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:

Векторы – как носители для доставки генов. Основные типы, принципы действия и характеристика вирусных векторов (емкость, селективность, продолжительность экспрессии гена, иммуногенность, простота производства, возможность интеграции в ДНК- клетки, вероятность наличия у пациента антител). Физические и химические способы доставки векторов на основе вирусов (генная пушка, электропорация, магнетофекция, сонопорация, с помощью применения различных наночастиц - кремния, золота, фосфата кальция, липидов).

Фармацевтический факультет

I. ЦЕЛИ ЗАНЯТИЯ:

- научиться анализировать, классифицировать препараты, имеющие векторную систему доставки по совокупности их фармакологических свойств, механизмов и локализации действия;
- научиться студентам оценивать возможности использования препаратов, имеющих векторную систему доставки для адекватной фармакотерапии.

II. ЗАДАЧИ:

1. Для препаратов, имеющих векторную систему доставки изучить:

- основные типы, принципы действия и характеристику вирусных векторов (емкость, селективность, продолжительность экспрессии гена, иммуногенность, простота производства, возможность интеграции в ДНК- клетки, вероятность наличия у пациента антител);
- физические и химические способы доставки векторов на основе вирусов (генная пушка, электропорация, магнетофекция, сонопорация, с помощью применения различных наночастиц - кремния, золота, фосфата кальция, липидов);
- классификацию препаратов;
- применение их в медицинской практике.

III. НА ЗАНЯТИИ ОТРАБАТЫВАЮТСЯ СЛЕДУЮЩИЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ НАВЫКИ:

- умение оценивать принципы действия, характеристики и возможности использования препаратов, имеющих векторную систему доставки на основе представлений об их свойствах;
- умение анализировать действие препаратов, имеющих векторную систему доставки.

IV. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЙ:

Место проведения: учебная аудитория кафедры фармакологии и биоинформатики.

Время проведения: 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.	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

Демонстрация слайдов по данной теме при опросе по теме занятия.

4.3 План занятия:

- 4.3.1 Вступительное слово преподавателя.
- 4.3.2 Разбор теоретического материала.
- 4.3.3 Проведение контрольной работы

План разбора теоретического материала.

Векторы – как носители для доставки генов.

Вектор — молекула нуклеиновой кислоты, чаще всего ДНК, используемая в генетической инженерии для передачи генетического материала внутрь клетки, в том числе в клетку живого многоклеточного организма *in vivo*. Для введения рекомбинантной ДНК применяют два основных вектора: плазмиды и бактериофаги.

Классифицируют векторы в зависимости от хозяев, в которых им предстоит попасть (бактериальные, дрожжевые и т.п.), в зависимости от типа репликона (плазмидные, вирусные, комбинированные, челночные, искусственные хромосомы) и в зависимости от функционального назначения (интегративные, экспрессионные, векторы для клонирования, секвенирования или транскрипции). Подобрать и заказать подходящие векторы для своих экспериментов можно, обратившись к базе AddGene или каталогам коммерческих компаний, а если что-то в готовых векторах не устроит, их можно доработать самостоятельно.

В большинстве случаев в качестве носителей для доставки генов используют вирусы, чья естественная способность внедрять свой генетический материал в клетки хозяина может быть не только вредна, но и полезна. Такие вирусы сначала изменяют методами генной инженерии, удаляя большинство отвечающих за вирулентность генов, что не позволяет вирусу бесконтрольно делиться и освобождает место для вставки целевого гена, который нужно доставить в клетку. Эти вирусы-носители защищают лечебный ген от расщепления ферментами крови, заставляют клетки-мишени захватывать вирус, отделять нуклеиновую кислоту от вирусной частицы и транспортировать ее по месту назначения (как правило, в ядро клетки). Клетка, в которую внедрился такой вирус, оказывается зараженной — но только уже не опасной инфекцией, а лечащим болезнью геном, — а потому начинает синтезировать новый белок, направляющий клетку по пути излечения

Разрабатывается множество разнообразных вирусных векторов, потому что при разных заболеваниях требуется доставить гены в различные органы или ткани, а для достижения терапевтического эффекта требуются разные уровни и продолжительность экспрессии.

Обычно при выборе или разработке подходящего вирусного вектора руководствуются следующими характеристиками:

1. **Ёмкость** — длина ДНК целевого гена, который может быть помещен в вектор.
2. **Селективность** поглощения целевыми для данной терапии клетками и отсутствие экспрессии в тканях, где получаемый белок может вызвать токсичность (например, в сердце).
3. **Продолжительность экспрессии** гена.
4. **Иммуногенность** — влияние вектора на иммунный ответ.
5. **Простота производства.**
6. **Возможность интеграции в ДНК клетки** или способность существования в качестве стабильного элемента в ядре клетки без геномной интеграции.
7. **Вероятность наличия у пациента антител** против этого вектора в случае, если организм ранее встречался с подобным вирусом, — это снижает эффективность вектора.

Таким образом, идеальный вектор должен обладать:

- местами для удобного встраивания фрагментов ДНК;
- достаточной ёмкостью;
- селективными маркерами, позволяющими выявлять клетки с этим вектором — как «пустым», так и со «вставкой»;
- участками ДНК, обеспечивающими его поддержание в виде отдельного репликона либо интеграцию клонированного фрагмента в хозяйский геном;
- участками ДНК, обеспечивающими (если требуется) эффективную экспрессию встроеного гена в выбранном хозяине.

Несмотря на сегодняшнее преобладание векторов на основе вирусов, гены можно доставлять и другими физическими и химическими методами: генной пушкой, электропорацией, магнетофекцией, сонопорацией, применением различных наночастиц (из кремния, золота, фосфата кальция, липидов) и др.

Физические методы доставки генетического материала.

Наряду с вирусными и невирусными системами доставки генетического материала, использующими естественные свойства и функции клеточных мембран для доставки нуклеиновых кислот, существует группа методов, основной задачей которых является физическое повреждение плазматической мембраны, приводящее к проникновению чужеродного генетического материала в цитозоль. Ряд физических методов хорошо зарекомендовали себя в биотехнологии, где они используются для трансформации культур клеток. Сообщают также о применении некоторых физических методов для переноса генов на организменном уровне.

Классическим физическим методом доставки генетического материала является т.н. **«генная пушка»**, впервые примененная для переноса генов в растения. Метод основан на бомбардировке клеток или ткани металлическими частицами, покрытыми ДНК. Необходимая скорость придается частицам током газа-носителя (чаще всего, гелий) или путем высоковольтного электрического разряда. В качестве носителя используют микрочастицы золота, вольфрама или серебра диаметром порядка 1 мкм. Для достижения необходимой эффективности переноса генетического материала и воспроизводимости результатов необходима точная стандартизация всех физических и технических параметров эксперимента

(размер частиц, давление газа и др.). В настоящее время генные пушки используют в исследованиях рака яичников. Очевидным недостатком генных пушек является травматизация тканей-мишеней, часто приводящая к гибели трансфицированных клеток. Повысить проницаемость плазматической мембраны можно и электрическими разрядами. На этом основан метод электропорации – еще один классический физический метод переноса генов. Приложение к плазматической мембране электрического поля, большего, чем ее собственная электрическая емкость, вызывает перераспределение зарядов на мембране с последующим формированием пор, что позволяет молекулам ДНК диффундировать внутрь клеток. Параметры поля подбирают исходя из физических свойств мембраны клеток-мишеней.

Описана внутрикожная, внутримышечная и внутриопухолевая доставка плазмидной ДНК с помощью **электропорации**. Основным препятствием использования электропорации *in vivo* также является повышенная гибель клеток, подвергшихся действию электрического поля.

Более щадящей техникой пермеабиллизации плазматической мембраны является **сонопорация** – обработка ткани-мишени ультразвуком. Для доставки генетического материала в клетки методом сонопорации ДНК иммобилизуют на поверхности микропузырьков и вводят в кровоток с последующим приложением ультразвука в проекции органа-мишени. Пузырьки состоят из ядра (перфторуглеводороды или гексафторид серы), наполненного газом (воздух, азот, инертный газ) и покрытого липидами, белками или синтетическими биополимерами. Циркулирующие микропузырьки, по размерам близкие к эритроцитам (диаметр 2–4 мкм), отвечают на воздействие ультразвука и высвобождают ДНК, которая диффундирует в пермеабиллизованные клетки. Сонопорацию используют для доставки генетического материала в мозг, почки, брюшную полость, а также в мышечную ткань, включая сердечную мускулатуру, и др.

«**Cell squeezing**» – метод, изобретенный в 2013 г. Он позволяет доставить молекулы в клетки путём "мягкого сдавливания" клеточной мембраны. Метод исключает возможность токсичности или неправильного попадания по мишени, так как он не зависит от внешних материалов или электрических полей.

В редких случаях для доставки генетического материала *in vivo* используют **гидропорацию** – повышение проницаемости мембраны за счет резкого изменения гидродинамического давления. Давление создается инъекцией больших объемов растворов ДНК в короткий промежуток времени. Такое воздействие увеличивает проницаемость эндотелия капилляров и формирует поры в плазматической мембране окружающих клеток паренхимы, через которые проникает ДНК. Этот метод, как правило, используется для генной терапии клеток печени.

Микроинъекция ДНК – введение в ядро клетки животных с помощью тонких стеклянных микротрубочек ($d=0,1-0,5$ мкм). Недостаток – сложность метода, высока вероятность разрушения ядра либо ДНК; можно трансформировать ограниченное число клеток. Не используется для человека.

Методы на основе частиц.

Прямой подход к трансфекции – **генная пушка**, при этом ДНК сцепляют в наночастицу с инертными твердыми веществами (чаще золото, вольфрам), которая затем «выстреливает» направленно в ядра клеток-мишеней. Этот метод применяется *in vitro* и *in vivo* для введения генов, в частности, в клетки мышечных тканей, например, при таком заболевании, как миодистрофия Дюшена. Размеры частиц золота – 1-3 мкм.

Очень эффективным методом для трансфекции ДНК является внедрение её через **липосомы** – малые, окруженные мембраной тельца, которые могут сливаться с клеточной цитоплазматической мембраной (ЦПМ), представляющая собой двойной слой из липидов. Для

эукариотических клеток трансфекция производится эффективнее с применением катионных липосом, потому что клетки к ним более чувствительны. Процесс имеет своё название – липофекция. Этот метод сегодня считается одним из самых безопасных. Липосомы нетоксичны и неиммуногенны. Однако, эффективность переноса генов с помощью липосом ограничена, поскольку внесенная ими ДНК в клетках обычно сразу же захватывается лизосомами и разрушается.

Еще один метод – использование **катионных полимеров**, таких как диэтиламиноэтил–декстран или полиэтиленимин. Отрицательно заряженные молекулы ДНК связываются с положительно заряженными поликатионами, и этот комплекс далее проникает в клетку путём эндоцитоза. ДЭАЭ-декстран изменяет физические свойства плазматической мембраны и стимулирует поглощение этого комплекса клеткой. Главный недостаток метода заключается в том, что ДЭАЭ-декстран в высоких концентрациях токсичен. Метод не получил распространения в генотерапии.

Доставка с помощью гистонов и других ядерных белков. Эти белки, содержащие много положительно заряженных аминокислот (Lys, Arg), в естественных условиях помогают компактно уложить длинную цепь ДНК в сравнительно небольшое ядро клетки.

Магнитофекция - метод, использующий силы магнетизма для доставки ДНК в клетки-мишени. Сначала нуклеиновые кислоты (НК) ассоциируются с магнитными наночастицами, а далее, под действием магнитного поля, частицы загоняются в клетку. Эффективность почти 100%-ная, отмечена явная нетоксичность. Уже через 10-15 мин частицы регистрируются в клетке – это гораздо быстрее других методик.

Импалефекция (impalefection; "impalement", букв. "сажание на кол" + "infection") – метод доставки с применением наноматериалов, таких как углеродные нанотрубки и нановолокна. При этом клетки буквально протыкаются подстилкой из нанофибрилл. Приставка «нано» применяется для обозначения их очень маленьких размеров (в пределах миллиардных долей метра).

Кроме этого, исследуют и возможность доставки «голых» нуклеиновых кислот (naked RNA и DNA). Такие способы доставки целевых генов теоретически могут иметь преимущества в сравнении с вирусами, поскольку их использование легче сделать массовым (векторы на основе наночастиц, например, значительно проще выпускать в промышленных масштабах), кроме того, риск генотоксичности и иммуногенности здесь потенциально тоже будет низким. Однако пока методы химической доставки генов менее специфичны и точны, чем доставка с помощью вирусов, и потому менее эффективны, а методы физического внедрения генов в клетки не могут применяться в терапии *in vivo*. До сих пор еще ни одно лекарство на базе невирусных способов доставки генов не было одобрено для использования у людей.

Недостатки генной терапии

Технологии генной терапии находятся в самом начале пути, поэтому, естественно, у них много «детских болезней» и огромный простор для улучшения. Ниже перечислены основные задачи, которые требуют решения:

- **сложность, трудоемкость, дороговизна** и, как следствие, — плохая масштабируемость технологии, из-за чего генные препараты пока что невероятно далеки от массовости (и не факт, что скоро к ней приблизятся);
- вытекающая из предыдущего пункта **заоблачная стоимость такого лечения**, из-за чего доступно оно лишь немногим;

- зачастую **серьезные нежелательные явления** нового типа, приводящие иногда даже к необратимым последствиям (вплоть до летального исхода). Впрочем, по мере накопления опыта, врачи уже учатся с ними справляться;
- **недостаточный период наблюдений за использованием генной терапии**, отсюда возникает неуверенность в долговременности ее эффекта, а также опасения о возможных отдаленных последствиях применения таких лекарств;
- **несовершенство технологии доставки целевых генов**: вирусные векторы, которые чаще всего используются, далеко не идеальны. Кроме упомянутых проблем с нецелевой интеграцией в геном (характерных для лентивирусных и γ -ретровирусных векторов), есть еще опасность активации иммунной системы (для векторов AAV), снижающая эффективность доставки целевых генов. При этом повторное введение вектора возможно не всегда.

Однако это не только проблемы: это также и потенциальные «точки роста» для новой технологии, где новые идеи получают шанс реализоваться в виде осязаемого преимущества.

4.3.5. Самостоятельная работа студентов:

1. Провести поиск среди литературных источников препаратов на основе вирусных векторов с описанием показаний, противопоказаний и побочных эффектов.

4.3.6 Проверка выполнения самостоятельной работы студентов.

4.3.7 Подведение итогов занятия. Ответы на вопросы студентов.

4.3.8 Заключительное слово преподавателя.

Составитель
доцент, к.м.н.

К.А. Гайдукова

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 : ГЭОТАРМедиа, 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. Чиссова 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)