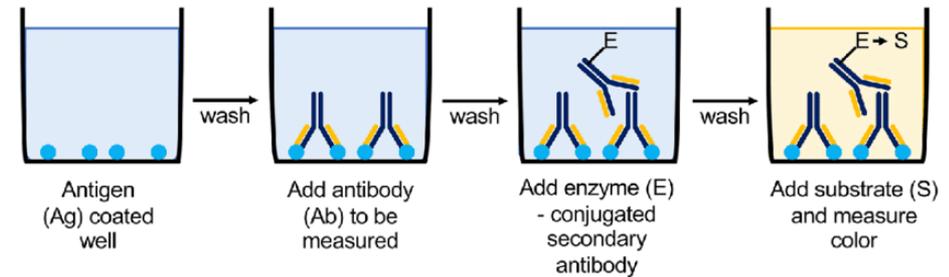
Антиген?

Антитела?

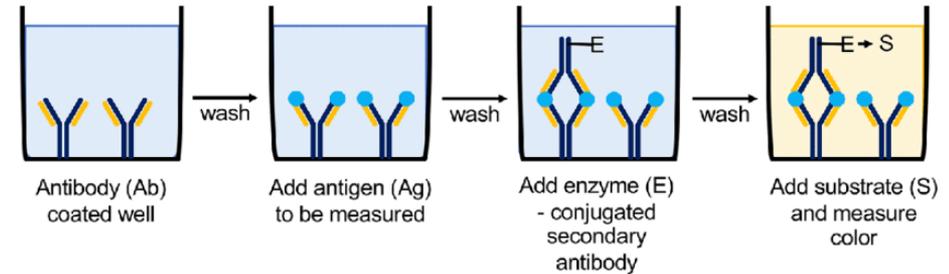
(a) Direct ELISA



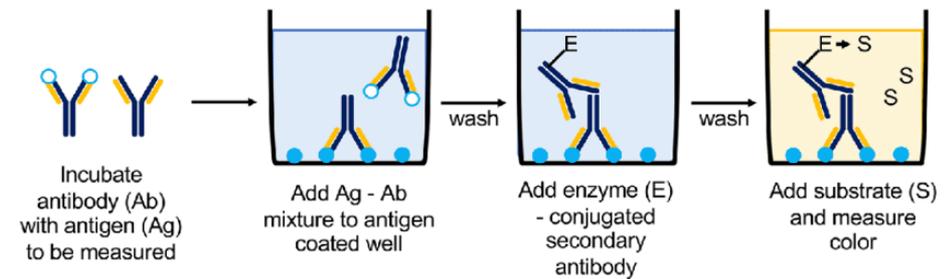
(b) Indirect ELISA



(c) Sandwich ELISA



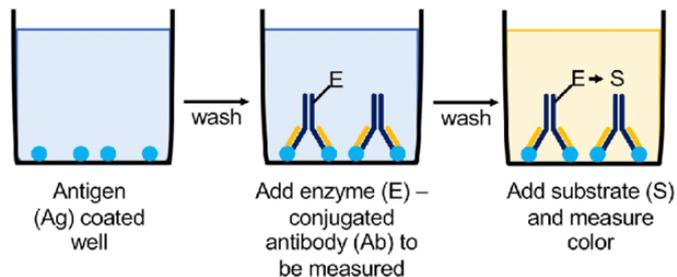
(d) Competitive ELISA



ИФА

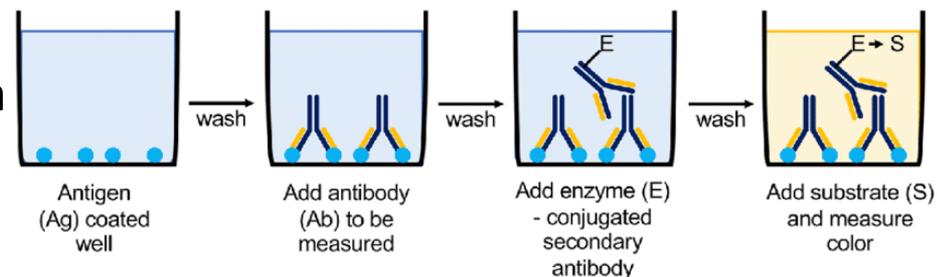
Иммуноферментный анализ

Антиген



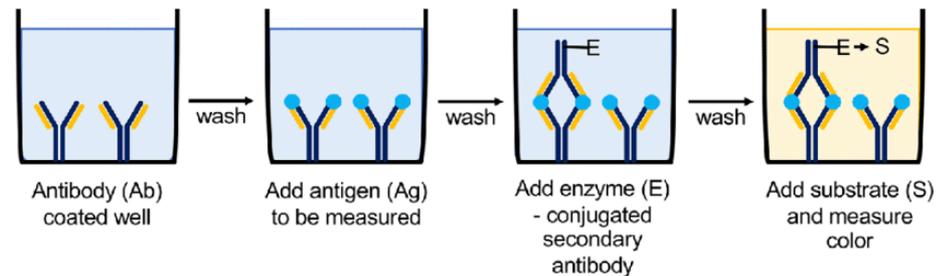
(b) Indirect ELISA

Антитела



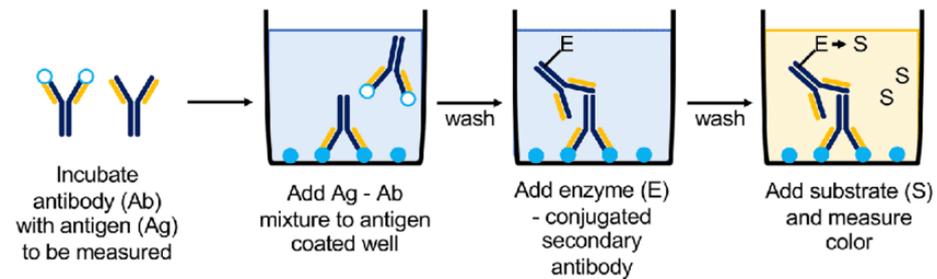
(c) Sandwich ELISA

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 (≈ 0)
- увеличение силы детектируемого сигнала – ОП полож/ОП отр \rightarrow max

\rightarrow производительность (цена/результат)

\rightarrow применимость (возможность для массового использования)

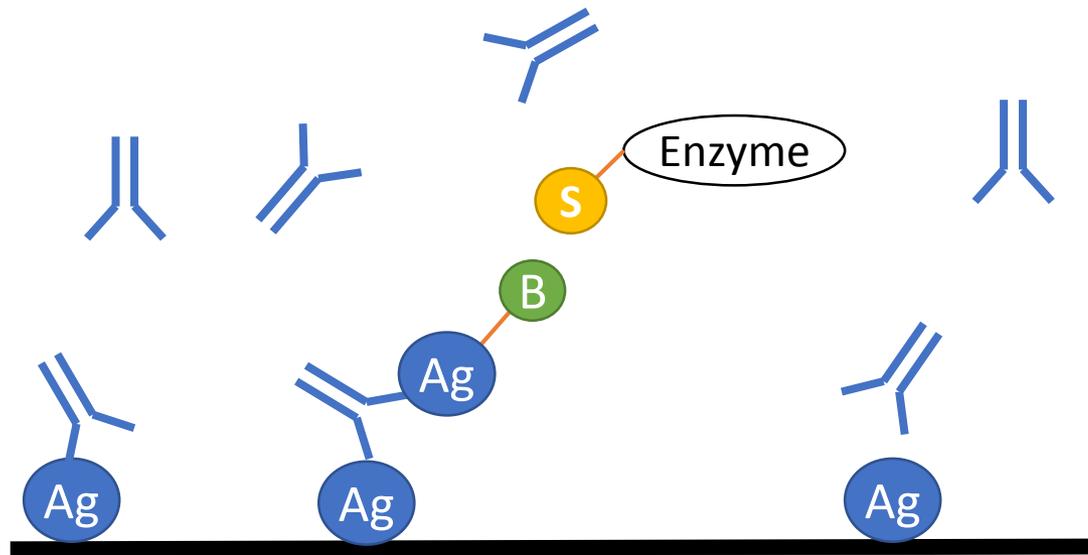
Состав ИФА тест-системы (непрямая)



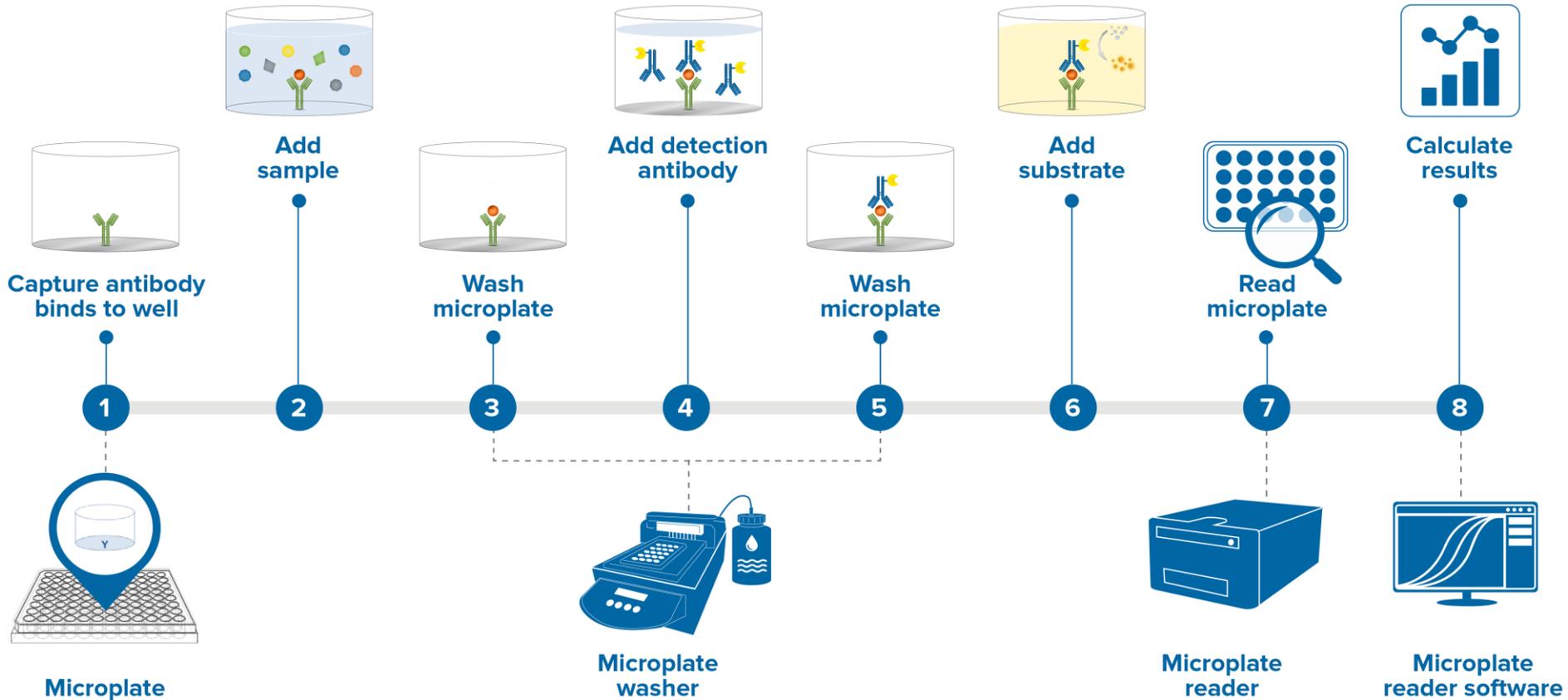
Состав ИФА тест-системы



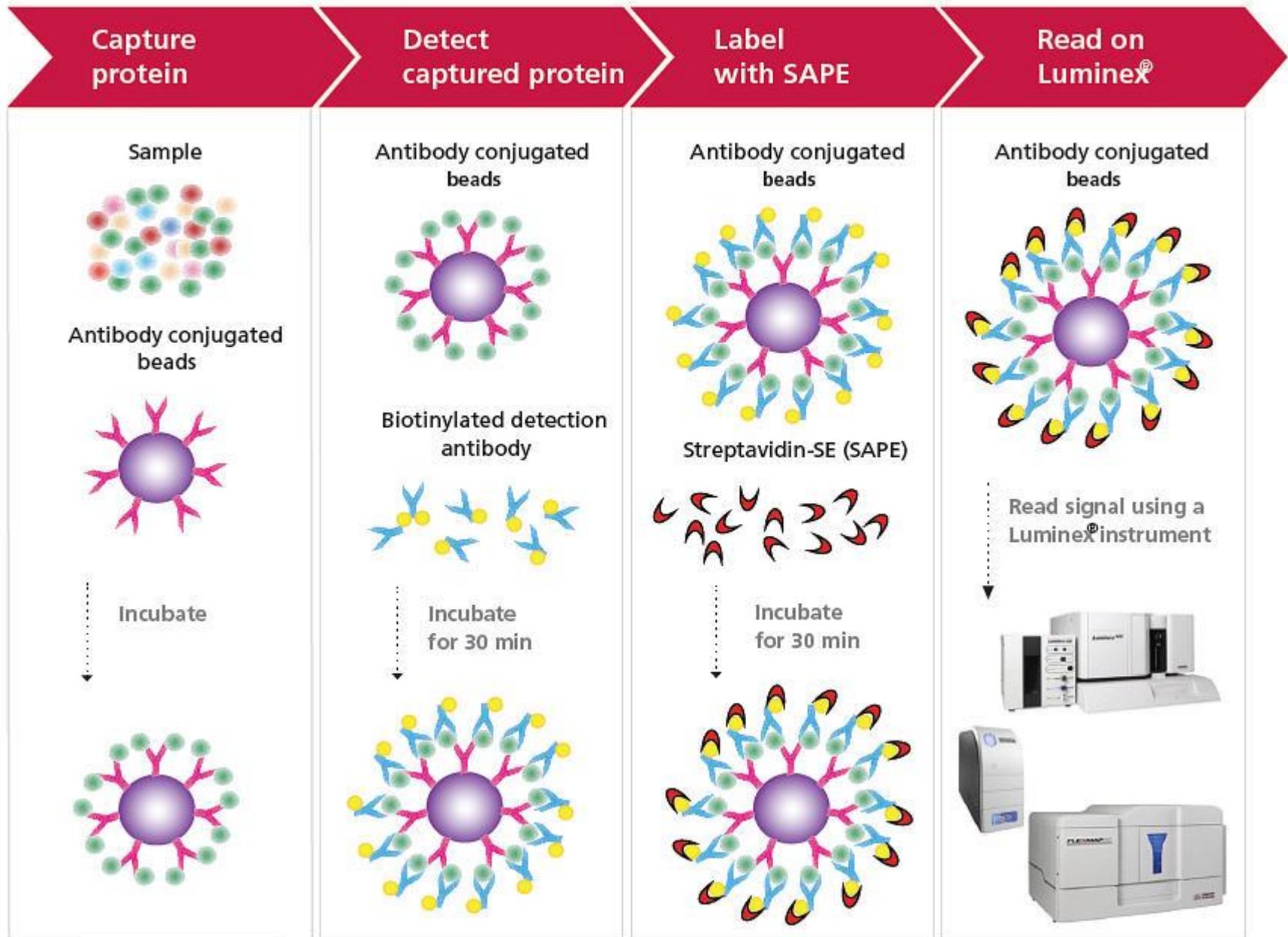
Принцип ИФА тест-системы для выявления антител Биотин/стрептавидин



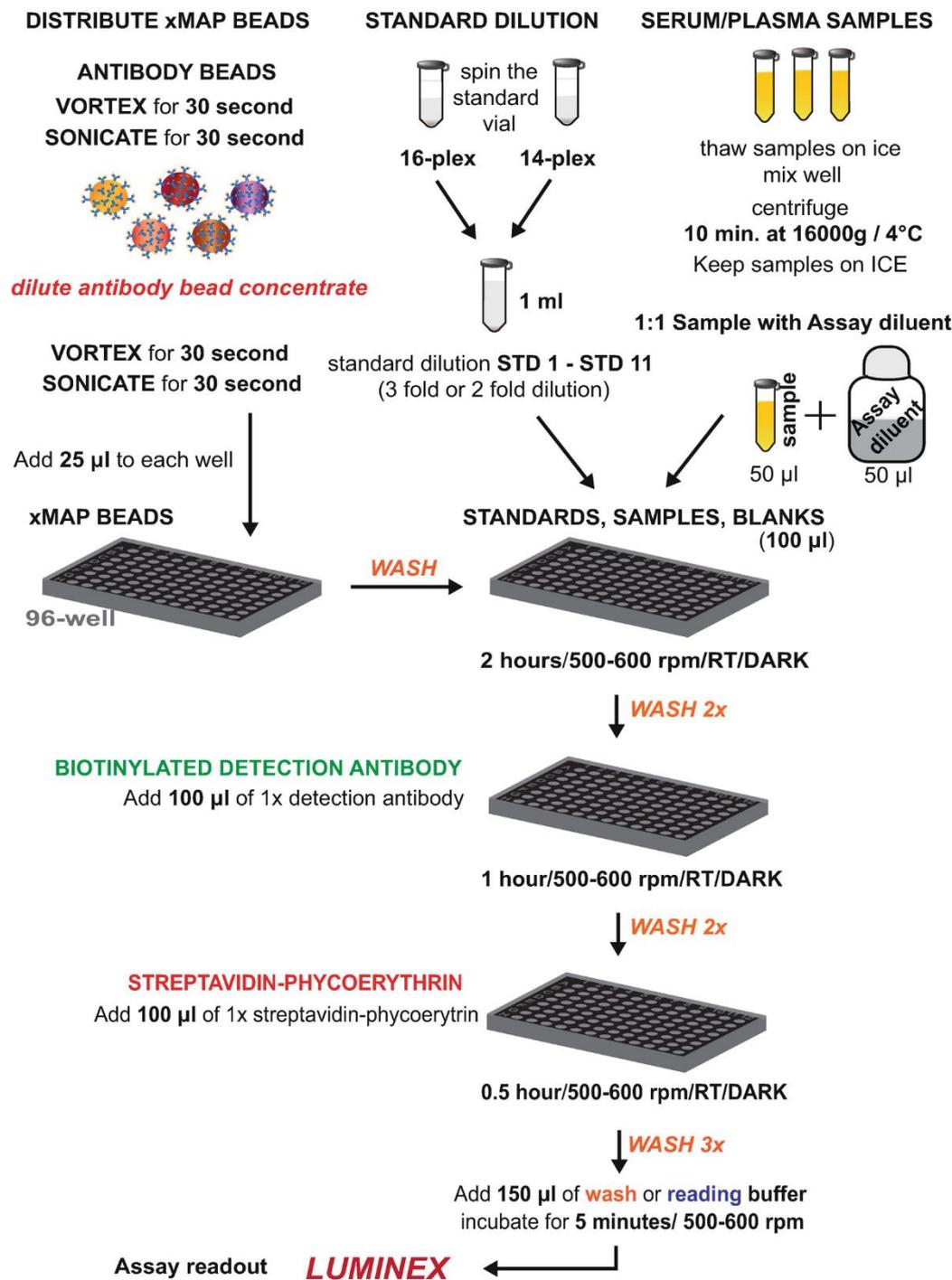
Общая схема постановки ИФА



Принцип действия ИФА LumineX



Общая схема постановки на Luminex



Реакция нейтрализации

Титр антител

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

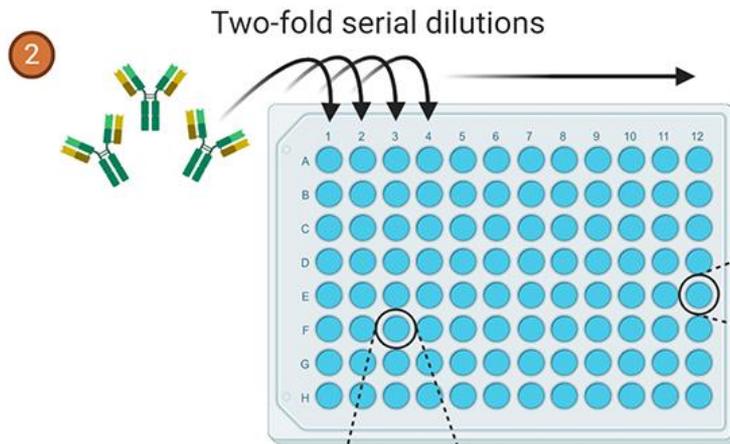
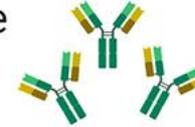
Может колебаться в зависимости от:

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

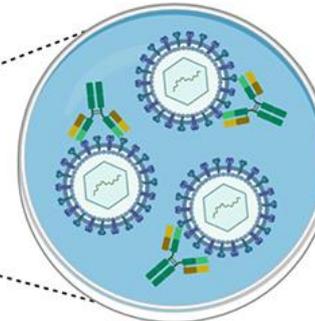
Реакция нейтрализации

Титр антител

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

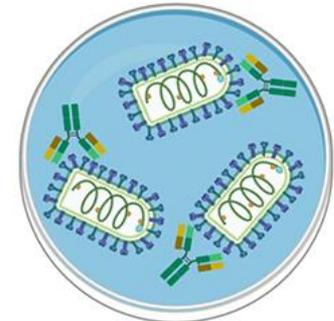


- 3 Add virus



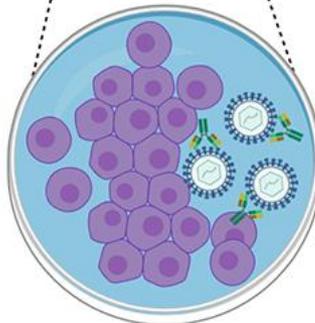
live SARS-CoV-2

or

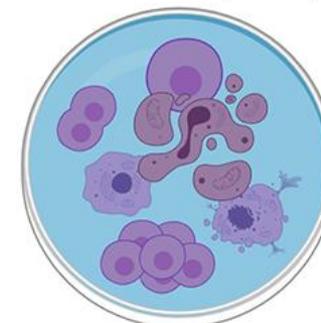


pseudovirus
expressing spike

- 4 Add cells



- 5 Measure cytopathic effect (CPE)



- clumping
- inclusion bodies
- pyknosis
- syncytia
- swelling

Сыворотка 1

Сыворотка 2

Сыворотка 3

Сыворотка 4

Заражённые
клетки

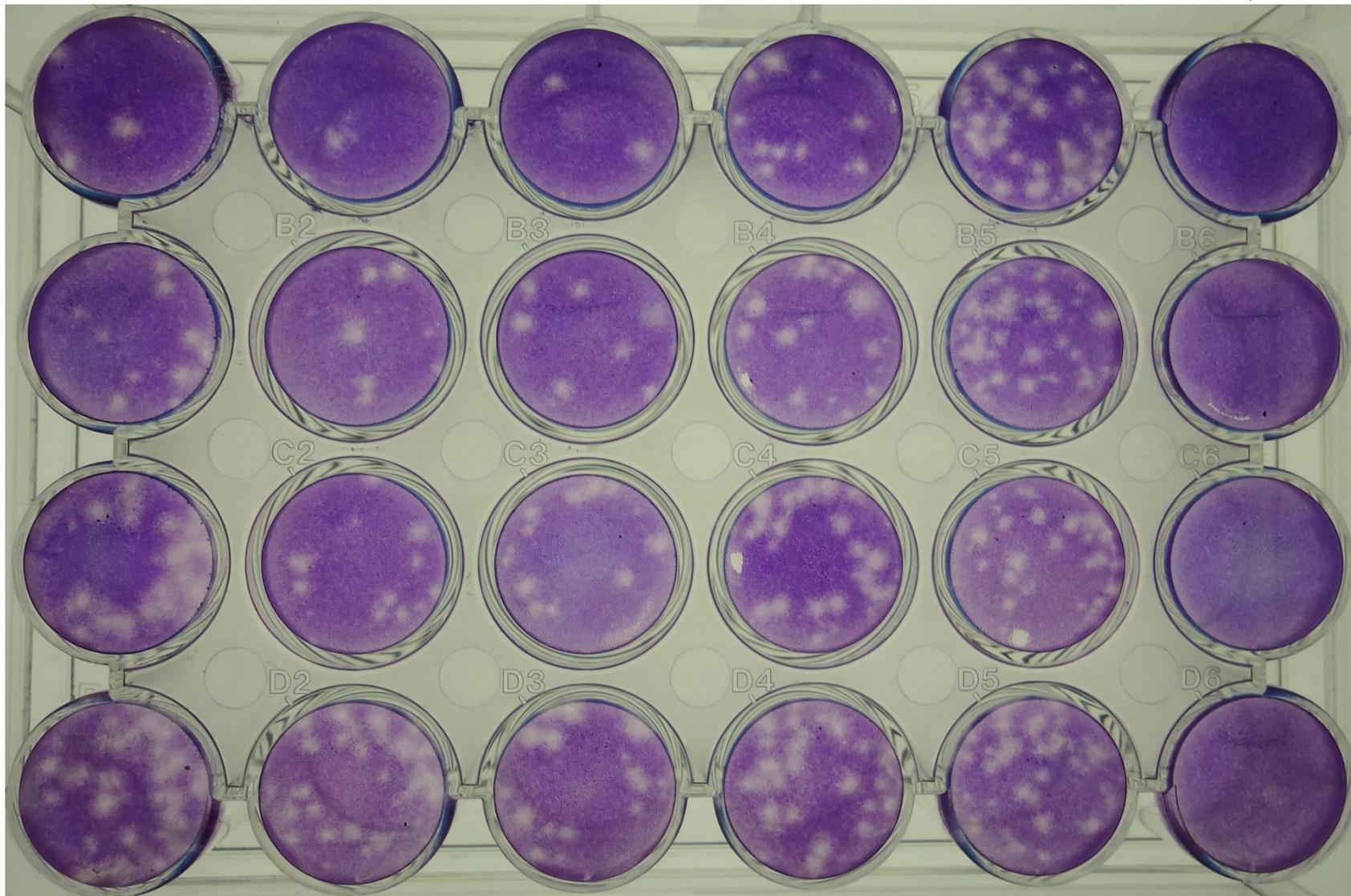
Незаражённые
клетки

1:8

1:16

1:32

1:64



Определение специфических белков иммунитета и патогенов

Цитокины

```
graph TD; C[Цитокины] --> P[провоспалительные]; C --> W[воспалительные]; C --> A[противовоспалительные]; C --> R[регуляторные];
```

провоспалительные
мобилизация
воспалительного ответа

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

воспалительные
воспаление

IL-1 α , -1 β , -6, -22, -23
TNF α

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)

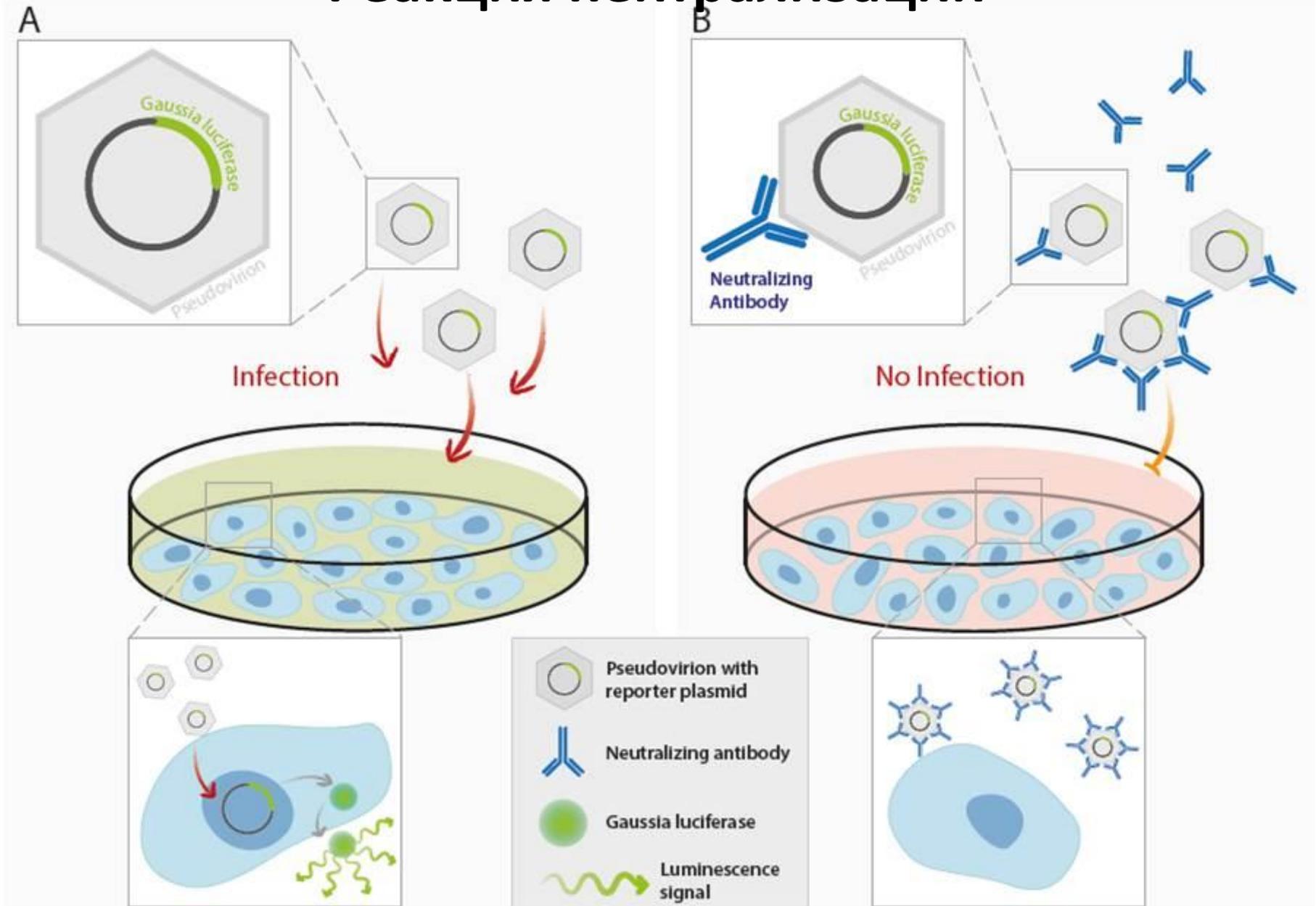
- группа сигнальных белков - цитокинов, высвобождаемых клетками в ответ на присутствие патогенов
- зараженная вирусом клетка высвобождает ИФН для перерождения соседних клеток в т.н. «противовирусное состояние», чтобы повысить их противовирусную защиту – противовирусное состояние

Интерфероны типа I: IFN- α , - β , - ϵ , - κ , - ω – связываются с конкретным рецепторным комплексом на клеточной поверхности IFN- α/β (IFNAR) из цепей IFNAR1 и IFNAR2

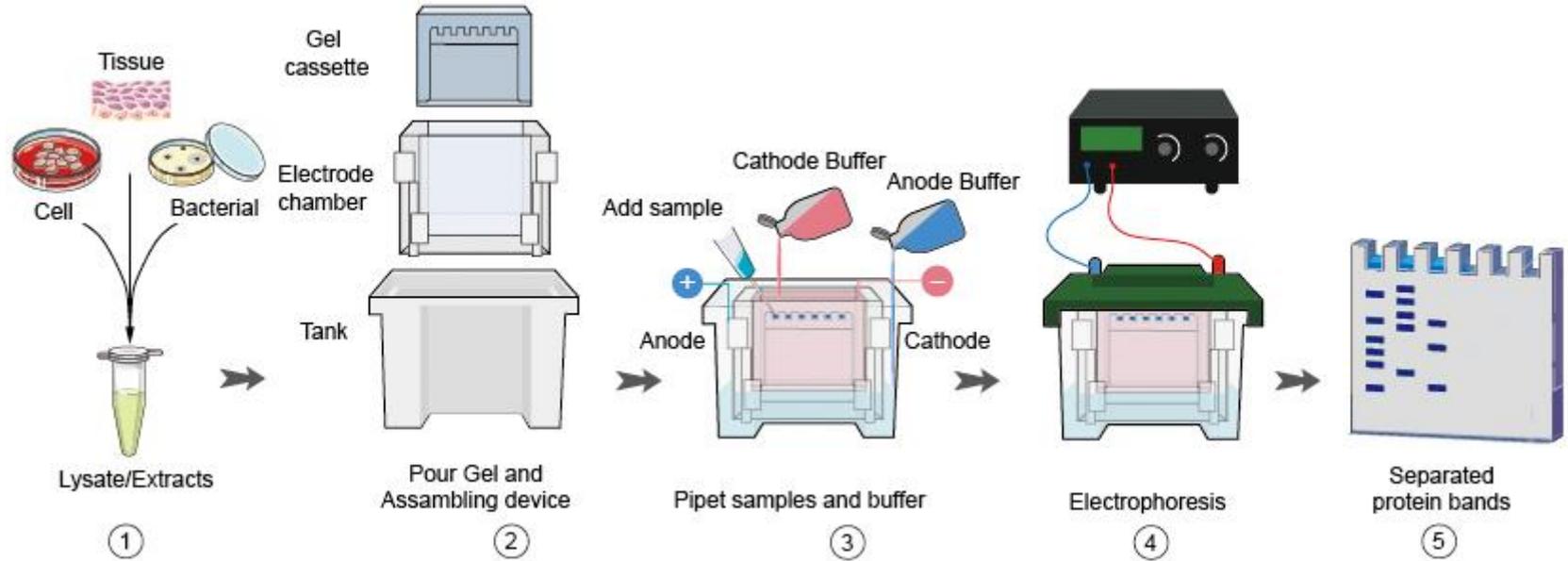
Экспрессия IFN типа I может индуцироваться практически во всех типах клеток

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

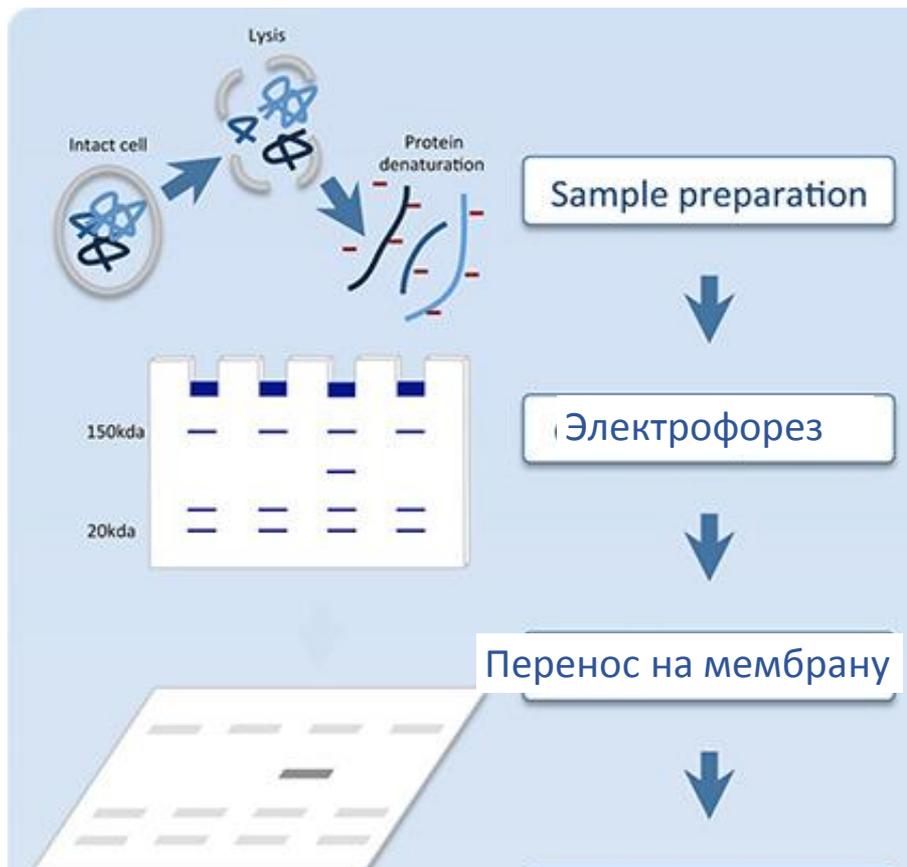
Реакция нейтрализации



Электрофорез в полиакриламидном геле с SDS

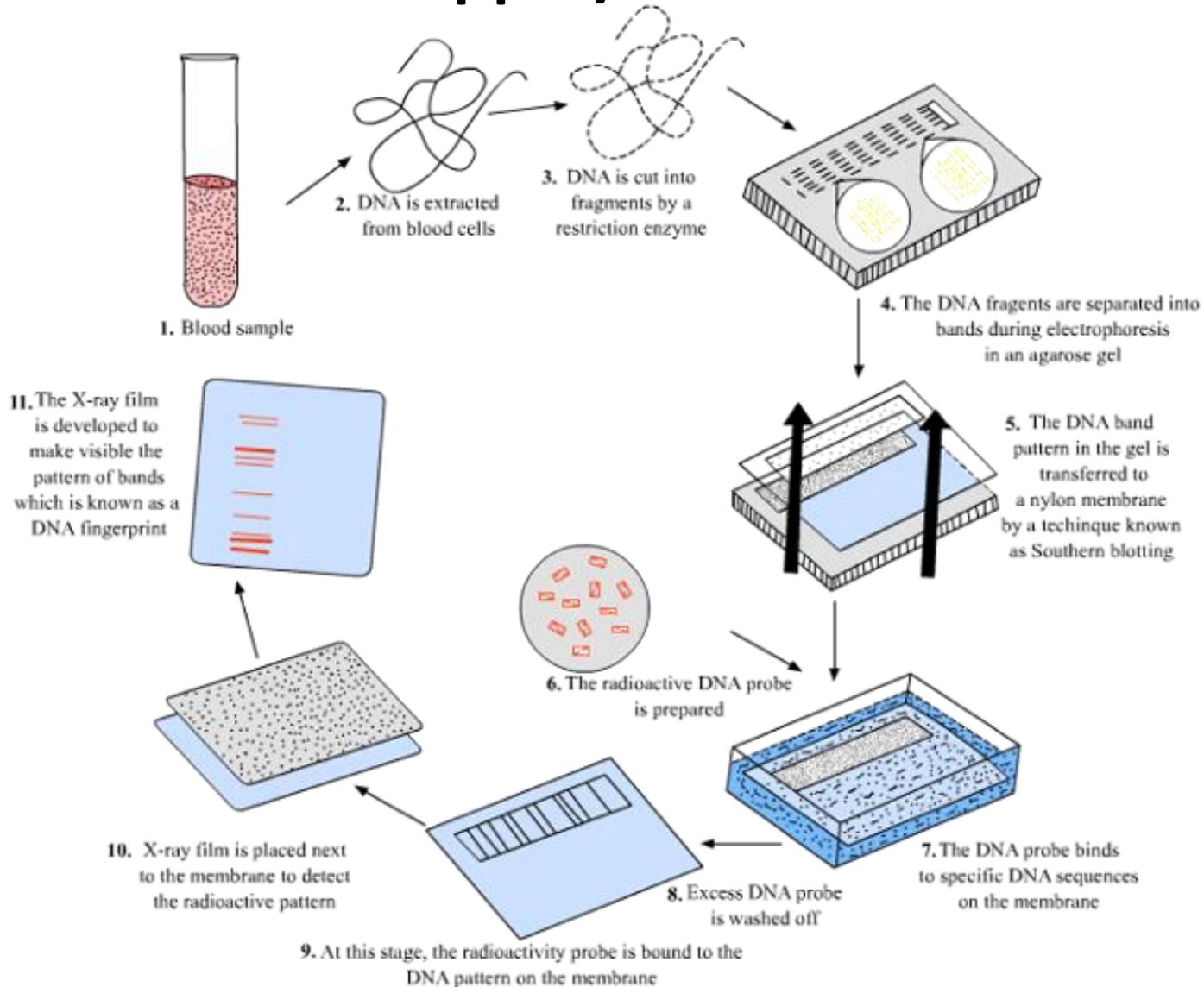


Western blot



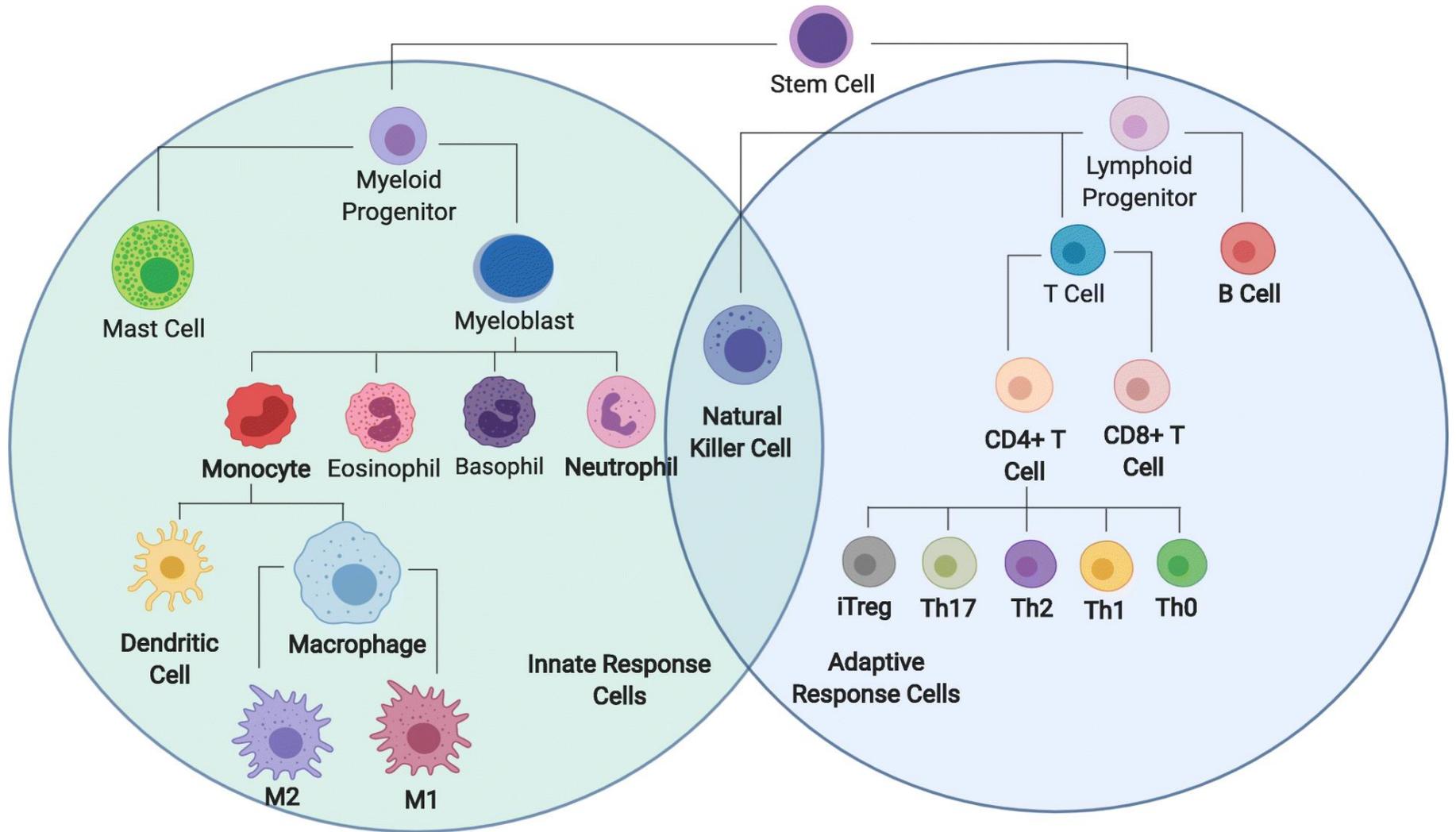
Northern/Southern blots

ДНК/РНК



Steps in DNA fingerprinting technique

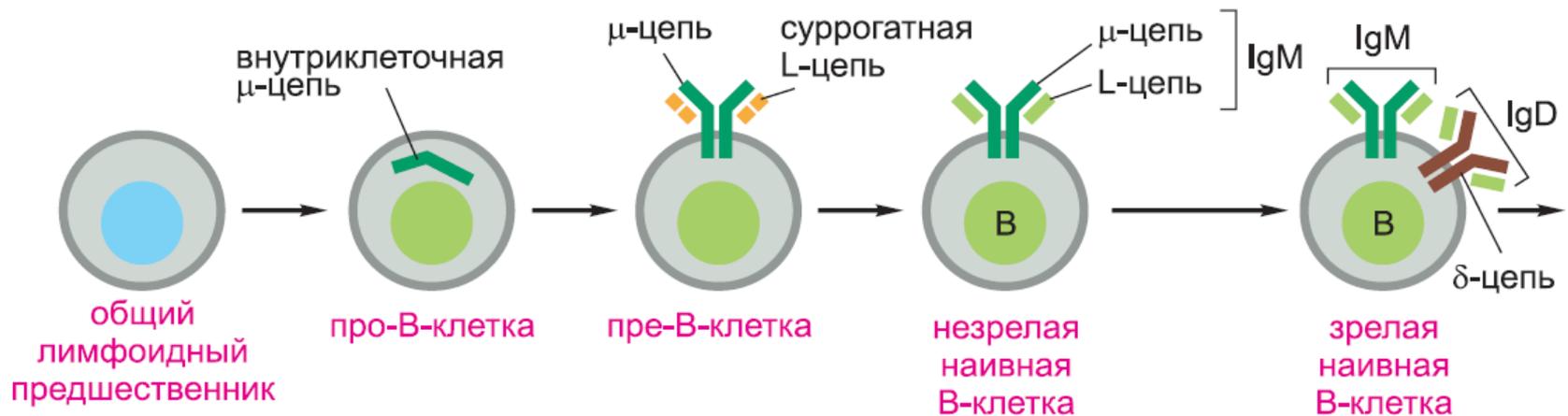
Клетки иммунной системы



Классы антител

IgA, IgD, IgE, IgG и IgM

каждому из них присущ свой собственный класс тяжелых цепей: α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно



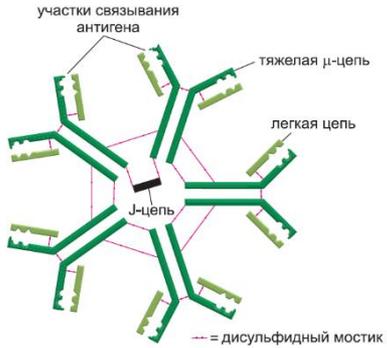
Развитие в костном мозге

Циркуляция по периферическим органам лимфатической системы

IgM, содержат тяжелые μ -цепи, всегда синтезируются первыми в развивающихся B-клетках, хотя в конечном счете (когда их стимулирует антиген) многие B-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

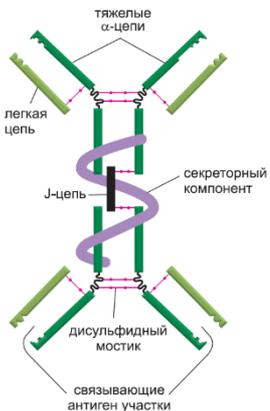
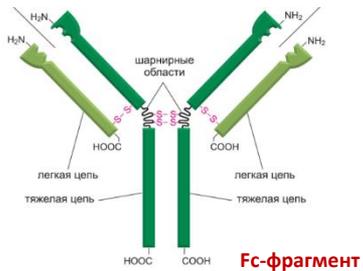
Классы антител



СВОЙСТВА

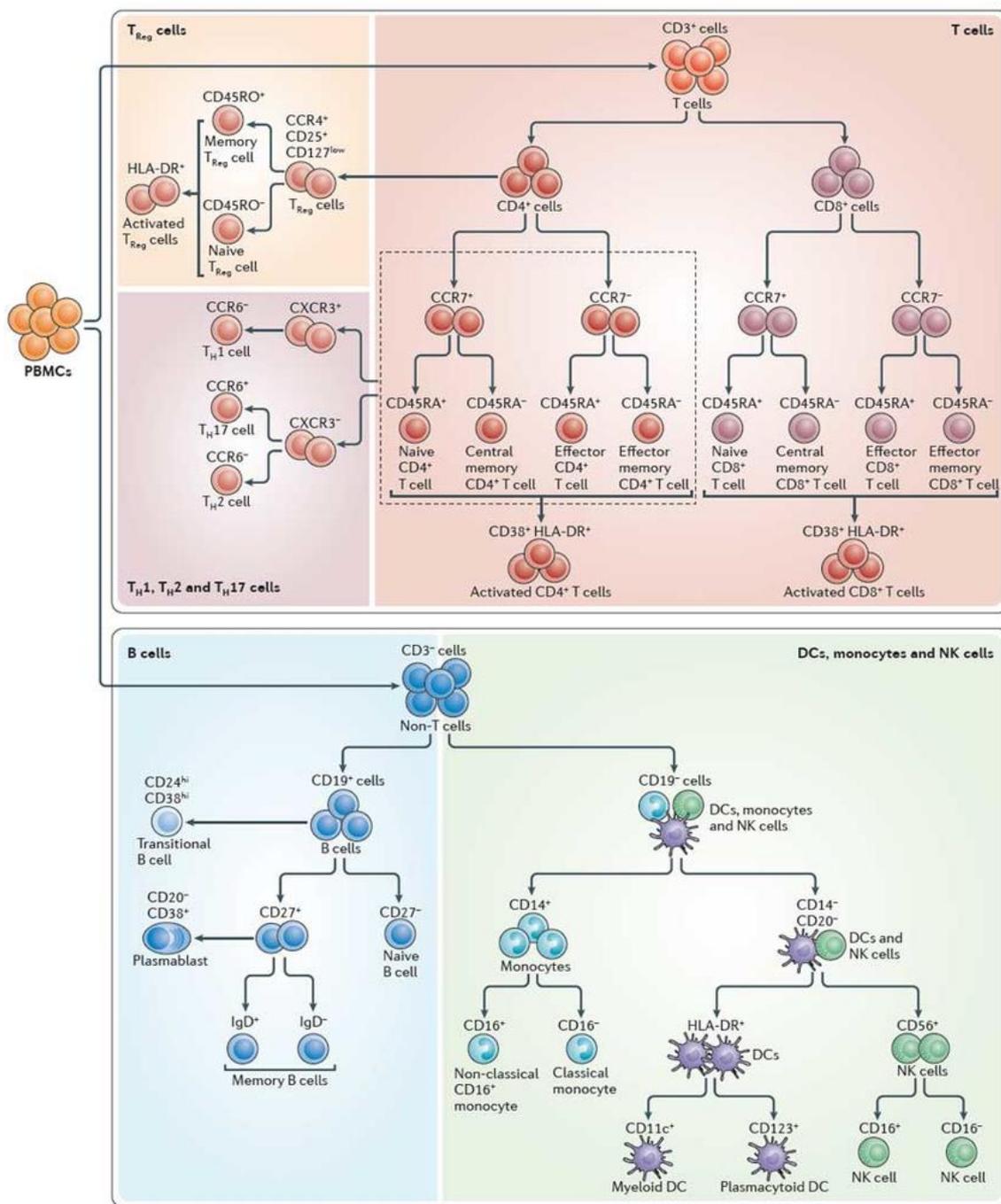
КЛАСС АНТИТЕЛ

| | IgM | IgD | IgG | IgA | IgE |
|--|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Тяжелые цепи | μ | δ | γ | α | ϵ |
| Легкие цепи | κ или λ |
| 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 | — | — | — | — | + |

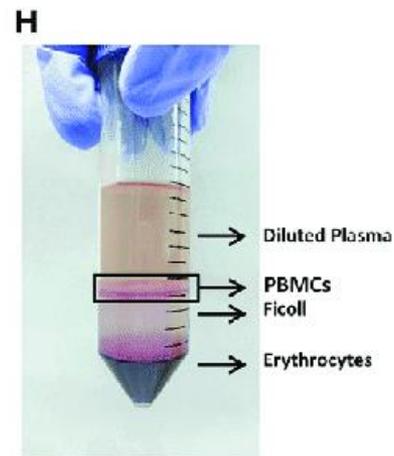


Современные методы анализа гуморального и клеточного иммунитета

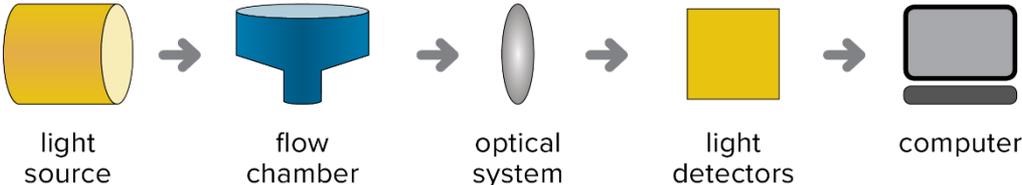
1. Цитокины и интерфероны – ИФА сыворотки крови
2. Анализ выработки антител различных классов в сыворотке крови – определяют в реакции преципитации в геле с антиглобулиновыми сыворотками
3. Общее и относительное число лимфоцитов и других иммунных клеток – ОАК
4. Фагоцитарная активность лейкоцитов – количество 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



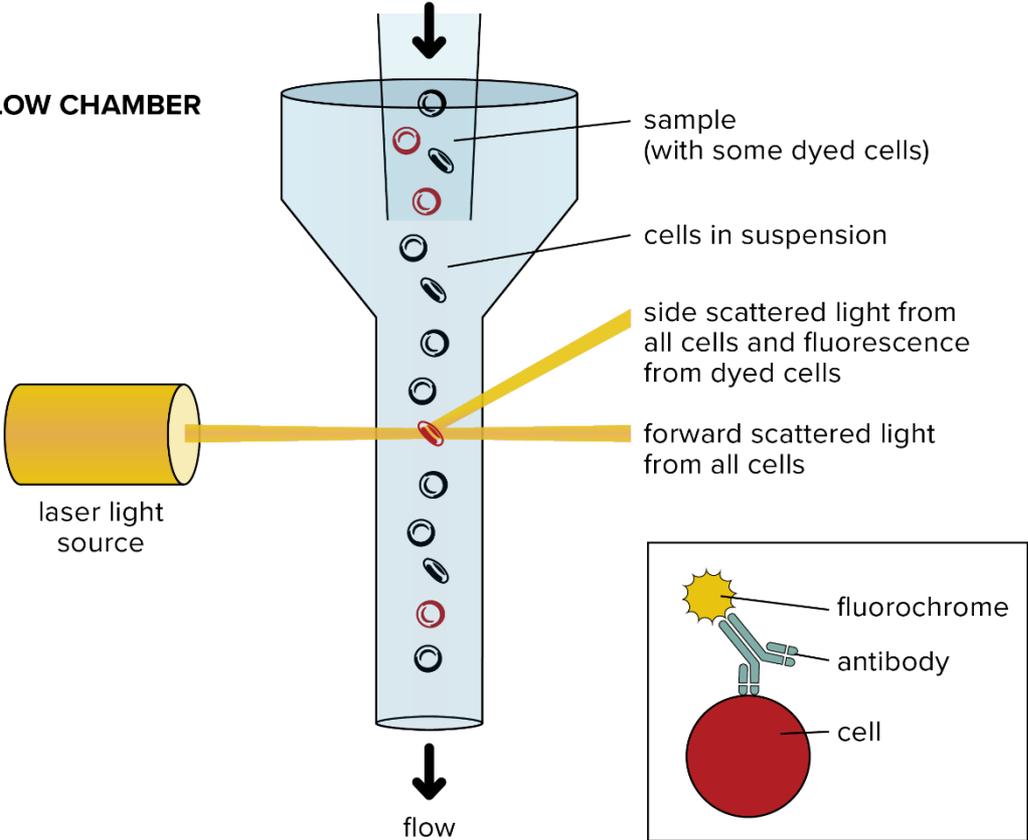
Выделение РВМС (peripheral blood mononuclear cells, МОНОЦИТОВ периферической крови)



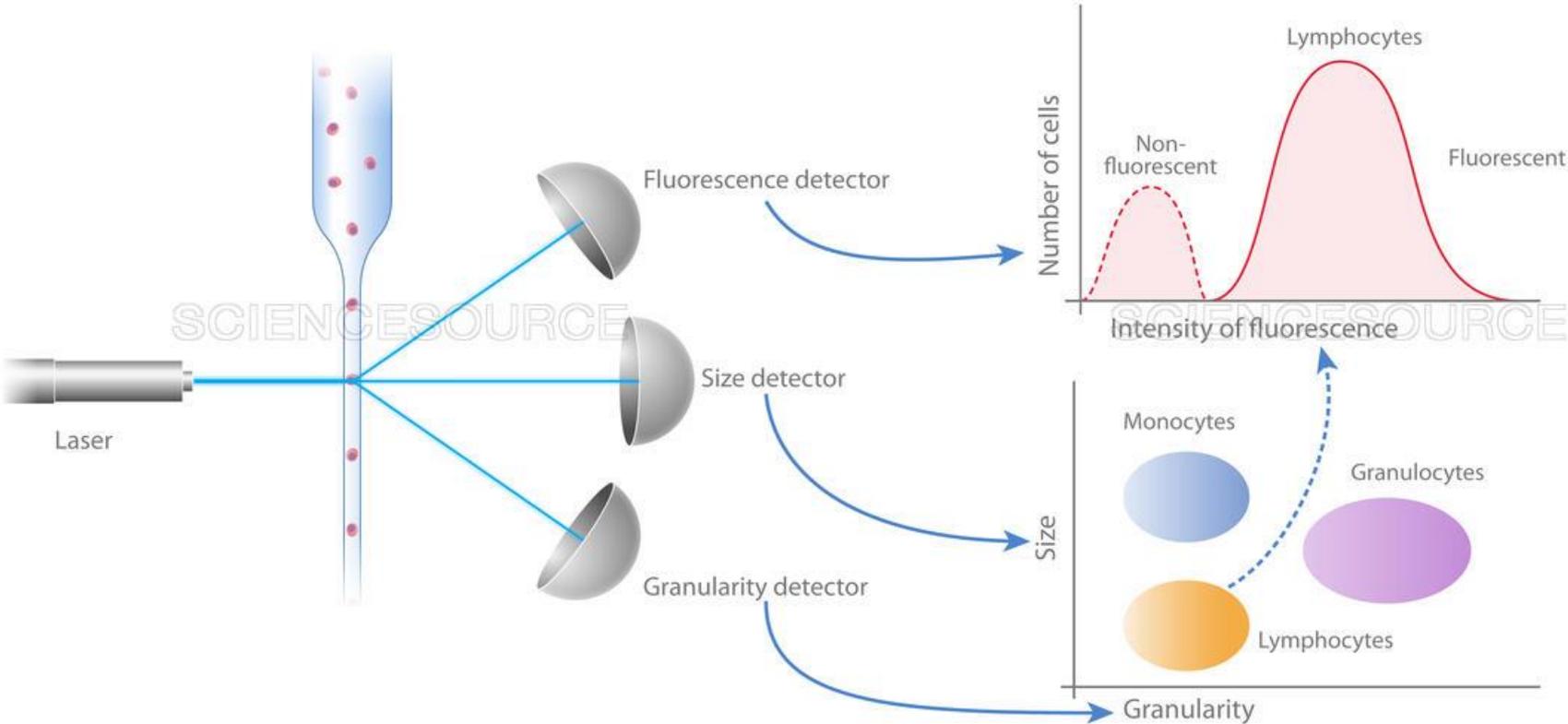
Проточная цитометрия



FLOW CHAMBER



Проточная цитометрия

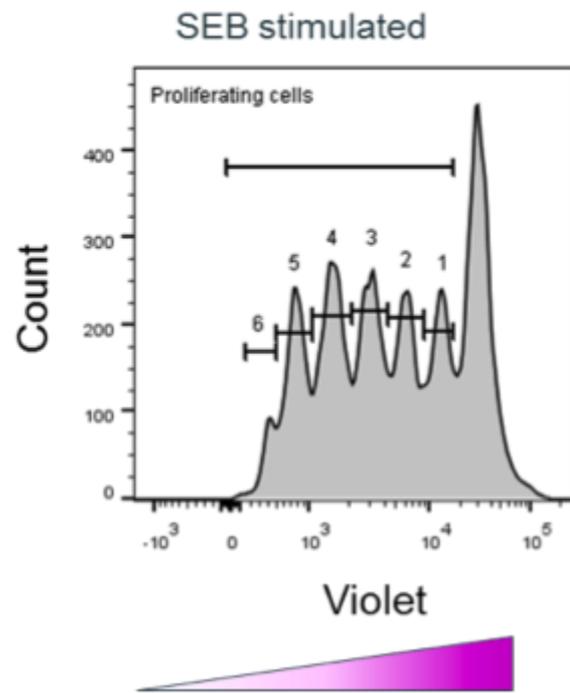
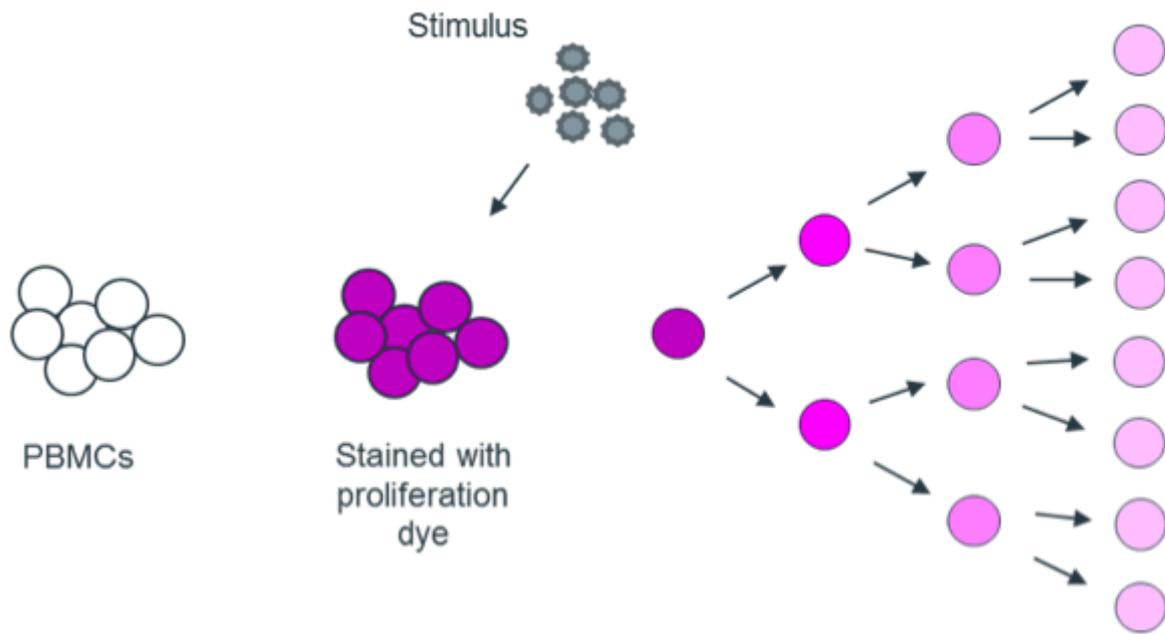


SOURCE

SCIENCE SOURCE

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

Разработка противовирусных препаратов. Общая информация

Темы докладов

Студенты могут выбрать одну из представленных тем и одну из дат семинаров для доклада. Просьба написать тему и дату на почту romanova_l_yu@staff.sechenov.ru. Возможно выполнение доклада двумя/тремя студентами.

Необходимо выбрать противовирусный препарат из списка и собрать по нему литературные данные. Для корректного раскрытия темы необходимо осветить:

- 1) Заболевание, для лечения/профилактики которого допущен к применению препарат (глобальная эпидемиология);
- 2) Вирус, вызывающий заболевание, его таксономическое положение, жизненный цикл, геном, структурные и неструктурные белки;
- 3) Unmet medical need: конкретная цель создания препарата;
- 4) Ведущее соединение (lead compound): открытие, механизм действия;
- 5) Оптимизация ведущего соединения: модификации структуры и их эффекты;
- 6) Выбор клинического кандидата;
- 7) Метаболизм;
- 8) Доклинические и клинические испытания;
- 9) Показания к применению, противопоказания.

Обязательно должен быть приведён список использованной при подготовке научной литературы.

Заведомо не будут приняты к рассмотрению:

1. Материалы, содержащие информацию, скопированную без изменений из любых источников;
2. Материалы, основанные только на инструкции по применению препарата.

| | |
|----|------------------------------|
| 1 | Абакавир / Abacavir |
| 2 | Бривудин / Brivudine |
| 3 | Диданозин / Didanosine |
| 4 | Эмтрицитабин / Emtricitabine |
| 5 | Энтекавир / Entecavir |
| 6 | Идоксуридин / Idoxuridine |
| 7 | Ламивудин / Lamivudine |
| 8 | Рибавирин / Ribavirin |
| 9 | Софосбувир / Sofosbuvir |
| 10 | Ставудин / Stavudine |
| 11 | Телбивудин / Telbivudine |
| 12 | Трифлуридин / Trifluridine |
| 13 | Видарабин / Vidarabine |
| 14 | Залцитабин / Zalcitabine |
| 15 | Зидовудин / Zidovudine |
| 16 | Ацикловир / Acyclovir |

| | |
|----|--|
| 17 | Адефовир / Adefovir dipivoxil |
| 18 | Цидофовир / Cidofovir |
| 19 | Фамцикловир / Fanciclovir |
| 20 | Фавипиравир / Favipiravir |
| 21 | Ганцикловир / Ganciclovir |
| 22 | Пенцикловир / Penciclovir |
| 23 | Пролекарства тенофовира: сравнительный анализ / Tenofovir alafenamide, Tenofovir disoproxil fumarate |
| 24 | Валацикловир / Valaciclovir |
| 25 | Валганцикловир / Valganciclovir |
| 26 | Амантадин / Amantadine |
| 27 | Римантадин / Rimantadine |
| 28 | Тромантадин / Tromantadine |
| 29 | Пролекарства тенофовира: сравнительный анализ / Tenofovir alafenamide, Tenofovir disoproxil fumarate |
| 30 | Асунапревир / Asunaprevir |
| 31 | Атазанавир / Atazanavir |
| 32 | Боцепревир / Bosceprevir |
| 33 | Дарунавир / Darunavir |
| 34 | Фосампреновир / Fosamprenavir |
| 35 | Гразопревир / Grazoprevir |
| 36 | Индинавир / Indinavir |
| 37 | Нелфинавир / Nelfinavir |
| 38 | Паритапревир / Paritaprevir |
| 39 | Ритонавир / Ritonavir |
| 40 | Саквинавир / Saquinavir |
| 41 | Симепревир / Simeprevir |
| 42 | Телапревир / Telaprevir |
| 43 | Ванипревир / Vaniprevir |
| 44 | Даклатасвир / Daclatasvir |
| 45 | Ледипасвир / Ledipasvir |
| 46 | Омбитасвир / Ombitasvir |
| 47 | Элбасвир / Elbasvir |
| 48 | Велпатасвир / Velpatasvir |
| 49 | Долутегравир / Dolutegravir |
| 50 | Элвитегравир / Elvitegravir |
| 51 | Ралтегравир / Raltegravir |
| 52 | Докозанол / Docosanol |
| 53 | Занамивир / Zanamivir |
| 54 | Перамивир / Peramivir |
| 55 | Осельтамивир / Oseltamivir |
| 56 | Ланинамивир / Laninamivir |
| 57 | Делавирдин / Delavirdine |
| 58 | Эфавиренз / Efavirenz |
| 59 | Этравирин / Etravirine |
| 60 | Невирапин / Nevirapine |
| 61 | Рилпивирин / Rilpivirine |
| 62 | Умифеновир / Umifenovir |
| 63 | Метисазон / Metisazone |
| 64 | Маравирок / Maraviroc |

| | |
|----|--|
| 65 | Балоксавир / Baloxavir marboxil |
| 66 | Ламивудин + зидовудин |
| 67 | Абакавир + ламивудин + зидовудин |
| 68 | Лопинавир + ритонавир |
| 69 | Дарунавир + кобицистат |
| 70 | Атазанавир + кобицистат |
| 71 | Ванипревир + рибавирин + PegIFN α -2b |
| 72 | Долутегравир + абакавир + ламивудин |
| 73 | Долутегравир + ламивудин |
| 74 | Тенофовир дизопроксил фумарат + эмтрицитабин |
| 75 | Тенофовир дизопроксил фумарат + эфавиренз + эмтрицитабин |
| 76 | Тенофовир дизопроксил фумарат '+ рилпивирин '+ эмтрицитабин |
| 77 | Тенофовир дизопроксил фумарат '+ кобицистат '+ эмтрицитабин '+ элвитегравир |
| 78 | Тенофовир алафенамид '+ кобицистат '+ эмтрицитабин '+ элвитегравир |
| 79 | Тенофовир алафенамид '+ рилпивирин '+ эмтрицитабин |
| 80 | Тенофовир алафенамид '+ эмтрицитабин |
| 81 | Софосбувир '+ рибавирин ('+ PegIFN α) |
| 82 | Даклатасвир '+ асунапревир |
| 83 | Ледипасвир '+ софосбувир |
| 84 | Софосбувир '+ симепревир |
| 85 | Омбитасвир '+ дасабувир '+ паритапревир '+ ритонавир |
| 86 | Омбитасвир '+ паритапревир '+ ритонавир |
| 87 | Даклатасвир '+ софосбувир |
| 88 | Элбасвир + гразопревир |
| 89 | Конформация сахарного остова и противовирусная активность аналогов нуклеозидов |
| 90 | Терапия вирусного гепатита Miravirsen |
| 91 | Доравирин / Doravirine |