ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

КАФЕДРА ФАРМАКОЛОГИИ И БИОИНФОРМАТИКИ

Методические рекомендации для обучающихся к практическим занятиям по дисциплине:
«Иммунобиологические и генотерапевтические препараты»

Тематический блок: **Иммунобиологические лекарственные препараты**

Тема занятия:

Рекомбинантные лекарственные препараты: моноклональные антитела. История (таймлайн) разработок, классификация (на основе мышиных, химерных, гуманизированных и человеческих антител).

Фармацевтический факультет

1. ЦЕЛИ ЗАНЯТИЯ

- научиться студентам анализировать действие рекомбинантных лекарственных препаратов (моноклональных антител) по совокупности их фармакологических свойств, механизмов и локализации действия;
- научиться студентам основам технологии получения моноклональных антител;
- научиться студентам оценивать эффективность применения рекомбинантных лекарственных препаратов (моноклональных антител) для терапии онкологических, аутоиммунных, инфекционных, аллергических заболеваний;
- научиться студентам оценивать возможности использования рекомбинантных лекарственных препаратов (моноклональных антител) для иммунодиагностики и оценки иммунного статуса;
- научиться студентам оценивать преимущества и недостатки данной группы иммунобиологических лекарственных средств;
- ознакомиться с необходимостью проведения просветительской работы с населением по вопросам эффективности применения моноклональных антител в различных областях медицины - как значимом факторе в борьбе с тяжелыми, хронически протекающими заболеваниями;

2. ЗАДАЧИ

- Для рекомбинантных препаратов на основе моноклональных антител изучить:
 - классификацию, структуру и номенклатуру препаратов;
 - общую характеристику и механизм действия;
 - основные механизмы действия и клинические мишени;
 - побочные эффекты препаратов;
 - применение в медицине, иммунодиагностике
- Изучить историю создания и основные этапы получения моноклональных антител
- Изучить основные термины и определения, используемые в процессе создания моноклональных антител;
- Изучить общие требования к хранению моноклональных антител

3. НА ЗАНЯТИИ ОТРАБАТЫВАЮТСЯ СЛЕДУЮЩИЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ НАВЫКИ И УМЕНИЯ

- умение классифицировать препараты изучаемой группы в зависимости от их происхождения и структуры

- умение по названию рекомбинантного терапевтического препарата определить тип моноклонального антитела, оценить его иммуногенность;
- умение анализировать возможности применения рекомбинантных лекарственных препаратов (моноклональных антител)
- умение анализировать достоинства и недостатки моноклональных антител

4. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЙ:

Место проведения: учебная аудитория кафедры фармакологии и биоинформатики.

Время проведения: часть 1 –2 АЧ

Формируемые компетенции: УК-1.1.3, УК-1.2.1, УК-1.2.2, УК-1.2.3., УК-1.3.1, УК-1.3.2., УК-6.1.1., УК-6.2.1, УК-6.2.2, УК-6.3.1, УК-6.3.2, УК-6.3.3, УК-6.3.4, ОПК-1.1.1., ОПК-1.2.1, ОПК-1.2.2., ОПК-1.3.1, ОПК-6.1.1, ОПК-6.2.1, ОПК-6.3.1, ПК-7.1.1, ПК-7.2.1, ПК-7.3.1.

4.1 Технологическая карта занятия

Часть	№	Этап занятия	Время
1	1	Проверка присутствующих студентов на занятии, режим занятия, тема занятия.	5 мин
	2	Проверка исходного уровня знаний студентов (письменный опрос).	10 мин
	3	Опрос по теме занятия.	45 мин
	4	Самостоятельная работа студентов (по рецептуре с разбором наиболее сложных рецептов (если есть в теме), разбор ошибок врачебных рецептов, выписанных студентами; работа с синонимами).	15 мин
	5	Проверка самостоятельной работы	5 мин
	6	Подведение итогов занятия. Задание на следующее занятие.	5 мин
	7	Уборка рабочих мест.	5 мин

4.2 Демонстрации

1. Демонстрация рекламных проспектов по данной теме при опросе по теме занятия.

4.3 План занятия

4.3.1 Занятие начинается со вступительного слова преподавателя, формулировки цели занятия и ответов на вопросы студентов.

Значение темы в системе подготовки и деятельности провизора:

- информирование населения по вопросам эффективности применения моноклональных антител в различных областях медицины и иммунодиагностики;

4.3.2 Проверка исходного уровня знаний студентов (письменный опрос).

4.3.3 Разбор теоретического материала

План разбора теоретического материала

I Моноклональные антитела (МАТ).

-общая характеристика МАТ, строение

-отличие МАТ от поликлональных антител

ротки, содержащей нейтрализующие поликлональные антитела против токсинов дифтерии и столбняка.

Келер и Мильштейн получили Нобелевскую премию 1984 года по физиологии и медицине за разработку новаторской гибридной технологии, которая облегчила выделение МАТ и их последующее производство в лабораториях.

В 2018 году Джордж П. Смит и сэр Грегори П. Уинтер были удостоены Нобелевской премии по химии за разработку фагового дисплея пептидов и антител.

В том же году Джеймс П. Эллисон и Тасуку Хондзе были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине 2018 года за их открытия в области иммунотерапии рака с использованием блокады антителами Т-клеточного ингибирующего рецептора (CTLA-4) и белка программируемой гибели клеток 1 (PD1) для усиления противоопухолевых иммунных реакций.

В 1975 году немецкий иммунолог **Жорж Келер**, изучавший генетическую изменчивость антител, и британский иммунолог **Сезар Мильштейн**, изучавший клоны опухолевых клеток (плазмцитом), создали гибрид плазматической и опухолевой клеток, производящих антитела.

Моноклональные антитела впервые были получены от гибридной клетки (гибридомы), полученной из:

- **антителообразующих В- лимфоцитов**, стимулированных конкретным антигеном
- **миелоидных (опухолевых клеток**, происходящих из плазматических клеток-плазмцитомы), способных к неограниченному размножению в искусственных условиях.

Гибридная клетка обладала **бессмертием опухолевой клетки и способностью к синтезу антител**, унаследованному от клетки нормальной.

Основные этапы получения гибридом

1. Иммунизация мышей выбранным антигеном.

На пике антител у животных удаляли селезенку и гомогенизировали ткань для получения суспензии В-клеток, продуцентов антител против введенного антигена.

2. Культивирование опухолевых клеток Для гибридизации с В-лимфоцитами были отобраны только **мутантные** клетки плазмцитомы (миеломы), у которых имелся только **основной** путь синтеза нуклеотидов (из аминокислот), и отсутствовал фермент, который обеспечивает синтез нуклеотидов по запасному пути (из пуринов и пиримидинов)

3. Слияние опухолевых клеток с «нормальными» лимфоцитами. Клетки селезенки смешивали с клетками плазмцитомы в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ) — полиэлектролита, способствующего слиянию клеточных мембран и образованию гибридных клеток. Гибридома сохраняла способность к клеточному делению, в процессе которого хромосомы обоих ядер перемешивались и образовывали одно общее ядро, содержащее гены обеих клеток-предшественников

4. Селекция гибридом.

Метаболическая селекция гибридов основывалась на том, что В-лимфоциты могут использовать два метаболических пути синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов: **основной** (из аминокислот и углеводных предшественников) и **резервный** (из гипоксантина (пурины) или дезокситимидина (пиримидины)).

Если основной метаболический путь синтеза нуклеотидов блокируется, то включаются в работу ферменты **гипоксантин-гуанидин-фосфорибозилтрансфераза (Г/ГФРТ)** и **тимидинкиназа**, что обеспечивает синтез нуклеотидов по запасному пути. Чтобы отделить заданную гибридому от других клеток, смесь клеток помещали в селективную среду (**ГАТ-среду**), содержащую **гипоксантин, аминоптерин и тимидин**, в которой блокировался (за счет токсичного **аминоптерина**) основной путь синтеза нуклеиновых кислот, что приводило к гибели **мутантных** опухолевых клеток, не обладавших резервным путем синтеза нуклеиновых оснований.

В-лимфоциты, способные расти в ГАТ-среде, будучи смертными, погибали естественным путем через 1–2 недели.

В селективной среде выживали только **гибридомные клетки**, сочетавшие свойства «бессмертных» опухолевых клеток и В-лимфоцитов

5. Культивирование полученных гибридом с целью выделения клона, продуцирующего необходимые антитела.

Выжившие в ГАТ-среде клетки помещали в пластиковые планшеты на 96 лунок (в каждую лунку — по 10 гибридом). После нескольких дней культивирования клетки, содержащие антитела заданной специфичности, клонировали (повторно заносили в лунки из расчета 1 клетка на 1 лунку). Клетка-предшественник давала начало формированию «бессмертного» клона, продуцирующего моноклональные антитела.

6. Изучение полученных гибридом -определение специфичности, аффинности.

7. Нарботка моноклональных антител *in vivo* (прививая клоны мышам) или *in vitro* (культивируя клоны в культуральной среде).

8. Очистка полученных антител.

Выбранные гибридомы могут длительно культивироваться для получения больших количеств однородных моноклональных антител. Для очистки используется аффинная и ионообменная хроматография.

III Типы моноклональных антител

Первые антитела были полностью **мышинными**. Однако **мышинные антитела** показали высокую иммуногенность, недостаточную эффективность в реализации механизма уничтожения клетки-мишени, быстро выводились из организма и теряли свое действие.

В 1988 г. британский биохимик и биотехнолог Грег Винтер разработал специальную методику «очеловечивания» моноклональных антител, в начале 90-х годов с помощью методов генной инженерии были получены **химерные МАТ**.

Химерные антитела — это антитела, в котором его константный домен, который обладает иммуногенными и эффекторными свойствами, заменен на иммуноглобулин человека, а переменный домен, который специфически взаимодействует с антигеном, останется мышинным

Гуманизированные антитела на 90-95% состоит из человеческого иммуноглобулина. Мышными в них остаются только гипервариабельные участки ответственные за связывание АТ с антигеном.

Рекомбинантные человеческие антитела, в которых переменные домены тяжелых и легких цепей антитела человека комбинируются с константными доменами антитела человека. Челове-

ческие МАТ обладают самой низкой иммуногенностью. Моноклональные антитела человека вырабатываются с использованием трансгенных мышей или библиотек фагового дисплея, содержащих все возможные варианты вариабельных участков иммуноглобулинов, путем переноса генов иммуноглобулина человека в геном мыши и вакцинации трансгенной мыши против желаемого антигена, что приводит к выработке соответствующих моноклональных антител. Таким образом, мышинные антитела *in vitro* трансформируются в полностью человеческие антитела.

IV Номенклатура препаратов МАТ

В 2008 году ВОЗ были приняты рекомендации относительно непатентованных названий препаратов моноклональных антител:

Их название должно заканчиваться на -маб, от английского monoclonal antibody.

Основные окончания препаратов МАТ в зависимости от источника получения

Иммуногенность	Тип	Доля последовательности, %		INN окончание
		Мышь	Человек	
с н и ж а е т с я ↓	Мышиные	100	0	-омаб мурономаб
	Химерные	33	67	-ксимаб ритуксимаб инфликсимаб
	Гуманизированные	5-10	90-95	-зумаб даклизумаб
	Человеческие	0	100	-умаб сарилумаб

Могут встречаться также комбинации: ксизу+маб — комбинация химерных и гуманизированных последовательностей.

V Механизм действия и клинические мишени МАТ

Моноклональные антитела обладают высокой специфичностью к определенным антигенам, что позволяет их использовать для прицельной (таргетной) терапии, связанных с ними заболеваний. Результатом действия МАТ становится:

- блокирование специфической мишени, играющей роль в патогенезе болезни, выведение или нейтрализация патогена;
- блокирование провоспалительной активности цитокинов;
- торможение процессов взаимодействия иммунокомпетентных клеток и их активации;
- элиминирование субпопуляции иммунных клеток, участвующих в воспалении;

Первые изученные и описанные клинические мишени МАТ

- фактор некроза опухоли альфа (**ФНО α**) (задействован в системных аутоиммунных заболеваниях);
- провоспалительные цитокины (**интерлейкины**), участвующие в воспалительных, аллергических и аутоиммунных реакциях;
- **белок CD20** присутствующий на поверхности В-лимфоцитов (при В-клеточных лимфопролиферативных заболеваниях);
- эпидермальный фактор роста (**EGFR**), повышенная экспрессия которого может наблюдаться при раковых заболеваниях;
- рецептор 2 человеческого эпидермального фактора роста (**HER2**), гиперэкспрессия которого встречается при раке молочной железы;

VI Лечебное применение МАТ

- терапия хронических заболеваний с длительным, прогрессирующим течением;
- иммунотерапия рака;
- аутоиммунные заболевания, (ревматоидный артрит, системная красная волчанка, псориаз, рассеянный склероз);
- аллергия (для лечения резистентных, тяжелых форм бронхиальной астмы);
- трансплантология (для профилактики отторжения трансплантата)
- терапия вирусных (СПИД, COVID-19), хронических воспалительных и орфанных заболеваний (пароксизмальная ночная гемоглобинурия, криопирин-ассоциированные периодические синдромы).

VII Другие области применения антител

Идентификация субпопуляций лимфоцитов человека методом иммунофенотипирования основана на обнаружении на их поверхности маркеров дифференциации (CD-антигенов), уникальных для каждой субпопуляции и стадии развития. Используя флюорохром-меченые моноклональные антитела, связывающиеся с определёнными CD антигенами, производят подсчёт лимфоцитов, относящихся к различным субпопуляциям для оценки клеточного звена иммунитета;

Диагностическое тестирование -моноклональные антитела используются в диагностике различных заболеваний для проверки наличия чужеродного антигена (токсинов, лекарств, гормонов, белков бактерий или вирусов);

Серологическая идентификация групп крови АВО Моноклональные антитела также могут быть использованы для серологической идентификации групп крови. Антитела могут быть выделены из сывороток человека, стимулированных группой крови А или В;

Радиоиммундетекция (RID) –с помощью моноклональных антител в опухоль и ее метастазы можно доставить радиоактивные вещества, позволяющие обнаружить небольшие узелки опухоли по локализации в них радиоактивности;

Анализ эмбрионального развития -определение пола плода, хромосомных аномалий, аномалий единичного гена;

Квадромы -клетки, образуемые при слиянии двух гибридом, синтезируют бифункциональные антитела, имеющие активные центры к разным антигенам;

Иммуноочистка - метод очистки отдельных интерферонов, белков и ферментов;

VIII Побочные эффекты

-Иммуногенность - инфузионные реакции, анафилаксия, снижение терапевтического действия лекарственного вещества

- возможно развитие каскада биологических реакций, сопровождающихся высвобождением цитокинов интерлейкина-6, ФНО α , интерферона (озноб, гриппоподобный синдром, миалгия и др.)

- повышенные риски возникновения онкологических, вирусных заболеваний, поскольку МАТ вызывают подавление активности отдельных звеньев иммунитета

- при длительной терапии препаратами МАТ (ингибиторами ФНО α) может наблюдаться реактивация латентного туберкулезного процесса, повышенный риск развития инфекций, лимфопролиферативных заболеваний, возникновение аутоиммунных реакций

- снижение выраженности клинического эффекта за счет нейтрализующего действия антител или формирования иммунных комплексов

Применение моноклональных антител также сопряжено с рядом особенностей и проблем, требующих внимания и решения:

- **Высокая стоимость.** Одним из основных барьеров на пути широкого использования МАТ является их высокая стоимость, обусловленная сложностью и дороговиз-

ной производства. Исследования направлены на поиск способов снижения затрат и упрощения процессов производства.

- **Иммуногенность.** Несмотря на значительные успехи в снижении иммуногенности МАТ, риск развития иммунного ответа на эти препараты все еще существует, особенно при длительном применении. МАТ могут вызывать иммунный ответ против себя, что блокирует их действие. У 75% пациентов, которым вводились мышинные антитела, наблюдалось образование нейтрализующих антител, что снижало эффективность лечения
- **Доставка.** Эффективная доставка МАТ к целевым клеткам, особенно в труднодоступные или защищенные области организма, остается сложной задачей. Разрабатываются новые стратегии доставки, включая наночастицы и инженерные конструкции.
- **Резистентность.** Так же, как и в случае с антибиотиками, существует риск развития резистентности опухолевых клеток к терапии МАТ, что требует разработки комбинированных подходов и новых препаратов для преодоления или минимизации этого явления.
- Все МАТ представляют собой **формы для инфузий или инъекций**, требующие определенных условий хранения и обращения. Все препараты МАТ хранятся при температурном режиме 2-8 градусов. Запрещено их замораживать, а также встряхивать, многие МАТ следует оберегать от попадания света. Создание пероральной формы МАТ с сохранением его эффективности — одна из задач в области разработок препаратов моноклональных антител

4.3.4 Самостоятельная работа студентов:

1. По названию терапевтического МАТ определить тип моноклональных антител, оценить его иммуногенность, провести поиск и выписать синонимы и показания к применению данного препарата. Информация заносится в рабочие тетради студентов.

2. Работа с рекламными проспектами лекарственных средств по данной теме.

4.3.5 Проверка выполнения самостоятельной работы студентов.

4.3.6 Подведение итогов занятия. Ответы на вопросы студентов.

4.3.7 Заключительное слово преподавателя.

Составитель,
доцент, к.м.н.

О.А. Салазникова

Перечень рекомендуемой литературы, включая электронные учебные издания:

1. Харкевич Д. А. Фармакология : учебник / Харкевич Д. А. - 11-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - 755, [5] с. : ил. - Текст: непосредственный.
2. Харкевич, Д. А. Фармакология : учебник / Д. А. Харкевич. - 13-е изд., перераб. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 752 с. : ил. - ISBN 978-5-9704-6820-3. - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970468203.html>
3. Фармакология : учебник / под ред. Р. Н. Аляутдина. - 6-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 1104 с. - ISBN 978-5-9704-6819-7. - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970468197.html>
4. Майский, В. В. Фармакология с общей рецептурой : учебное пособие / В. В. Майский, Р. Н. Аляутдин. - 3-е изд., доп. и перераб. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2017. - 240 с. - ISBN 978-5-9704-4132-9. - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970441329.html>
5. Аляутдин, Р. Н. Фармакология. Ultra light : учеб. пособие / Р. Н. Аляутдин. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2012. - 584 с. - ISBN 978-5-9704-1985-4. - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970419854.html>
6. Онкология : учебник / М. И. Давыдов, Ш. Х. Ганцев [и др.]. - Москва : ГЭОТАР Медиа, 2020. - 920 с. : ил. - ISBN 978-5-9704-5616-3. - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970456163.html>
7. Онкология : учебник / под ред. С. Б. Петерсона. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2018. - 288 с. : ил. - ISBN 978-5-9704-4704-8. - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970447048.html>
8. Онкология / под ред. Чисова В. И., Давыдова М. И. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2014. - 1072 с. - ISBN 978-5-9704-3284-6. - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970432846.html>
9. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : Т. 1 : учебник / под ред. Зверева В. В., Бойченко М. Н. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2020. - 448 с. - ISBN 978-5-9704-5835-8. - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970458358.html>
10. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : Т. 2 : учебник / под ред. Зверева В. В., Бойченко М. Н. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2021. - 472 с. - ISBN 978-5-9704-5836-5. - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970458365.html>
11. Этиотропная терапия острых вирусных инфекций у детей : учеб. пособие для спец. 06010365 "Педиатрия" / Крамарь Л. В., Арова А. А., Желудков Ю. А. и др. - Волгоград : Изд-во ВолгГМУ, 2012. - 156 с. - Текст: непосредственный.
12. Иоанниди Е. А. Хронические вирусные гепатиты В, D и С : этиопатогенез, эпидемиология, клиника, лечение и профилактика : учеб. пособие / Иоанниди Е. А., Божко В. Г., Беликова Е. А., Александров О. В. ; ВолгГМУ Минздрава РФ. - Волгоград : Изд-во ВолгГМУ, 2016. - 71, [1] с. : табл. - Текст : электронный // ЭБС ВолгГМУ : электронно-библиотечная система. - URL: http://library.volgmed.ru/Marc/MObjectDown.asp?MacroName=%D5%F0%EE%ED%E8%F7_%E2%E8%F0%F3%F1_%E3%E5%EF%E0%F2%E8%F2%FB_2016&MacroAcc=A&DbVal=47
13. Kharkevitch D.A., Pharmacology / Kharkevitch D.A. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. - 672 с. - ISBN 5-9704-0264-8 - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN5970402648.html> (дата обращения: 28.02.2020). - Режим доступа : по подписке.

Перечень профессиональных баз данных, информационных справочных систем, электронных образовательных ресурсов, рекомендуемых для подготовки:

1. <http://vrachirf.ru/> - Информационный портал Врачи России
2. <https://pharmarf.ru> – информационный портал Фарма России
3. <https://www.rlsnet.ru/> - РЛС (регистр лекарственных средств России) (информационная справочная система)
4. <http://www.drugs.com> - Информационная база о лекарственных препаратах (информационная справочная система)
5. <https://grls.pharm-portal.ru/> - государственный реестр лекарственных средств.
6. <http://elibrary.ru> – Электронная база, электронных версий периодических изданий на платформе Elibrary.ru (профессиональная база данных)
7. <http://www.consultant.ru/> – Справочно-правовая система «Консультант-Плюс» (профессиональная база данных)