

Лекция № 1

**СОВРЕМЕННЫЕ
ДОСТИЖЕНИЯ
БИОТЕХНОЛОГИИ**

План

1. Биотехнология. Приоритетность ее развития. Основные направления.
2. Биотехнология лекарственных средств. Классификация ЛС, полученных методами биотехнологии.
3. Достижения биотехнологии в области создания и производства:
 - антибиотиков;
 - ферментных препаратов;
 - гормонов;
 - интерферонов и интерлейкинов;
 - факторов свертывания крови;
 - моноклональных антител (МАТ);
 - рекомбинантных вакцин.
4. Биосимиляры — биотехнологические «дженерики».

Биотехнология является одна из наиболее молодых, но весьма перспективных отраслей высокотехнологического производства. Многие эксперты связывают решение актуальных медико-социальных проблем именно с развитием биотехнологии. В руках у врачей окажутся еще более эффективные препараты для борьбы с серьезными заболеваниями, многие из которых раньше считались неизлечимыми.

Объем российского рынка биотехнологических товаров превышает \$1 млрд. Самый крупный потребитель биотехнологической продукции — фармацевтика. Биотехнологическое направление сегодня является одним из самых перспективных в области создания высокоэффективных лекарственных средств. Такое стремительное развитие рынка можно объяснить тем, что человечество выходит на принципиально новый этап своего развития, делая акцент в разработке новых лекарственных средств на изучение ключевых процессов, протекающих в живых организмах. Биотехнологические препараты позволяют воздействовать на организм намного точнее и эффективнее, чем традиционные химические средства. Уже сейчас созданы лекарства, способные бороться с такими ранее неизлечимыми недугами, как СПИД, гепатиты, рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера, и другие.



Биотехнология как наука — это наука о методах и технологиях создания и использования природных и генетически трансформированных биологических объектов для интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения, в том числе и лекарственных средств.

Биотехнология как сфера производства — это направление научно-технического прогресса, использующее биологические процессы и объекты для целенаправленного воздействия на человека и окружающую среду, а также в интересах получения полезных человеку продуктов.

Приоритетность биотехнологии связана с:

1. Ростом численности населения земного шара.
2. Истощением энергетических, минеральных и земельных ресурсов.
3. Развитием технологий, в т.ч. биотехнологий.

Эффективность биотехнологических методов связана прежде всего с тем, что клетки биологических объектов являются своего рода биофабриками по синтезу различных веществ (белков, жиров, углеводов, витаминов, аминокислот, нуклеиновых кислот, антибиотиков, гормонов, антител, ферментов, спиртов и т.д.). Они не требуют больших энергетических затрат и чрезвычайно быстро воспроизводятся (бактерии — за 20–60 мин, дрожжи — за 1,5–2 часа, тогда как животная клетка — за 24 часа). Биосинтез таких сложных веществ как белки, антибиотики, антигены, антитела и др. значительно экономичнее и технологически доступнее, чем химический синтез.

Лекарственные субстанции могут быть получены следующими методами:

- ▶ выделением из сырья растительного, животного или минерального происхождения (традиционные технологии);
- ▶ химическим органическим и неорганическим синтезом;
- ▶ в результате биотехнологического производства.

В настоящее время биотехнология является наиболее активной отраслью в области новых разработок. Объем продаж биотехнологических препаратов по всему миру составляет более \$100 млрд, а его ежегодный прирост — порядка 15%. Основные направления, по которым в данное время ведутся исследования, это — разработка препаратов для лечения тяжелых форм рака, ВИЧ, аутоиммунных заболеваний, болезни Альцгеймера, сердечно-сосудистых заболеваний, разработка методов лечения на основе использования стволовых клеток, клеточной технологии (Tissue Engineering Product TEP), соматических клеточных препаратов и нанотехнологии. На современном этапе методами биотехнологии производится более 350 наименований ЛС для лечения 200 заболеваний, в том числе угрожающих жизни.

По экспертным оценкам, доля лекарственных средств, производимых биотехнологическими методами, в ближайшем будущем составит 50 % от всех применяемых лекарственных средств. Согласно определению EMEA (European Medicines Evaluation Agency — Европейское агентство по оценке лекарственных средств) и FDA (Food and Drug Administration — Управление по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными препаратами США), к биотехнологическим ЛС относятся продукты, полученные методом генной инженерии или гибридной технологии. Препараты, выделенные из тканей животных и человека, не относятся к биотехнологическим, а рассматриваются как биологические. Наиболее полно, по мнению специалистов, биологическое/биотехнологическое ЛС определяет Немецкая ассоциация исследовательских фармацевтических компаний (Verband Forschender Arzneimittelhersteller — VFA) как применяемое наружно или внутрь в целях профилактики, диагностики *in vivo* или терапии, действующее вещество которого, выделенное из биологической ткани или культуры живых клеток, характеризуется сложной молекулярной структурой. Подчеркивается также, что для проявления указанной биологической активности такой препарат может требовать специфических условий изготовления (добавления адъювантов, конъюгации, специфических физико-химических условий).

Биотехнологические лекарственные средства обладают рядом существенных отличий от химико-синтетических лекарственных средств.

1. Действующее вещество биотехнологических препаратов имеет биологическое происхождение и является производным от живых клеток, обладает сложной гетерогенной молекулярной структурой.

2. Исходным субстратом служат клетки животного происхождения или микроорганизмы (бактерии типа *E.coli*, дрожжи и пр.), используются их клеточные и субклеточные структуры.

3. Существенным отличием биотехнологических лекарственных средств является то, что в них используется естественная способность к метаболизму.

Следует также ожидать выхода на фармрынок новой категории лекарственных средств — биосимиляров — аналогов оригинальных биотехнологических лекарственных средств со сходной, но неидентичной активной молекулой. Ожидается, что введение в медицинскую практику биосимиляров резко снизит затраты здравоохранения на биотехнологические лекарственные средства, сделает их доступными для широких слоев населения. В руках у врачей окажутся еще более эффективные препараты для борьбы с серьезными заболеваниями, многие из которых раньше считались неизлечимыми.

Номенклатура лекарственных препаратов, полученных на основе биообъектов в силу объективных причин, имеет тенденцию к своему расширению. В категорию таких лекарственных препаратов входят:

1. лекарственные средства для лечения, в число которых входят аминокислоты и препараты на их основе, антибиотики, ферменты, коферменты, кровезаменители

и плазмозаменители, гормоны стероидной и полипептидной природы, алкалоиды;

2. профилактические средства, в число которых входят вакцины, анатоксины, интерфероны, сыворотки, иммуномодуляторы, нормофлоры;
3. диагностические средства, в число которых входят ферментные и иммунные диагностикумы, препараты на основе моноклональных антител и иммобилизованных клеток.

Антибиотики — это химиотерапевтические вещества, вырабатываемые микроорганизмами или получаемые из других источников (водоросли), а также получаемые путем химического синтеза, обладающие способностью подавлять возбудителя в организме больного. Производство антибиотиков представляет ныне мощную, хорошо развитую отрасль, входящую в фармацевтическую промышленность. Особенно широко развито в США, Англии, Японии, Франции, Италии и других странах. Например, в США ежегодно выпускается антибиотиков и их производных на сотни миллионов долларов.

Антибиотики в настоящее время получают:

1. Микробиологическим синтезом на основе плесневых грибов или актиномицетов. Этим способом получают антибиотики тетрациклинового ряда, природные пенициллины, антибиотики-гликозиды, макролиды и некоторые другие.
2. Химическим синтезом из простых органических веществ. Его используют для получения антибиотиков, имеющих несложную химическую структуру — левомицетин и его производные.
3. Сочетанием микробиологического и химического синтеза получают полусинтетические антибиотики. На основе трансформации молекул природных антибиотиков получают полусинтетические пенициллины, цефалоспорины, тетрациклины и другие.

Приведенные классы антибиотиков не исчерпывают их многообразия, список их пополняется с каждым годом. Причины неослабевающего внимания к поиску новых антибиотиков, связаны с токсичностью существующих антибиотиков, аллергическими реакциями, вызываемыми ими, нарастанием устойчивости патогенных микроорганизмов к применяемым препаратам и, помимо этого, с необходимостью изыскания средств борьбы с возбудителями, против которых недостаточно эффективны известные ныне антибиотики. Основные пути поиска включают:

1. Испытание новых продуцентов. Так, с начала 80-х годов исследуют миксобактерии, продуцирующие большое количество антимикробных агентов.
2. Химическая модификация антибиотиков. Противомикробные макролиды токсичны для человека. Например, гептаен амфотерицин В, используемый по

жизненным показанием при тяжелых микозах, вызывает необратимые поражения почек. Получены метиловые эфиры амфотерицина, менее токсичные и сохраняющие противогрибковую активность. При модификации пенициллинов и цефалоспоринов используют иммобилизованные ферменты.

3. Мутасинтез. Применяют мутантные штаммы, у которых блокирован синтез отдельных фрагментов молекулы антибиотика. В среду культивирования вносят аналоги этих фрагментов. Микроорганизм использует эти аналоги для биосинтеза, в результате чего получают модифицированный антибиотик.
4. Клеточная инженерия. Получают гибридные антибиотики, например, с новыми комбинациями агликона и сахаров.
5. Генетическая инженерия — введение в геном микроорганизма информации о ферменте, необходимом для модификации продуцируемого антибиотика, например его метилирования при помощи метилаз.
6. Важной задачей является повышение эффективности биосинтеза известных антибиотиков. Значительных результатов удалось добиться за десятилетия селекции штаммов-продуцентов с применением индуцированного мутагенеза и ступенчатого отбора. Например, продуктивность штаммов *Penicillium* по синтезу пенициллина увеличена в 300–350 раз. Определенные перспективы открываются в связи с возможностью клонирования генов «узких мест» биосинтеза антибиотика или в случае, если все биосинтетические ферменты кодируются единым опероном.
7. Многообещающим подходом служит инкапсулирование антибиотиков, в частности их включение в липосомы, что позволяет прицельно доставлять препарат только к определенным органам и тканям, повышает его эффективность и снижает побочное действие. Этот подход применим и для других лекарственных препаратов. Например, кала-азар, болезнь, вызываемая лейшманией, поддается лечению препаратами сурьмы. Однако лечебная доза этих препаратов токсична для человека. В составе липосом препараты сурьмы избирательно доставляются к органам, пораженным лейшманией, — селезенке и печени.

В 2014 году Всемирная организация здравоохранения предупредила всех о том, что человечество вступает в так называемую постантибиотическую эру. Наука и медицина с 1987 не производили действительно новых видов антибиотиков. Однако болезни не стоят на месте. Каждый год появляются новые возбудители, более устойчивые к существующим ЛС. В 2015 году ученые открыли новый класс антибиотиков из 25 противомикробных препаратов, включая очень важный, получивший название теиксобактин. Этот антибиотик уничтожает микробов, блокируя их способность производить новые клетки. Другими словами, микробы под воздействием этого лекарства не могут развиваться и вырабатывать со временем устойчивость к препарату. Теиксобактин к настоящему моменту доказал свою

высокую эффективность в борьбе с резистентным золотистым стафилококком и несколькими бактериями, вызывающими туберкулез. Лабораторные испытания теиксобактина проводились на мышах. Подавляющее большинство экспериментов показали эффективность препарата. Человеческие испытания должны начаться в 2017 году.

Ферменты медицинского назначения. Многообразно применение ферментных препаратов в медицине. Их используют для растворения тромбов, лечения наследственных заболеваний (вместо отсутствующих эндогенных ферментов) удаления жизнеспособных, денатурированных структур, клеточных и тканевых фрагментов, освобождения организма от токсических веществ. Яркий пример — спасение жизни больных с тромбозом конечностей, легких, коронарных сосудов сердца при помощи тромболитических ферментов (стрептокиназы, урокиназы).

Среди основных направлений использования ферментов как терапевтических средств наибольший удельный вес занимают три области, которые и потребляют основное количество выпускаемых промышленностью препаратов: 1) заместительная терапия при недостаточной функции пищеварительных желез и ряде наследственных заболеваний; 2) местная (локальная, литическая) терапия для расщепления и удаления из организма некротических масс и экссудатов; 3) парентеральное применение свободных и связанных форм ферментов для лизиса тромбов в кровеносных сосудах и как противовоспалительные средства.

Путем микробиологического синтеза для медицинских целей получают следующие ферментные препараты:

- ▶ солизим (липолитический фермент, гидролизующий жиры), применяется при хронических заболеваниях желудочно-кишечного тракта;
- ▶ амилазы (расщепляют крахмал до глюкозы), в составе лечебного препарата «Фестал» используется при недостаточной функции поджелудочной железы;
- ▶ терилитин (протеолитический фермент), рекомендуется для лечения гнойных ран, ожогов, трофических язв;
- ▶ стрептокиназа (фибринолитический фермент) эффективен при лечении тромбозов; — β -галактозидаза (расщепляет лактозу), применяется для лечения лактозной недостаточности.

В нашей стране и за рубежом первое место по объему выпускаемых ферментных препаратов занимают протеолитические — наиболее глубоко изученные среди всех известных ферментов. Известно около 200 наследственных заболеваний, обусловленных дефицитом какого-либо фермента или иного белкового фактора. В настоящее время делают попытки лечения этих заболеваний с применением ферментов. Так, пытаются лечить болезнь Гете, при которой организм не способен расщеплять, глюкоцереброзиды. В последние годы все больше внимания уделяют

ингибиторам ферментов. Ингибиторы протеаз, получаемые из актиномицетов (лейпептин, антипаин, химостатин и др.) и генноинженерных штаммов *E. coli* анти-трипсин) оказываются полезными при септических процессах, инфаркте миокарда, эмфиземе легких, панкреатите. Уменьшение концентрации глюкозы в крови больных диабетом может быть достигнуто при использовании ингибиторов кишечных инвертаз и амилаз, отвечающих за превращение крахмала и сахарозы в глюкозу. Особой задачей является поиск ингибиторов ферментов, с помощью которых патогенные микроорганизмы разрушают антибиотики, вводимые в организм больного.

Гормоны. Биотехнология предоставляет медицине новые пути получения ценных гормональных препаратов. Особенно большие сдвиги произошли в последние годы в направлении синтеза пептидных гормонов. Генно-инженерные лекарственные препараты, появившиеся на рынке в последнее десятилетие, представляют собой естественные природные биорегуляторы и биологически активные вещества, синтез которых для медицинских целей вне организма невозможен или весьма затруднителен. К таким препаратам относятся инсулин, гормон роста, урокиназа, факторы свертывания крови, эритропоэтин, интерлейкины и их ингибиторы, колониестимулирующие факторы и факторы роста, артериальный натрийуретический фактор, супероксиддисмутаза, ангиогенин, тканевый активатор плазминогена, вакцины, моноклональные антитела. Самым крупным производством является производство генно-инженерного инсулина, доля которого в мировом рынке продуктов современной биотехнологической промышленности составляет 18%.

Инсулин, пептидный гормон островков Лангерганса поджелудочной железы, представляет собой основное средство лечения при сахарном диабете. Ранее инсулин получали из поджелудочной железы быка и свиньи. Препарат отличался от человеческого инсулина 3 (говяжий инсулин) или 1 аминокислотой (свиной), что приводило к угрозе аллергических реакций. Кроме того, для получения 1 килограмма инсулина требуется 35 тысяч голов свиней (если известно, что годовая потребность в инсулине - 1 тонна препарата). С другой стороны, биосинтетическим путем можно получить такое же 80 количество инсулина, проведя биосинтез в 25 кубовом ферментере, используя рекомбинантный микроорганизм *Escherichia coli*.

Широкомасштабное терапевтическое применение инсулина сдерживалось его высокой стоимостью и ограниченностью ресурсов. Путем химической модификации инсулин из животных удалось сделать неотличимым от человеческого, но это означало дополнительное удорожание продукта. Биосинтетический метод получения инсулина стал применяться в начале 80-х годов (восьмидесятых годов). Производит генно-инженерный инсулин на основе раздельного синтеза *E. coli* его А- и В-цепей. Стоимость продукта значительно снизилась. Получаемый инсулин идентичен человеческому. С 1980 г. в печати имеются сообщения о клонировании у *E. coli* гена проинсулина — предшественника гормона, переходящего в зрелую форму при ограниченном протеолизе. К лечению диабета приложена

также технология инкапсулирования: клетки поджелудочной железы в капсуле, введенные однократно в организм больного, продуцируют инсулин в течение года.

В России в 2016 году запущено производство нового жизненно важного препарата для лечения сахарного диабета (СД), базального инсулина последнего поколения, разработанного компанией «Санофи», зарегистрированного в США и ЕС в 2015 году. Одобрен более чем в 30 странах мира. Отличается более ровным и стабильным профилем действия и, соответственно, меньшим количеством побочных эффектов, а также гибкостью в применении. «Санофи-Авентис Восток» — первый и на сегодняшний день единственный в России фармацевтический завод полного цикла по производству современных инсулинов.

Компания Integrated Genetics приступила к выпуску фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов. Эти пептиды составлены из 2 субъединиц. Актуально стоит вопрос о промышленном синтезе олигопептидных гормонов нервной системы — энкефалинов, построенных из 5 аминокислотных остатков, и эндорфинов, аналогов морфина. При рациональном применении эти пептиды снимают болевые ощущения, создают хорошее настроение, повышают работоспособность, концентрируют внимание, улучшают память, приводят в порядок режим сна и бодрствования. Примером успешного применения методов генетической инженерии может служить синтез эндорфана по технологии гибридных белков, описанной выше для другого пептидного гормона, соматостатина.

Соматотропин — человеческий гормон роста (соматотропин) получали из гипофиза человека, каждый гипофиз содержит его не более 4 мг. В то же время для лечения одного ребенка, страдающего карликовостью, требуется около 7 мг соматотропина в неделю; курс лечения должен продолжаться несколько лет. С применением генноинженерного штамма *E. coli* в настоящее время получают до 100 мг гормона роста на 1 л среды культивирования, что гораздо дешевле. Открываются перспективы борьбы не только с карликовостью, но и с низкорослостью — более слабой степенью дефицита соматотропина. Соматотропин способствует заживлению ран и ожогов, наряду с кальцитонином (гормоном щитовидной железы) регулирует обмен Ca^{2+} в костной ткани.

Значителен вклад биотехнологии и в промышленное производство непептидных гормонов, в первую очередь стероидов. Методы микробиологической трансформации позволили резко сократить число этапов химического синтеза кортизона — гормона надпочечников, применяемого для лечения ревматоидного артрита. При производстве стероидных гормонов широко используют иммобилизованные микробные клетки, например *Arthrobacter globiformis* для синтеза преднизолона из гидрокортизона. Имеются разработки по получению гормона щитовидной железы тироксина из микроводорослей.

Интерфероны. Интерфероны — группа белковых веществ, вырабатываемых клетками, зараженными вирусами. Интерфероны индуцируют противовирусные

реакции. Они выделяются клетками человека и животных в ответ на инфицирование вирусами и обладают антивирусной активностью. Механизм действия интерферонов до конца не выяснен. Предполагается, в частности, что интерфероны препятствуют проникновению вирусных частиц в клетку. Интерфероны стимулируют деятельность иммунной системы и препятствуют размножению клеток раковых опухолей. Все аспекты действия интерферонов важны с точки зрения их терапевтического применения. Методы генетической инженерии позволяют получать модифицированные интерфероны.

Синтезированный генно-инженерным способом интерферон был выделен, очищен, и его физико-химические свойства оказались близкими свойствам интерферона, полученного из крови доноров. Удалось получить бактерии, способные синтезировать до 5 мг интерферона на 1 л бактериальной суспензии, содержащей примерно 10^{11} бактериальных клеток, что в 5000 раз превосходит то количество интерферона, которое можно извлечь из 1 литра крови доноров. В настоящее время гены интерферонов клонированы в дрожжи и клетки высших эукариот, способных осуществлять гликолизирование.

В 1991 году в США впервые для синтеза лейкоцитарного интерферона человека были употреблены генетически сконструированные клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. К генно-инженерным интерферонам относятся $\alpha 2$ интерферон ЕС, Интераль, Виферон, Кипферон, Реаферон-ЕС-Липинт, Инфагель и др. Реаферон-ЕС-рекомбинантный интерферон альфа-2b производства ЗАО «Вектор-Медика» обладает антивирусными, антипролиферативными и иммуномодулирующими свойствами и эффективно применяется для лечения многих заболеваний, в т.ч. онкологических. Это единственный интерферон, полученный в липосомальной пероральной форме. Размер липосомы 0,25 мкм, всасывание липосомы происходит без ее деградации. Это позволило получить терапевтический эффект без побочного действия, свойственного интерфероновым препаратам

Интерлейкины сравнительно короткие (около 150 аминокислотных остатков) полипептиды, участвующие в организации иммунного ответа. Интерлейкин-1, образующийся определенной группой лейкоцитов крови макрофагами, в ответ на введение антигена стимулирует размножение (пролиферацию) Т-хелперов (субпопуляции Т-лимфоцитов), продуцирующих, в свою очередь, интерлейкин-2. Последний вызывает пролиферацию различных субпопуляций Т-лимфоцитов — Т-киллеров, Т-хелперов, Т-супрессоров, а также В-лимфоцитов, продуцентов антител. Под влиянием интерлейкина-2 из Т-лимфоцитов высвобождаются регуляторные белки — лимфокины, активирующие звенья иммунной системы; синтезируются также интерфероны.

Интерлейкины, основные лечебные средства при иммунных расстройствах, получают путем клонирования соответствующих генов в *E.coli* или культивирования лимфоцитов *in vitro*. В качестве продуцентов интерлейкинов используют

культуры нормальных лимфоцитов или макрофагов; клоны трансформированных (опухолевых) клеток; Т-клеточные гибридомы (продукты гибридизации опухолевых лимфоцитов, способных к нормальному росту и Т-клеток, синтезирующих определенный ИЛ; рекомбинантные микробные клетки, полученные методами генной инженерии). Продуценты культивируют *in vitro* в сосудах определенного объема, затем ИЛ выделяют из культуральной среды, концентрируют, очищают. Для увеличения продукции ИЛ культуры клеток стимулируют митогенами (веществами, вызывающими митотическое деление клеток). В качестве митогенов используют глобулярные растительные белки (фитогемагглютинин и др.), а также компонент клеточной стенки бактерий — мурамилдипептид.

РОНКОЛЕЙКИН® — РЕКОМБИНАНТНЫЙ ИНТЕРЛЕЙКИН-2 ЧЕЛОВЕКА. Препарат получают современными биотехнологическими методами из клеток продуцента — рекомбинантного штамма пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, в генетический аппарат которых встроен ген человеческого интерлейкина-2. Активная субстанция ронколейкина — рекомбинантный дрожжевой интерлейкин-2 человека — является гликопептидом, состоящим из 133 аминокислот с молекулярной массой около 15,4 кДа.

Интерлейкин-2 — один из ключевых компонентов иммунного ответа. Его дефицит приводит к недостаточности иммунной системы, от транзиторной до тотальной.

Ронколейкин — структурный и функциональный аналог эндогенного интерлейкина-2, который обладает выраженной иммунокорригирующей активностью, направленной на усиление и оптимизацию противобактериального, противовирусного и противогрибкового иммунитета.

Получаемые биотехнологическим путем факторы свертывания крови, особенно фактор X (с помощью культивируемых клеток млекопитающих) и фактор IX (с помощью генноинженерного штамма *E. coli*, необходимы для терапии форм гемофилии — наследственной болезни, при которой кровь теряет способность свертываться. К числу ценных с клинической точки зрения факторов, полученных в биореакторах с культурами животных клеток, следует отнести фактор роста В? фактор активации макрофагов, Т фактор.

Американская Администрация пищевых продуктов и лекарственных средств одобрила новый лекарственный препарат для лечения гемофилии В — Rixubis (рекомбинантный фактор свертывания IX). Препарат Rixubis, очищенный протеин, полученный при помощи технологии рекомбинации ДНК, предназначен для предотвращения и контроля кровотечений, связанных с гемофилией данного типа. В США это лекарство — «первая ласточка» новой формы терапии гемофилии В, которой только в этой стране страдают более 3 300 человек. В мире количество больных гемофилией В составляет примерно 25 000.

Моноклональные антитела и ДНК- или рНК-пробы. Моноклональные антитела занимают ведущее место среди разрабатываемых биотехнологических продуктов.

МАТ давно нашли применение в иммунодиагностике, а в последнее десятилетие растет их роль в терапии рака и других заболеваний.

МАТ — продукты В клеток, используют для диагностики различных заболеваний. Обладая высокой специфичностью действия, они обеспечивают идентификацию не только вида возбудителя, но и его серотипа. С помощью МАТ можно тестировать различные гормоны, метаболиты, белковые факторы. Наиболее быстрый метод индикации основан на применении антител, иммобилизованных на мембранных электродах — аналогах ферментных биосенсоров. Они позволяют диагностировать беременность, выявлять предрасположенность к диабету, ревматоидному артриту, идентифицировать наследственные заболевания, сопровождающиеся утратой тех или иных ферментов и других белковых компонентов. МАТ широко используют для диагностики рака и определения его форм. МАТ имеют не только диагностическое, но и лечебное значение. При аутоиммунных заболеваниях, когда иммунные клетки «ополчаются» против собственных органов и тканей, МАТ соответствующей специфичности могут связывать антитела, наносящие вред организму больного.

Сенсацией в клинической онкологии явилось высокоэффективное использование МАТ — **Герцептина и Мабтеры**. Именно эти лекарства открыли новый раздел в современном лечении злокачественных опухолей — направленную биотерапию. Использование МАТ позволяет целенаправленно уничтожать опухолевые клетки. Высокая эффективность моноклональной терапии связана с механизмами действия антител. Среди основных механизмов цитотоксического действия антител, взаимодействующих с антигенами опухолевых клеток, активация компонентов комплемента, индукция антитело-зависимой цитотоксичности, индукция апоптоза, блокада рецепторов и прерывание внутриклеточных сигнальных цепей, блокада биоактивных молекул, важных для реализации злокачественного фенотипа, индукция идиотип-антиидиотипического ответа.

Сегодня интерес к разработке новых препаратов на основе МАТ со стороны производителей очень высок. В настоящее время на территории Российской Федерации стадию клинических исследований проходит более 10 препаратов на основе МАТ. Общее количество препаратов, находящихся на стадии разработки в мире, исчисляется сотнями.

Перед современными учеными, исследующими МАТ, стоит множество актуальных задач. В частности, поиск решения проблемы иммуногенности препаратов, изготовленных на основе МАТ. Большинство препаратов на основе МАТ, которые сегодня проходят стадию клинических исследований, включают в состав человеческие антитела. Использование этого типа антител снизило иммуногенность препаратов, однако не устранило проблему полностью, поскольку иммунная система человека способна вырабатывать антитела против любого терапевтического белка.

Еще одна проблема, связанная с применением препаратов на основе МАТ, обусловлена тем, что МАТ представляют собой крупные молекулы, которые не способны проникать внутрь клетки или глубоко в ткани. Сегодня МАТ нельзя применять внутрь, так как их концентрация для достижения эффекта должна в несколько тысяч раз превышать концентрацию молекул-мишеней. В связи с этими особенностями, сегодня ученые озабочены созданием нового поколения лекарственных средств, которые объединят в себе преимущества МАТ и низкомолекулярных препаратов. На этом пути сделано уже несколько важных научных открытий. Первое из них — создание шведской компанией Affibody особых «аффител», которые обладают свойствами обычных антител, но имеют в десятки раз меньшую молекулярную массу, что позволяет им лучше проникать в ткани. Еще одно достижение науки — разработка «нанотел» бельгийской компанией Ablynx. Эти препараты характеризуются высокой стабильностью, что позволяет использовать их внутрь и местно. Кроме того, они просты в производстве. Сейчас на стадии клинических исследований у пациентов с тромбозами и остеопорозом находятся четыре «нанотела». Наконец, еще одно сверхсовременное направление — разработка доменовых антител американской компанией Domantis. Эти антитела должны соответствовать различным отделам тяжелой и легкой цепи антител человека и быть в десять раз меньше обычного антитела, что позволит применять их внутрь и ингаляционно.

Для лечения онкологических заболеваний используют два типа МАТ — простые, неконъюгированные АТ т.е. не связанные с цитотоксическими веществами и конъюгированные — АТ, связанные с радиоактивными частицами, цитостатиками или токсинами (иммунотоксинами). АТ обеспечивают адресную доставку токсичного препарата к опухолевым клеткам, чем и обусловлен терапевтический эффект указанных АТ. Схемы воздействия препаратов конъюгированных и неконъюгированных МАТ изображены на рисунках (рис. 1, 2).

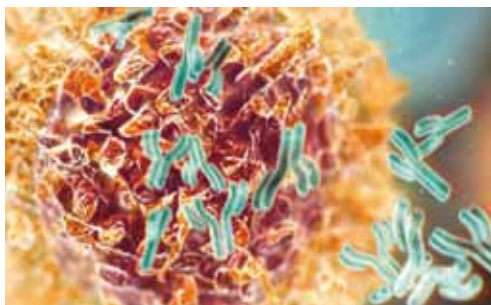


Рисунок 1. Взаимодействие неконъюгированных МкАТ с клеткой-мишенью

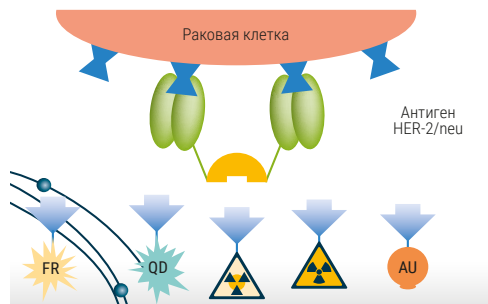


Рисунок 2. Схема взаимодействия конъюгированных МкАТ с опухолевой клеткой

ТАБЛИЦА 1. ПРЕПАРАТЫ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Препарат	Активное вещество	Производство	Показания к применению
Герцептин (трастузумаб)	Гуманизированные МАТ (IgG1) к внеклеточному домену рецептора эпидермального ростового фактора человека 2 типа (HER-2) на опухолевых клетках	«F. Hoffmann-La Roche Ltd» (Швейцария)	Рак молочной железы, яичника, предстательной железы, желудка, легких с гиперэкспрессией HER-2 на опухолевых клетках
Мабтера (ритуксимаб)	Химерные МАТ к рецептору CD20 на пре-B- и B-лимфоцитах	«F. Hoffmann-La Roche Ltd» (Швейцария), «Genentech Inc» (США)	B-клеточные CD20-положительные неходжкинские лимфомы, хронический лимфолейкоз
Кэмпас (алемтузумаб)	Гуманизированные МАТ (IgG1k) к рецептору CD52 на нормальных и малигнизированных B- и T-лимфоцитах	«Schering AG» (Германия)	Хронический лимфолейкоз
Эрбитукс (цетуксимаб)	Химерные МАТ (IgG1) к рецептору эпидермального фактора роста (РЭФР)	«Merck Serono» (Германия)	Метастатический колоректальный рак, рак головы и шеи
Вектибикс (панитумумаб)	МАТ к рецептору эпидермального фактора роста (РЭФР) (последовательность идентична IgG2 человека)	Владелец РУ «Amgen Europe, B.V.»	Метастатический колоректальный рак
Авастин (бевацизумаб)	Гуманизированные МАТ к фактору роста эндотелия сосудов (VEGF)	«F. Hoffmann-La Roche Ltd» (Швейцария), «Genentech Inc» (США)	Метастатический колоректальный рак, рак молочной железы, рак легкого, почечно-клеточный рак

Успешные испытания препаратов направленного действия на основе МАТ и их в большинстве случаев низкая токсичность позволяют надеяться на скорое появление в клинической практике высокоэффективных препаратов, способных не только увеличить эффективность лечения и продолжительность жизни, но и улучшить качество жизни больных злокачественными новообразованиями.

ТАБЛИЦА 2. МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ.

Препарат	Описание
Препараты, разрешенные к клиническому использованию	
Ритуксимаб (Ритуксан, Мабтера)	Гуманизированное моноклональное антитело против CD20 антигена на поверхности В-лимфоцитов
Бексар	Мышиное моноклональное антитело против CD20, конъюгированное с J ¹³¹
Ибритумомаб (Зевалин)	Гуманизированное моноклональное антитело против CD20 антигена на поверхности В-лимфоцитов, конъюгированное с Y ⁹⁰
Препараты, находящиеся в III фазе клинических испытаний	
Алемптузумаб (Кампат)	Гуманизированное моноклональное антитело против CD52 антигена
Цетуксимаб (C225)	Моноклональное антитело против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR, HER1)
Бевацизумаб (Авастин)	Гуманизированное моноклональное антитело против фактора роста эндотелия сосудов (VEGF)
РЭАвак	Моноклональное антитело против РЭА
Линтузумаб (Lintuzumab, Zamy, HuM195)	Моноклональное антитело против CD33 антигена
Препараты, находящиеся в I-II фазах клинических испытаний	
Епратузумаб	Гуманизированное моноклональное антитело против CD22 антигена
Hu1D10	Гуманизированное моноклональное антитело к антигену гистосовместимости HLA-DR
Hu1D10-J131	Гуманизированное моноклональное антитело к антигену гистосовместимости HLA-DR, меченное радиоактивным йодом J ¹³¹
Витаксин	Моноклональное антитело к aub3 интегрина

Рекомбинантные вакцины и вакцины-антигены. Вакцинация один из основных способов борьбы с инфекционными заболеваниями. Путем поголовной вакцинации ликвидирована натуральная оспа, резко ограничено распространение бешенства, полиомиелита, желтой лихорадки. На повестке дня изготовление вакцин против гриппа, гепатитов, герпесов, свинки, кори, острых респираторных заболеваний. Большое экономическое значение имеет разработка вакцин против болезней сельскохозяйственных животных — ящура, африканской болезни лошадей, овечьей болезни «синего языка», трипаносомозов и др. Традиционные вакцинные препараты изготавливают на основе ослабленных, инактивированных или дезинтегрированных возбудителей болезней. Современные биотехнологические разработки предусматривают создание рекомбинантных вакцин.

Используя методы генной инженерии, можно создавать искусственные генетические структуры в виде рекомбинантных (гибридных) молекул ДНК. Рекомбинантная молекула ДНК с новой генетической информацией вводится в клетку реципиента с помощью переносчиков генетической информации (вирусы, плазмиды), которые называются векторами.

Получение рекомбинантных вакцин включает в себя несколько этапов:

- ▶ клонирование генов, обеспечивающих синтез необходимых антигенов;
- ▶ введение клонированных генов в вектор (вирусы, плазмиды);
- ▶ введение векторов в клетки-продуценты (вирусы, бактерии, грибы);
- ▶ культивирование клеток *in vitro*;
- ▶ выделение антигена и его очистка или применение клеток-продуцентов в качестве вакцин.

ДНК-вакцины по сравнению с другими вакцинами обладают рядом преимуществ:

1. При разработке таких вакцин можно достаточно быстро получить рекомбинантную плазмиду, несущую в себе ген, кодирующий необходимый белок патогена, в отличие от длительного и дорогостоящего процесса получения аттенуированных штаммов возбудителя или трансгенных животных.
2. Технологичность и низкая себестоимость культивирования полученных плазмид в клетках *E. coli* и ее дальнейшей очистки.
3. Экспрессируемый в клетках вакцинированного организма белок имеет конформацию, максимально близкую к нативной, и обладает высокой антигенной активностью, что не всегда достигается при использовании субъединичных вакцин.
4. Элиминация векторной плазмиды в организме вакцинированного происходит за короткий промежуток времени.
5. При ДНК-вакцинации против особо опасных инфекций вероятность заболевания в результате иммунизации полностью отсутствует.
6. Возможен пролонгированный иммунитет.

ДНК-вакцины можно вводить внутрикожно, в/м, п/к, в/в, интраназально, орально. В настоящее время сконструировано более 20 таких вакцин против: бешенства, болезни Ауески, болезни Ньюкасла, инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, СПИДа, герпесвирусных инфекциях человека, гепатита В, болезни Лайма и др.

С помощью генной инженерии были получены **конъюгатные полисахаридные вакцины**, которые произвели революцию в вакцинации против инкапсулированных бактериальных патогенов. В настоящее время доступны конъюгатные полисахаридные вакцины против *H. influenzae* типа b и определенных серотипов

S.pneumoniae. Разрабатываются конъюгатные полисахаридные вакцины против других возбудителей, таких как менингококки; стрептококки группы В; *Salmonella typhi*; штаммы *Shigella*.

В настоящее время несколько вакцин из синтетических пептидов проходят клиническое исследование. Пептидная вакцина продемонстрировала свою перспективность в отношении вируса-возбудителя пузырчатки полости рта и конечностей, а также малярии.

Большой интерес представляют **противоопухолевые ДНК-вакцины**, применение которых для лечения рака до сих пор было менее успешным. Индукция эффективного противоопухолевого иммунитета является сложной задачей. Клинические исследования подтвердили общую безопасность и низкую токсичность противоопухолевых ДНК-вакцин, однако эффективность вызванного ими иммунного ответа оказалась слабой, а противоопухолевая активность, в некоторых случаях, вообще сомнительной.

ДНК-вакцина против диабета I типа. Диабет I типа характеризуется потерей инсулин-продуцирующих бета-клеток островков Лангерганса поджелудочной железы. Главная причина потери бета-клеток — аутоиммунное поражение Т-киллерами. Для того, чтобы защитить бета-клетки от гиперактивной функции иммунной системы, учёные из Стэнфордского (США) и Лейденского (Нидерланды) университетов, разработали ДНК-вакцину ВНТ-3021. Вакцина создана на основе плазмиды и кодирует предшественник инсулина — проинсулин. Это вакцина обратного действия: если обычные вакцины должны активировать иммунные реакции, то ВНТ-3021, наоборот, нейтрализует цитотоксическое действие Т-киллеров, направленную против островков Лангерганса. В первой фазе клинических испытаний ВНТ-3021 показала свою эффективность и отсутствие серьезных побочных эффектов. Действие вакцины сохранялось в течение 2 месяцев.

БИОСИМИЛЯРЫ – БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ЛЕКАРСТВА

Синтез биотехнологических ЛС — это настоящая революция в лечении многих заболеваний. Однако многие оригинальные биотехнологические ЛС исчерпали срок патентной защиты, что привело к появлению на фармацевтическом рынке новых дженерических препаратов — биоподобных ЛС, способствующих росту конкуренции и снижению цен. Для компаний, сделавших ставку на этот класс препаратов, открываются широкие перспективы для развития: уже сегодня заканчиваются сроки патентной защиты препаратов, суммарный объем продаж которых, по самым скромным оценкам, составляет 10–15 млрд долл. США ежегодно.

Чем же отличаются оригинальные и воспроизведенные биотехнологические препараты, а также чем отличаются последние от дженериков? Определение био-

симиляра дано в директиве Евросоюза 2003 года: **биосимиляр** — это биотехнологическое лекарственное средство, схожее с произведенным впервые оригинальным лекарственным средством и представленное на регистрацию после истечения срока действия патента оригинального препарата.

В российском законодательстве понятие биосимиляра отсутствует, и подобные препараты регистрируются, согласно процедуре, аналогичной процедуре регистрации дженериков (воспроизведенных лекарственных средств). Однако за рубежом процесс регистрации биосимиляров в корне отличается от регистрации дженериков. Например, в Европе, чтобы вывести на рынок биосимиляр, необходимо провести клинические испытания, которые по объему и тщательности сопоставимы с испытаниями оригинального препарата.

Дженерическое лекарственное средство	Химический и терапевтический эквивалент низкомолекулярной массы оригинального ЛС с истекшим сроком патентной защиты
Биотехнологическое лекарственное средство	Оригинальное высокомолекулярное ЛС, синтезированное с помощью рекомбинантной ДНК методом генной инженерии (биотехнологическим путем)
Биоподобное лекарственное средство	Биоподобный препарат оригинального биотехнологического ЛС с истекшим сроком патентной защиты, соответствующий нормативно-правовым механизмам EMEA* *

СРАВНЕНИЕ ДЖЕНЕРИКОВ И БИОСИМИЛЯРОВ

Дженерики, которые являются аналогами синтетических препаратов, имеют сравнительно простую структуру молекулы действующего вещества. С помощью методов современного химического анализа идентичность молекулы дженерика молекуле оригинального препарата может быть проверена на 100%.

Биотехнологические препараты имеют очень сложную структуру молекулы действующего вещества. Это может быть протеин, который имеет большую молекулярную массу. Причем на сегодняшний день практически не существует таких аналитических методик, которые позволяли бы оценить все биологические и клинические свойства белков в биосимилярах и на 100% подтвердить их идентичность веществам, которые использованы в оригинальных препаратах. Молекулы действующего вещества в биотехнологических препаратах имеют сложную пространственную структуру — первичную, вторичную, третичную и даже четвертичную. В одну молекулу может входить до 1300 аминокислот, а также дополнительные молекулы, например, сахара. Полностью оценить различия эффективности и безопасности между оригинальными биотехнологическими препаратами и биосимилярами можно только в ходе клинических испытаний.

	Дженерики	Биосимиляры
Характеристика	Состоят из небольших молекул. Имеют четко установленную химическую формулу	Состоят из больших, сложных по своему строению молекул. Имеют трехмерную сложную пространственную высокомолекулярную белковую структуру
Производство	Производятся путем химического синтеза. Можно получить идентичную копию	Производятся методом биосинтеза с использованием живых клеток. Ввиду невозможности точного воспроизводства биосимиляры не могут быть полной копией оригинального препарата
Разработка	Проходят упрощенную процедуру клинических испытаний	При регистрации биосимиляров обязательно проводится полный цикл доклинических и клинических испытаний
Регистрация	Применяется упрощенная процедура регистрации в странах ЕС и США. Проверяются на взаимозаменяемость	Процедура регистрации контролируется EMA и BLA (Biologic Licensing Application). Проверяются на соответствие
Взаимозамещаемость*	Можно заменить оригинальный препарат без ущерба для процесса лечения	Замена биосимилярами строго контролируема врачом

Процесс производства уникален, и отличия на каждом этапе могут влиять на эффективность и безопасность препарата. В каждом производственном процессе используют свою оригинальную комбинацию растворителей, ферментов, материалов для колонок, буферных растворов. В результате в полученном действующем веществе остаются индивидуальные «отпечатки» примесей. Практически невозможно создать два абсолютно идентичных банка клеток для производства препарата. Также на качество конечного продукта может повлиять любое изменение условий культивирования клеток, методы очистки вещества и другие этапы производства. В итоге на выходе биосимиляр должен быть очень сходным с оригинальным препаратом.

К чему может привести изменения структуры действующего вещества в биотехнологических препаратах? Последствия могут быть очень серьезными — от снижения эффективности препарата до возникновения аллергических реакций. Например, в 2008 году было опубликовано исследование рекомбинантных эритропоэтинов, которое выявило, что некоторые биосимиляры этого препарата имели другую фармакокинетику, скорость выведения из организма, биологическую и терапевтическую активность и иммуногенность.

Европейское медицинское агентство (ЕМА) разработало жесткие требования к регистрации биосимиляров. Специальные процедуры экспертизы и допуска биосимиляров в сферу медицинского применения разработаны и в других странах, например в Австралии, Малайзии, Турции, Японии, Израиле, Канаде, Южной Корее и др.

РЕЗУЛЬТАТЫ РЕГИСТРАЦИИ БИОСИМИЛЯРОВ В ЕС (ПРИМЕРЫ)

Торговое наименование	МНН	Производитель биоподобного ЛС	Эталонный/референтный препарат	Решение
Omnitrope®	Соматропин	Sandoz	Генотропин®	одобрен
Valtropin®	Соматропин	Bio Partners	Хуматроп	одобрен
Alpheon®	Интерферон альфа	Bio Partners	Роферон-А	снят с регистрации
Binocrit® Abseamed® Epoetin alfa Hexal	Эпоэтин альфа	Sandoz Medice	Эпрекс	одобрен
Insulin Rapid Marvel	Инсулин растворимый	Marvel	Хумулин	отказано
Insulin 30/70 Marvel	Двухфазный инсулин	Marvel	Хумулин	отказано
Epostim	Эпоэтин альфа	Reliance GeneMedix	Эпрекс	отказано
Isomav	Isophane insulin	Marvel	Humulin S®	отказано

Биотехнологические препараты — это уникальные препараты, которые существенно расширили возможности современной медицины. Важно, чтобы эти сложные современные препараты проходили тщательные испытания, чтобы доказывалась их эффективность и безопасность. Только в этом случае применение различных биотехнологических лекарственных средств, в том числе и биосимиляров, к повышению качества жизни пациентов и продлению их жизни.