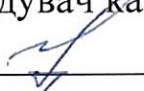


**ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКІВ**

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

 (Борисюк І.Ю.)

“ 27 ” серпня 2021 р

МЕТОДИЧНА РОЗРОБКА ПРАКТИЧНОГО ЗАНЯТТЯ

Факультет: фармацевтичний

Навчальна дисципліна «Фармацевтична біотехнологія»

Семінарське заняття №9 Тема: **«Технологія виготовлення імунобіологічних препаратів.»**
для аспірантів

Практичне заняття розробив:
асистент



(Акішева А.С.)

підпис

Практичне заняття обговорено на
методичній нараді кафедри
«27» серпня 2021 р.
Протокол № 1

Одеса – 2021

Тема: Технологія виготовлення імунобіологічних препаратів.

Мета: Ознайомитися з технологією виготовлення імунобіологічних препаратів.

Основні поняття: імунобіологічний препарат

Обладнання: згідно до вимог Належної аптечної практики (GPP).

Навчальний час: 4,0

План

I. Організаційний момент

Зміст теми

Біотехнологія вакцин

Жодної медичної науки людство не повинно порятунком стількох життів, як вакцинології. Вакцинопрофілактика довела свою ефективність як найбільш економічний засіб попередження інфекційних хвороб. Створені вакцини проти 34-х соціально значущих інфекцій, що призвело до значного зниження захворюваності на дифтерію, правець, кір, туляремію, поліомієліт і зникнення віспи. Основним завданням дослідження в області вакцинології є розробка безпечних і високоефективних вакцинних препаратів. Весь шлях створення вакцин був можливий тільки при використанні основних досягнень біотехнологічної науки - відкриття анатоксинів та можливість їх отримання, створення клітинних культур, аттенуація вірусів і бактерій, виділення і очищення полісахаридів, створення рекомбінантних технологій. Кожне відкриття біотехнології та імунології це черговий крок до створення нових вакцин, причому, не тільки для профілактики інфекційних захворювань. Сьогодні вакцини активно використовуються для лікування ряду захворювань: алергічних, аутоімунних, онкологічних та ін. Так, наприклад, в Україні зареєстровано дві вакцини для лікування і профілактики онкологічних захворювань: вакцина URO-BCG, що застосовується для лікування поверхневого раку сечового міхура (виробництва NVI, Нідерланди) і вакцина Гардасил проти вірусу папіломи людини, рекомбінантний (виробництво «Merck Sharp & Dohme BV», Нідерланди). Багатообіцяючими є комбіновані вакцини, що забезпечують імунізацію проти кількох інфекційних захворювань. Удосконалення і розвиток виробництва традиційних вакцин йде паралельно з розвитком технологій принципово нових вакцинних препаратів: ДНК-вакцин; вакцин на основі пептидів; мукозальних і рибосомних вакцин; створення препаратів, за допомогою яких з'явиться можливість впливати на імунну систему при використанні нових імуномодуляторів, що підвищують імунну відповідь; створення нових систем переносників, наприклад, ліпосом для доставки антигенів або імуномодуляторів; рекомбінантних вакцин і ряду інших. Інтенсивний розвиток біотехнології, біохімії, імунології визначило прогрес у розвитку світової фармації і створення високоефективних вакцин, як традиційних, так

і вакцин нового покоління; препаратів крові, інтерферонів, цитокінів і рекомбінантних продуктів різної спрямованості. З розвитком технології рекомбінантних ДНК стало можливим створення вакцин наступного покоління, позбавлених недоліків традиційних вакцин. У даній публікації неможливо висвітлити питання, що стосуються розробки та виробництва всіх існуючих сьогодні в світовій практиці вакцин. У зв'язку з цим ми зупинилися тільки на принципових підходах до створення нових високоефективних вакцинних препаратів. В цьому розділі підсумовані основні технології, ключові проблеми і імунологічні мети створення різних видів активних вакцин. У наших попередніх роботах були детально висвітлені технології отримання основних вакцин чинного в Україні Календаря щеплень. Технології та приклади, представлені тут, повинні надати читачеві чітку структуру, яка дала б йому можливість оцінити різні підходи до досліджень і розробки нових вакцин. Даний розділ цього навчального посібника повинен розглядатися спільно з матеріалами, викладеними в навчальному посібнику: Краснопільський Ю.М., Борщевська М.І. «Фармацевтична біотехнологія: Технологія виробництва імунобіологічних препаратів».- Харків, НТУ «ХП», 2009. У табл. 13 представлений перелік вакцин, отриманих з використанням різних технологій.

Штами-продуценти вакцин і їх призначення

	Штамм продуцент	Назначення вакцини
	2	3
	<i>Haemophilus Influenzae</i> типа <i>b</i>	Профілактика гемофільної інфекції (поліса, ліофілізована)
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	профілактика дифтерії (анатоксин, адсорбован)
	<i>Clostridium tetani</i>	профілактика правця (анатоксин, адсорбован)
	<i>Bordetella pertussis</i>	профілактика коклюшу (Не клітинна, антигени, адсорбіро- ванна або клітинна інактивована)
	2	3

	Hansunela polymorpha (рекомбинантний штамм)	профілактика гепатиту В (антиген HBs, адсорбована)
	Measles	профілактика кору (Жива, ліофілізіро- ванна)
	Mumps	профілактика паротита (Жива, ліофілізіро- ванна)
	Rubella	профілактика краснухи (Жива, ліофілізіро- ванна)
	Poliomyelit	профілактика поліомієліту (Жива чи інактиві- рованная)
0	Infiuenza	профілактика грипу (Антигени, очищена)
1	Streptococsmms pneumoniae	профілактика стрептококової інфекції (поліса, ліо- філізірованная)
2	Mycobacterium bovis	профілактика туберкульозу (Жива, ліофілізіро- ванна)
3	Neisseria Meningitides	профілактика менінгококової інфекції (Поліса, ліо- філізірованная)

Таблиця 13 - Специфічні методи для ідентифікації антигенів вакцин

Назва методу	Принцип методу	Визначається антиген	Результат ідентифікації
1	2	3	4
<i>Імунопреципітація в гелі</i>	Реакція між антигеном і антитілом	Анатокіни дифтерійний і правцевий. антигени коклюшу	Лінії преципітації між анатоксинами і специфічними антитоксическим и сироватками
флокуляція	Реакція між антигеном і антитілом	Анатокіни дифтерійний і правцевий	Освіта флокулята між анатоксинами і специфічними антитоксическим и антитілами
1	2	3	4
ВЭЖХ	Поділ антигенів за молекулярними масам	Антиген и бактерії коклюшу	Виявлення антигенів кашлюкових бактерій
Електрофорез в ПААГ	Отримання електрофоретичного профілю	Антиген вірусу гепатиту В	виявлення HBsAg вірусу гепатиту В
імуноферментний аналіз	Реакція між антигеном і антитілом	Антиген вірусу гепатиту В. Антигени бактерії коклюшу. Антигени вірусу поліомієліту	Виявлення антигенів вірусу гепатиту В. Виявлення антигенів вірусів поліомієліту 1, 2, 3 типу, виявлення антигену коклюшу

3	Імуноелектрофорез	Реакція між антигеном і антитілом	антиген и вакцин	Виявлення антигенів різних ВІ] Е СОВ І бактерій
	імунохімічний аналіз	реакція між антигеном і антитілом	антиген и Ніб	Виявлення полісахаридного антигену PRP
	нейтралізація вірусів	реакція між вірусом і специфічeskімі антитілами	Віруси кору, краснухи та паротиту в живих вакцинах	підтвердження Вірус у вакцині

Перелік вакцин, отриманих з використанням різних технологій

	технології вакцини	вид мікроорганізму
	2	3
	Класична стратегія для вірусів: -Аттенуація в клітинній культурі -Мутанта відібрані шляхом температурного впливу Вірус поліомієліту, вірус кору, вірус епідемічного паротиту, вірус краснухи, вірус вітряної віспи Ротавірус, вірус грипу	Класична стратегія для вірусів: -Аттенуація в клітинній культурі -Мутанта відібрані шляхом температурного впливу Вірус поліомієліту, вірус кору, вірус епідемічного паротиту, вірус краснухи, вірус вітряної віспи Ротавірус, вірус грипу
	Рекомбінантні віруси	Вірус простого герпеса (HSV
	Рекомбинантные вирусные векторы	Вірус коров'ячої оспи, аденовірус

<p>Классические стратегии для бактерий:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Бактериальные Туберкулез (бацилла Кальме 	<p>та –Герена) (БЦЖ), брюшной тиф (Salmonella typhi)</p>
<p>Рекомбинантные бактерии Холера (Vibrio cholerae)</p>	<p>рекомбинантные бактерии Холера (Vibrio cholerae)</p>
<p>Рекомбинантные бактериальные векторы Холера (Vibrio cholerae), брюшной тиф (Salmonella typhi), Shigella flexneri</p>	<p>Рекомбинантные бактериальные векторы Холера (Vibrio cholerae), брюшной тиф (Salmonella typhi), Shigella flexneri</p>
<p>Субъединичные / инактивированные вакцины (целый патогенный организм):</p> <ul style="list-style-type: none"> -Инактивированные бактерии -Инактивированные вирусы Коклюш (Bordetella pertussis), холера Вирус полиомиелита, вирус гриппа, вирус бешенства, вирус японского энцефалита, вирус гепатита А 	<p>Субъединичные / инактивированные вакцины (целый патогенный организм):</p> <ul style="list-style-type: none"> -Инактивированные бактерии -Инактивированные вирусы Коклюш (Bordetella pertussis), холера Вирус полиомиелита, вирус гриппа, вирус бешенства, вирус японского энцефалита, вирус гепатита А
<p>Вакцины на основе белков:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Природные -Химически инактивированные -Генетически инактивированные -Рекомбинантный полипептид -Гибридный белок -Конъюгат -Клеточный эпитоп Вирус гепатита В (HBV), ко 	<p>Клюш Столбняк (Clostridium tetani), дифтерия (Corynebacterium diphtheriae), коклюш Коклюш, дифтерия Болезнь Лайма (Borrelia burgdorferi), НВМ Малярия Малярия Рак, HBV</p>

	<p>Вакцини на основі полісахаридов:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Простой полісахарид -Кон'югат <i>Haemophilus influenza</i> тип b (Hib), менингококковий (<i>Neisseria meningitides</i>), пневмококковий (<i>Streptococcus pneumoniae</i>) Hib 	<p>Вакцини на основі полісахаридов:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Простой полісахарид - Кон'югат <i>Haemophilus influenza</i> тип b (Hib), менингококковий (<i>Neisseria meningitides</i>), пневмококковий (<i>Streptococcus pneumoniae</i>) Hib
	<p>Вакцини на основі ДНК-Грипп, гепатит В</p>	<p>Вакцини на основі ДНК Грипп, гепатит В</p>

Стратегічне рішення з приводу розробки живий, суб'єдинічної / інактивованої вакцини або вакцини на основі нуклеїнової кислоти необхідно приймати, зваживши епідеміологічні, патогенетичні і імунобіологічні аспекти розглянутих інфекцій або по-новому стимулу у тварин. Оптимізація експресії рекомбінантних поліпептидів залишається важливою технічною задачею для всіх цих живих вірусних векторів. РНК-віруси можуть бути сконструйовані аналогічним чином. Sindbis і інші авіруси користувалися підвищеною увагою завдяки їх широкому спектру, здатності інфікувати клітки, що не, а також потенційного високого рівня експресії в перерахунку на клітку. З огляду на ці властивості, з Sindbis була розроблена вакцина на основі нуклеїнової кислоти. Бактеріальні вектори. На основі патогенних бактерій можна сконструювати живі рекомбінантні вектори для експресії чужорідних поліпептидних антигенів. Найбільш частим способом застосування було конструювання шлункових патогенних організмів таким чином, щоб вони могли індукувати імунітет слизових оболонок проти чужорідного поліпептиду при його пероральному введенні. У сфері розробки живих бактеріальних векторів максимальних зусиль, що стосуються розробки штамів, імунології, молекулярних розробок і клінічних випробувань були сконцентровані на *S. typhi*, *V. Cholera* і *S. Flexneri* також були перетворені в рекомбінантні вектори для перорального введення для клінічної оцінки. Проблемою таких живих атенуірованих векторів залишається збереження достатньої вірулентності для реплікації в травному тракті і експресія чужорідних поліпептидів на необхідному рівні, а також досягнення достатньої атенуації для забезпечення гарної переносимості. Здатність деяких з цих видів бактерій репліцироваться всередині клітини може посилити здатність експресіруємих чужорідних поліпептидів стимулювати клітинні імунні реакції проти відповідних патогенних організмів.

Суб'єдинічні / інактивовані вакцини

Перевага субодиничних вакцин полягає в їх нездатності розмножуватися в організмі господаря. Зазвичай вони добре переносяться, особливо вакцини, котрі піддаються багатоступінчастій очищенню з метою видалення інших макромолекул. Імуногенність такої вакцини можна посилити шляхом її спільного введення з ад'ювантом або за допомогою сісте199ми доставки. Проте, слід починати програму розробки з розумінням того, що для досягнення тривалого захисного імунітету потрібно неодноразове введення вакцини, часто - з подальшим введенням бустерних доз. Такі вакцини зазвичай функціонують шляхом стимулювання гуморальної імунної реакції, а також ініціювання імунологічної пам'яті. Необхідно відзначити, що конструювання рекомбінантних вірусних вакцин включає в себе:

- клонування і експресію в різних векторах індивідуальних вірусних генів з метою отримання вірусних антигенів в різних експресійних системах в якості високоочищених вакцинних препаратів;

- клонування і експресію індивідуальних вірусних антигенів з метою отримання вірусоподібних частинок;

- клонування і експресію вірусних антигенів в еукаріотичних векторах з метою отримання ДНК-вакцин. Для розгляду даного питання зупинимося на протигрипозних вакцин. На поверхні вірусної частки локалізуються такі білки антигени: гемаглютинін (Н), нейрамінідаза (N) і білок М2. Встановлено, що в «голівці» апікальної частини молекули Н локалізується 5 антигенних сайтів і віруснейтралізуючі активність антитіл пов'язана з імунною відповіддю на ці сайти. Антитіла до Н блокують взаємодію вірусу з клітинними рецепторами, тобто інфікування клітин. Антитіла до N блокують виділення вірусів інфікованими клітинами (тобто поширення інфекції). Антитіла до білку М2 також в значній мірі блокують від'єднання інфекційних вірусних частинок від мембран інфікованих клітин. Виходячи з вищесказаного ясно, що з трьох основних поверхневих білків принципове значення має Н. Це і лежить в основі технології виробництва субодиничних вакцин, що містять переважно Н. Вважається, що імунітет на N має допоміжне значення. Білок М2 в силу високої консервативності став об'єктом для конструювання універсальної вакцини проти грипу А.Таким чином, рекомбінантні вакцини з використанням індивідуальних компонентів вірусів грипу типу А орієнтовані головним чином на ключовий і сильно варіабельний компонент вірусу - молекулу Н. З внутрішніх антигенів вірусної частки активно розглядаються в якості матеріалу для отримання вакцин білки NP, M1, NS

Цілісні патогенні організми.

Старий підхід до виготовлення інактивованих вакцин полягає в використанні цілих бактерій або вірусів з метою стимулювання утворення

антитіл до багатьох антигенів, деякі з яких зможуть нейтралізувати патогенний організм.

Бактерії.

Ці вакцини виготовляються шляхом культивування бактерій, збору клітин і їх інактивації за допомогою нагрівання або хімічних агентів, таких як мертиолят або фенол, формалін. Кінцева вакцина не піддається подальшій очищенню. Завдяки відсутності очищення таких вакцин, які містять практично всі бактеріальні клітинні компоненти (а також продукти метаболізму і слідові кількості поживних середовищ), реактогенність таких вакцин при їх парентеральному введенні (наприклад, *Bordetella pertussis* або *St. aureus*) зазвичай вище, ніж у інших типів вакцин. З іншого боку, інактивовані цілюноклітинні вакцини *V. cholerae* Ентеротоксигенне *Escherichia coli* (ETEC) добре переносяться при пероральному введенні. Пероральна інактивована цілюноклеточная вакцина холери (WCC), позбавлена токсину (і його токсичного впливу) виявилася добре переносяться, а її рівень ефективності склав приблизно 60% при випробуванні на популяції високого ризику протягом 3х років. Для стимуляції антитіл, які зможуть нейтралізувати токсини і підвищити ефективність, рекомбінантний В суб'єдніця токсину, що не володіє активністю токсину, незалежно експресується, очищається, і знову додається до вакцини WCC. Показано, що ця комбінована вакцина WCC + гтоксін має дещо вищий рівень ефективності, ніж сама вакцина WCC. Віруси. Деякі інактивовані вірусні вакцини використовуються вже протягом десятиліть, і зазвичай добре переносяться.

Оскільки віруси при вирощуванні *in vitro*, як правило, виходять в клітинну культуральне середовище, то збирають середу від інфікованих культур, що не містить клітин. Великий розмір часток вірусів в порівнянні з іншими макромолекулами середовища дозволяє легко відокремити частки з використанням простих технологій очищення, побудованих на поділі часток за розміром. До прикладів таких вакцин відносяться вірус поліомієліту, вірус грипу, вірус сказу і вірус японського енцефаліту. В альтернативному підході, що застосовується в разі вбитою вірусною вакцини гепатиту А (HAV), інфіковані клітини піддають лизису і проводять очистку вірусних частинок. Вірусні частинки інактивуються хімічним шляхом, зазвичай за допомогою обробки формаліном, а потім їх дія може посилюватися за рахунок ад'ювантов (наприклад, гідроксиду або фосфату алюмінію). Можливе використання ліпосом для посилення імуногенності вірусних вакцин. Захисні епітопи на поверхні багатьох не капсульованих дрібних вірусів, що стимулюють захисну імунну реакцію часто мають конформаційну структуру, будучи сформованими з високоорганізованої сукупності структурних білків в антигенні структури. Для більшості перерахованих вірусів, для яких були розроблені і зареєстровані інактивовані вакцини, виявилось неможливим

повністю відтворити конформацію таких епітопів за допомогою інших технологій, наприклад, рекомбінантних поліпептидів. Інактивовані вірусні вакцини зазвичай мають високу імунологічну активність, наприклад, 1 доза вакцини гепатиту А забезпечує захист в кількості 50 нг. Таким чином, ця класична стратегія, що характеризується бездоганною історією створення добре переносяться і ефективних вакцин, залишається вельми перспективною технологією, яка обирається для багатьох вірусних вакцин.

білкові вакцини

Розробка вакцини на основі білка є кращою стратегією для багатьох патогенних організмів, в яких поліпептид містить захисні епітопи, враховуючи вищевказані моменти, що стосуються інактивованих вакцин. Підходи, що беруть за основу білок, побудовані на генетичних, біохімічних і імунологічних методиках, що дозволяють виявляти захисні епітопи і їх відповідні поліпептиди як можливі вакцинні антигени.

Генетична інактивація.

Хімічна процедура отримання анатоксинів має певні недоліки, в тому числі зміна захисних епітопів, що веде до зниження імуногенності, і потенційний повернення до біологічно активного токсину (реверсія). Для отримання стабільних анатоксинів коклюшу створювалася мутація кодонів амінокислот, необхідних для біологічної активності токсину (аденозиндифосфат (ADP) рибозілтрансфераза). Змінений ген замінив собою нативний ген в батьківському організмі, на основі якого потім був отриманий імуногенний, але стабільно інактивований анатоксин кашлюку. У вдосконаленому варіанті цієї стратегії в токсин коклюшу були введені дві мутації для забезпечення неможливості повернення в початковий стан. Цей подвійний мутант коклюшного токсину, який також обробляється формаліном в більш м'яких умовах, щоб поліпшити його імуногенність або стабільність, є компонентом ацеллюлярної вакцини кашлюку. У близькому до цього варіанті застосування, мутантні культури *S. diphtheriae* скрінувались для виявлення секреції ферментативно неактивних, але антигенних молекул анатоксину. Після дующее клонування і секвенування одного з таких мутантних генів токсину виявило мутацію однієї амінокислоти в ферментативно активної сайті (також ADPрибозілтрансферази). Цей генетичний анатоксин (CRM197) 47 є белкомносітелем ліцензованої кон'югованої вакцини *H. influenzae* тип b (Hib). Дана технологія застосовувалася також до токсину *V. Cholerae* (CT) і ін. Рекомбінантні поліпептиди. Першим застосуванням технології РДНК при виробництві вакцин було створення вакцини проти гепатиту В. З урахуванням того, що отриманий з крові HBsAg проявив себе як добре переноситься і ефективна вакцина, ген S, який кодує HBsAg, експресували в пекарських дріжджах *S. cerevisiae*, що призводило до утворення частинок HBsAg розміром 22 нм всередині клітин. Поверхня HBsAg подібна поверхні

віріонів HBV. Вакцина, отримана з дріжджів, доступна у всьому світі у великих кількостях, в значній мірі витіснила настільки ж ефективну і добре переноситься вакцину на основі плазми. Крім того, HBsAg експресували в трансгенних листі тютюну і бульбах картоплі. Виділений і очищений HBsAg зберігав високу імуногенність. Зараз проводяться численні наукові дослідження і розробки застосування технології РДНК до виробництва білків - можливих компонентів вакцин. Основний поверхневий білок *Borrelia burgdorferi* (OspA), експресувати в *E. coli* у вигляді рекомбінантного ліпопротеїну, був зареєстрований в якості вакцини проти хвороби Лайма. Отримані рекомбінантним шляхом глікопротеїни HSV, експресувати в клітинах яєчників китайського хом'яка (CHO) і введені у вакцину, були досліджені в клінічних випробуваннях. Найчастіше великі частки більш імуногенність, ніж окремі поліпептиди. Більш того, як і в разі VLP HBsAg, частки зазвичай стимулюють вироблення антитіл на конформаційні епітопи частки, в той час як ізольовані поверхневі поліпептиди частки можуть не стимулювати продукування таких антитіл. Віріон людського вірусу папіломи (HPV) -це високоорганізована структура, основним білком якої є L1. Експресія L1 в клітині (наприклад, *S. cerevisiae*) призводить до утворення VLP L1, який після імунізації стимулює вироблення антитіл, які зв'язуються з віріонами. Рекомбінантні VLP ротавірусу і парвовірусу також експресуватися у вигляді потенційних батьківських вакцин. Багато клітини господарів використовувалися для експресії гетерологічних рекомбінантних генів. На додаток до зазначених раніше (*E. coli*, *S. cerevisiae* і CHO), були розроблені системи експресії для клітин з інших видів бактерій і дріжджів, а також інших стабільних клітинних ліній (CCL) ссавців, наприклад, клітини нирки африканської зеленої мавпи (Vero). Цілі тварини і рослини також можуть використовуватися в якості господарів для рекомбінантної експресії. В цілому, більш дрібні білки, які не потребують посттрансляційних модифікацій, можуть ефективно експресуватися у вихідній формі в мікробних системах експресії. На відміну від цього, поліпептиди, яким для імуногенності потрібні Посттрансляційні модифікації, наприклад гликозилювання для належної імуногенності, експресуються в CCL ссавців, здатних до правильного здійсненню таких модифікацій. Новим підходом в області рекомбінантних вакцин є застосування часток дріжджів Туv як убитих носіїв чужорідних білків. Дріжджова Ту-це частка, яку збирають в *S. cerevisiae*, яка не здатна до реплікації в організмі ссавців. Можна експресувати ген, що кодує чужорідний білок, спільно з генами Туv таким чином, що чужорідні білки разом з білками Туv будуть збиратися в змішані частинки. Завдяки тому, що чужорідні білки експресуються на поверхні цих великих частинок, їх імуногенність як вакцинних антигенів може бути посилена. Носії, засновані на білках. У багатьох випадках було можливо ідентифікувати в складі поліпептиду Вклеточного епітопи, проти яких

спрямована дія нейтралізують антитіл. Багато Вклеточного епітопи є конформаційними, що утворюються внаслідок накладання в тривимірному просторі залишків амінокислот з різних частин поліпептиду, що означає, що даним епітопів для належної іммуногенної презентації потрібен повний поліпептид. На відміну від цього, інші пептидні епітопи лінійні за своєю природою, і володіють усіма антигенними властивостями навіть у вигляді коротких лінійних послідовностей довжиною близько 6-20 послідовних амінокислотних залишків поліпептиду. Деякі лінійні епітопи мають слабку іммуногенність при їх презентації на тлі повного поліпептиду. В інших випадках природні пептиди були б ефективними вакцинами антигенами, якби їх можна було зробити досить іммуногенними. Лінійні В клітинного епітопи даного типу були визначені для малярійного білка сіркумспорзойте (CS) (повторна послідовність, що складається з 4-х амінокислотних залишків) і для білка пілус *Pseudomonas aeruginosa*. Обидва ці поліпептиду містять лінійні епітопи, розпізнавані антитілами, які нейтралізують відповідні патогенні мікроорганізми, проте цілі поліпептиди лише слабо стимулюють вироблення таких антитіл. Цікаво припущення, що це явище може являти собою механізм, за допомогою якого ці та інші патогенні організми еволюціонували з метою уникнення іммунологічного контролю, роблячи свої епітопи нейтралізації менш іммуногенними. Застосування таких стратегій (злитий білок, кон'югат, комплексний пептид) до слабо іммуногенні лінійним епітопів призвело до іммуногенним презентацій, стимулюючим значно більш високі титри нейтралізуючих антитіл в порівнянні з тими, які стимулюються епітопами, презентувати на тлі природного цілого поліпептиду. Проте, найбільш ефективна стратегія за показниками кінцевої клінічної користі повинна визначатися в залежності від конкретного випадку. Носії, засновані на злитому білку. Іммуногенність лінійних епітопів можна підвищити за допомогою генетичного злиття певних епітопів з белкомносітелем, який формує велику частку з метою поліпшення імунної презентації пептиду. Двома зазвичай використовуваними білками-партнерами по злиттю такого типу є HBsAg і ядерний білок гепатиту В (частка розміром 28 нм, яка кодується вірусом гепатиту В). Злиття може відбуватися по N-кінця, Сконцу або внутрішньої частини поліпептидного послідовності белкапартнера, в залежності від того, яке розташування забезпечує найкращу іммуногенну презентацію при збереженні ефективного формування частинок. Носії, засновані на кон'югати. Пептид може бути хімічно кон'югованими з белкомносітелем. Пептидна послідовність синтезується хімічним шляхом разом з реактивним амінокислотним залишком, за допомогою якого відбувається кон'югація з білком носієм. Найбільш часто використовуваними белкамносітелеми в кон'югати є бактеріальні білки, з якими часто стикається людина, такі як стовбняковий токсин (ТТ), кон'югат якого з малярійних епітопом CS пройшов клінічно випробування. Носії, засновані на

комплексному пептиді. Можна синтезувати мультімери пептидного послідовності для спільного зв'язування в повторювані масиви, що застосовується для пептидних епітопів малярійного CS і gp120 HIV1. Носії, засновані на Т-клітинних епітопів. Пептидні епітопи, розпізнавані CTL, можуть бути корисними імуногенний для профілактики інфекцій, що викликаються такими збудниками, як HIV, або для імунотерапії хронічних захворювань, таких як гепатит В. Епітопи пептиду CTL зазвичай є слабкими імуногенний. Тому для імунотерапевтичних вакцини гепатиту В епітоп CTL з ядерного білка HBV був модифікований шляхом ковалентного зв'язування з Т-хелперно епітопом (з токсоид правця), а також з двома молекулами пальмітинової кислоти. В ході клінічних випробувань було показано, що дана вакцина має достатню імуногенність для стимуляції HBVспецифічних CTL і CTL пам'яті. Меланомаспецифічні Т-клітинні епітопи у вигляді пептидів використовувалися в імпульсній обробці дендритних клітин *in vitro* для доставки пацієнтові. При цьому спостерігалось деяке зниження розміру пухлини. Носії, засновані на полісахаридах. Ряд грамнегативних і грампозитивних бактерій утворюють капсульну структуру, яка містить полісахариди (ПС). Здатність бактерій до утворення капсул в значній мірі визначає взаємодію між бактеріальними клітинами і організмом хазяїна при розвитку інфекційного процесу. Капсульні антигени грають важливу роль в вірулентності і імуногенності бактерій. Є залежність між наявністю у бактерій капсули і їх токсичністю. Встановлено, що гемолітична активність також властива переважно капсульній формам бактерій. Капсульні антигени здатні пригнічувати фагоцитоз бактерій і створювати умови для розмноження збудників інфекції в організмі господаря. Капсульні полісахариди несуть в собі основну серологічну антигенність бактеріальних видів і успішно взаємодіють з антитілами до даних бактеріям. Такі полісахариди являють собою ефективні вакцинні антигени. Як приклад використання полісахаридних вакцин можна привести препарат, що містить очищені капсульні полісахариди *Streptococcus pneumoniae* (Pneumo 23 -PPV 23). Вакцина полівалентна і містить полісахариди з 23х серотипів бактерій. Вакцина PPV 23 (Sanofi Pasteur) ефективна проти 90% нечутливих до пеніциліну пневмококів і 96% пневмококів, що викликають захворювання. У деяких випадках для конкретного патогенного організму є єдиний серотип полісахариду, наприклад, *Haemophilus influenzae* типу b (HIb) проти інвазивного менінгіту *H. Influenzae* типу b. В цьому випадку можна створити моновалентну вакцину. Однак в більшості випадків мають місце численні серотипи капсульних полісахаридів (близько 90 для *Streptococcus pneumoniae*), і такі вакцини повинні бути мультівалентними, щоб мати досить високим рівнем загальної ефективності. Ці вакцини першого покоління були просто очищеними полісахариди і володіли низькими протективними властивостями.

Гемофільна інфекція (збудник - *Haemophilus influenzae b*) є основною причиною гнійного менінгіту у дітей до двох років життя, який часто призводить до серйозних неврологічних ускладнень і летальних наслідків. Крім менінгіту *Haemophilus influenzae b* викликає перикардити, ендокардити, перитоніти та інші гнійно-септичні захворювання. Зараження відбувається повітряно-крапельним шляхом. За даними ВООЗ щорічно від даних інфекцій помирає близько 500000 дітей у всіх країнах світу. У багатьох, якщо не в більшості вивчених інкапсульованих бактерій, антитіла, спрямовані проти капсульних ПС, здатні захищати від інфекції. Ці спостереження дозволили використовувати капсульні ПС як вакцинних антигенів.

Індивідуальні полісахаридні вакцини

Нативний капсульний ПС містить до сотень повторюваних одиниць, характерних для кожного виду бактерій і антигенного підтипу, в якому кожен мономер складається з поєднання моносахаридів, фосфатних груп і дрібних органічних компонентів. ПС вивільняються організмом в міру його зростання і збираються з культурального середовища. Ці препарати ПС зазвичай мають імуногенність для дорослих і дітей старше 2-х років і стимулюють вироблення антитіл, які можуть опосередковувати опсонізації організму, таким чином, захищаючи його від інфекції. Вакцини ПС ліцензовані для Hib64 (моновалентні для серотипу b), *Neisseria meningitidis* (квадрівалент) і *Streptococcus pneumoniae* (23валентний). Недолік цих вакцин полягає в тому, що ПС, будучи імуногенний, незалежними від Т-клітин (ТІ), мають слабку імуногенність або не володіють імуногенністю у дітей молодше 2-х років, і не стимулюють імунологічну пам'ять у старших дітей і дорослих. Кон'юговані вакцини. Хоча діти молодше 2-х років не можуть ефективно розпізнавати іммуногени ТІ, вони можуть проявляти імунологічні реакції на залежні від Т-клітин (ТD) іммуногени, наприклад, білки. Хімічна кон'югація ПС з білком носієм перетворює ПС з ТІ в ТD іммуноген. Внаслідок цього, вакцини у вигляді кон'югату Ps-білок можуть стимулювати захисний імунітет IgG і імунологічну пам'ять у немовлят і маленьких дітей. Дана стратегія особливо важлива для інкапсульованих бактерій, таких як Hib і *S. pneumoniae* (пневмококові; Pn), внаслідок переважання інвазивних захворювань, що викликаються цими бактеріями у дітей молодше двох років, для яких вакцина ПС неефективна. Перша ліцензована вакцина *Haemophilus influenzae b* (Hib) містила полірібосілрібатолфосфат (PRP), полісахарид капсули мікроорганізму. Однак полісахаридная вакцина була недостатньо імуногенною для дітей молодше 2-х років. У зв'язку з цим вона була дозволена до використання тільки для дітей старше 18 місяців. Вивчення в Фінляндії (1977 р) підтвердило значне зниження Hib-захворювань і ефективність PRP-вакцини в 90% випадків. У той же час вивчення вакцини в США показало її менш надійну ефективність. В результаті цих досліджень і суттєвої потреби мати вакцину для малолітніх дітей почалися розробки зі

створення кон'югованих вакцин. Такі кон'юговані вакцини, в яких НІВ-полісахарид пов'язаний з білком, мають ряд переваг:

- індукують високі титри антитіл;
- більш імуногенність для малолітніх дітей;
- демонструють високий імунну відповідь при ревакцинації. У 1989 році було дозволено до використання у дітей молодше 18 місяців чотири кон'югованих вакцин:

- PRPD -містять полісахарид, кон'югований з дифтерійним анатоксином;

- НьОС -містять полісахарид, кон'югований з нетоксичним мутантним дифтерійним токсином, відомим як CRM197;

- PRPOMR -містять полісахарид, кон'югований з білком зовнішньої мембрани *Neisseria meningitidis*;

- PRPT -містять полісахарид, кон'югований з правцевим анатоксином.

Доза кожної вакцини становить 0, 5 мл. Вакцини містять різну кількість полісахариду і кон'югованого білка, причому співвідношення полісахариду до білка значно відрізняються (див. Табл. 14). Вивчення імуногенних властивостей чотирьох вакцин в процесі трьох імунізацій продемонструвало суттєві відмінності в продукції антитіл

Таблиця 14 –Состав комбинированной вакцины *Neomophilus influenzae b* (НІВ

Названи е вакцины	Количество протеина в 1 дозе, мкг Соотношение полисахарид	Названи е протеин	Количество протеина в 1 дозе, мкг	Соотношение полисахарид – протеин
PRP	25	Анатоксин дифтерийный	18	1,38
НьОС	10	CRM197	25	0,4
PRP-Т	10	Анатоксин столбнячный	20-30	0,33–0,5
PRP-OMP	7,5	<i>Neisseria meningitidis</i>	125	0,06

Розробка складу вакцин

Імунологічна ефективність вакцин (крім живих) може підвищуватися шляхом підбору складу, що стосується остаточної форми вакцини, яка повинна вводитися *in vivo*. На додаток до «активної речовини» (антиген або ДНК), склад може включати в себе ад'ювант і / або систему доставки на

додаток до наповнювачів. Ад'ювант - це речовина, яка стимулює підвищений гуморальний і / або клітинну імунну відповідь на спільно введений антиген. Система доставки є носій для забезпечення презентації вакцини клітинам імунної системи або для стабілізації і вивільнення антигенів протягом тривалого періоду часу. Ад'юванти і системи доставки можуть перекриватися за структурою і функціями. Очікується, що багато майбутніх вакцини будуть містити нові ад'юванти і системи доставки.

Ад'юванти.

Солі алюмінію, такі як гідроксид або фосфат, на даний момент є єдиними ад'ювантами, широко ліцензованими для використання людьми. Ці ад'юванти вже використовується протягом десятиліть в вакцинах, які вводилися більш ніж 1 млн. Людей во всьому світі. Вакцинний антиген утворює стабільний зв'язок з сіллю алюмінію за рахунок іонних зв'язків, і утворює макроскопічну суспензію в розчині. Цей ад'ювант переважно стимулює імунну реакцію типу Th2, тобто засновану на антитіла, що не є корисним у випадках, коли для захисту необхідний опосередкований клітинами імунну відповідь. Хоча солі алюмінію корисні для деяких вакцин (наприклад, гепатит В, коклюш), в разі інших вакцинних антигенів вони не володіють достатньою потужністю, щоб стимулювати імунну відповідь, опосередкований антитілами, досить високий для оптимальної ефективності. Показано, що солі алюмінію не володіють користю для презентації вакцин, що вводяться пероральним або інтраназальним шляхом. Тому багато хімічних речовин, біохімічні речовини з природних джерел, а також білки, що володіють активністю по відношенню до імунної системи (цитокіни) досліджувалися в якості потенційних ад'ювантів. Ад'ювантна здатність практично всіх відомих складів пов'язана з місцевими або системними побічними ефектами, які можуть бути засновані на певному механізмі, або бути неспецифічними. Ідеальний ад'ювант повинен зберігати баланс між ступенем побічних ефектів і посиленням імунної відповіді. Деяким бактеріальним токсинів з АДФ-рибозилують активністю приділялась значна увага при їх розгляді в якості ад'ювантів слизових оболонок в молекулярної інженерії. Зокрема, було показано, що правцевий токсин володіє активністю ад'юванта слизових оболонок для спільно вводимо антигену, презентіруемого пероральним, назальним, вагінальним або ректальним шляхами, як було згодом показано для термолабільного токсину (LT) ЕТЕС. Ці токсини складаються з каталітичної субодиниці А і пентамерної субодиниці В, яка зв'язується з гангліозид GM1 на багатьох типах клітин. Однак, і правцевий токсин, і LT токсичні для людей, особливо при пероральному застосуванні, в результаті якого вони викликають діарею. Для поділу токсичності і ад'ювантної здатності правцевого токсину і LT були створені точкові мутації, які призвели до зниження або виключення АДФ-рибозилують активності, зниження токсичності, і помітного збереженню ад'ювантної здатності у

мишей. Альтернативним підходом була елімінація Всуб'єдінці і її заміна на синтетичний димерна пептид, отриманий на основі білка A Staphylococcus aureus, який зв'язується з імуноглобуліном (Ig). Безсумнівний інтерес представляють дані про можливість використання в якості ад'ювантів гангліозидов GT1 і GD1a, які при введенні тваринам їх комплексу з вірусом сказу SVS підвищували імуногенність вірусу і знижували летальність заражених вірусом мишей. Переносимість та ефективність ад'ювантов, створених генно-інженерним шляхом, мають оцінюватися на людях. Тема ад'ювантов докладно розглянута нами в навчальному посібнику: Краснопільський Ю. М., Борщевська М. І. «Фармацевтична біотехнологія: Технологія виробництва імунобіологічних препаратів».- Харків, НТУ «ХП», 2009 р

Системи доставки.

Крім презентації антигену або ДНК клітин імунної системи, система доставки може здійснювати інші ключові функції. Може мати місце «ефект депо», коли підтримується наявність антигену в певному місці in vivo для постійної стимуляції імунної системи. Може відбуватися посилення стабільності вакцини in vivo. Для вакцин, що вводяться через слизові оболонки, система доставки може забезпечити ефективну презентацію і поглинання М-клітинами, після чого відбувається трансцитозу в Пейєрових бляшки і презентація лімфоцитів з метою індукції імунітету слизових оболонок. Для деяких складів вакцина може підтримуватися in vivo всередині фізичної структури протягом значного періоду часу, протягом якого вона вивільняється повільно або в пульсуючому режимі, щоб вона могла функціонувати як одноразово вводиться вакцина. Широко ліцензованих систем доставки не існує. Напрацювання клінічного і фармацевтичного досвіду з новими системами доставки і ад'ювантами залишається ключовою метою в даній області.

Солі алюмінію, такі як гідроксид або фосфат, на даний момент є єдиними ад'ювантами, широко ліцензованими для використання людьми. Ці ад'юванти вже використовуються протягом десятиліть в вакцинах, які вводилися більш ніж 1 млн. Людей во всьому світі. Вакцинний антиген утворює стабільний зв'язок з сіллю алюмінію за рахунок іонних зв'язків, і утворює макроскопічну суспензію в розчині. Цей ад'ювант переважно стимулює імунну реакцію типу Th2, тобто засновану на антитілах, що не є корисним у випадках, коли для захисту необхідний опосередкований клітинами імунну відповідь. Хоча солі алюмінію корисні для деяких вакцин (наприклад, гепатит В, коклюш), в разі інших вакцинних антигенів вони не володіють достатньою потужністю, щоб стимулювати імунну відповідь, опосередкований антитілами, досить високий для оптимальної ефективності. Показано, що солі алюмінію не володіють користю для презентації вакцин, що вводяться пероральним або інтраназальним шляхом. Тому багато

хімічних речовин, біохімічні речовини з природних джерел, а також білки, що володіють активністю по відношенню до імунної системи (цитокіни) досліджувалися в якості потенційних ад'ювантів. Ад'ювантна здатність практично всіх відомих складів пов'язана з місцевими або системними побічними ефектами, які можуть бути засновані на певному механізмі, або бути неспецифічними. Ідеальний ад'ювант повинен зберігати баланс між ступенем побічних ефектів і посиленням імунної відповіді. Деяким бактеріальним токсинам з АДФ-рибозилують активністю приділялась значна увага при їх розгляді в якості ад'ювантів слизових оболонок в молекулярній інженерії. Зокрема, було показано, що правцевий токсин володіє активністю ад'юванта слизових оболонок для спільно вводимо антигену, презентіруемого пероральним, назальним, вагінальним або ректальним шляхами, як було згодом показано для термолабільного токсину (LT) ЕТЕС. Ці токсини складаються з каталітичної субодиниці А і пентамерної субодиниці В, яка зв'язується з гангліозид GM1 на багатьох типах клітин. Однак, і правцевий токсин, і LT токсичні для людей, особливо при пероральному застосуванні, в результаті якого вони викликають діарею. Для поділу токсичності і ад'ювантної здатності правцевого токсину і LT були створені точкові мутації, які призвели до зниження або виключення АДФ-рибозилують активності, зниження токсичності, і помітного збереження ад'ювантної здатності у мишей. Альтернативним підходом була елімінація В суб'єдінці і її заміна на синтетичний димерна пептид, отриманий на основі білка А *Staphylococcus aureus*, який зв'язується з імуноглобуліном (Ig). Безсумнівний інтерес представляють дані про можливість використання в якості ад'ювантів гангліозидов GT1 і GD1a, які при введенні тваринам їх комплексу з вірусом сказу SVS підвищували імуногенність вірусу і знижували летальність заражених вірусом мишей. Переносимість та ефективність ад'ювантів, створених генно-інженерним шляхом, мають оцінюватися на людях.

Системи доставки.

Крім презентації антигену або ДНК клітин імунної системи, система доставки може здійснювати інші ключові функції. Може мати місце «ефект депо», коли підтримується наявність антигену в певному місці *in vivo* для постійної стимуляції імунної системи. Може відбуватися посилення стабільності вакцини *in vivo*. Для вакцин, що вводяться через слизові оболонки, система доставки може забезпечити ефективну презентацію і поглинання М-клітинами, після чого відбувається трансцитозу в Пейєрових бляшки і презентація лімфоцитів з метою індукції імунітету слизових оболонок. Для деяких складів вакцина може підтримуватися *in vivo* всередині фізичної структури протягом значного періоду часу, протягом якого вона вивільняється повільно або в пульсуючому режимі, щоб вона могла функціонувати як одноразово вводиться вакцина. Широко ліцензованих систем доставки не існує. Напрацювання клінічного і фармацевтичного

досвіду з новими системами доставки і ад'ювантами залишається ключовою метою в даній області;

- нечутливість до антитіл проти вірусів, їх індукують.

Загальні ефекти в дії інтерферонів можуть проявлятися як противірусні, антипроліферативні і імуномодулюючі. Антипроліферативну дію інтерферонів зумовлена великою кількістю ефектів: інгібуванням трансляції, придушенням експресії клітинних протоонкогенів і інших ростових факторів клітини. Залежно від виду індуктора і типу кліток-продуцентів інтерферони поділяють на α , β і γ типи: α інтерферон або лейкоцитарний інтерферон продукують лейкоцити, які оброблені вірусами або іншими агентами (віруси, бактерії і їх токсини, полісахариди і синтетичні речовини); β інтерферон або фібробластний інтерферон продуціюється фібробластами, обробленими вірусами або іншими агентами; γ інтерферон або імунний інтерферон. Існує кілька підтипів інтерферонів. Молекули інтерферону мають відмінності в амінокислотном составе. По своїми структурними та функціональними властивостями інтерферони поділяють на дві групи. До інтерферонам I типу належать інтерферони альфа (α), бета (β), дельта (δ), епсилон (ϵ), каппа (κ), тау (τ), омега (ω). До інтерферонам II типу належить γ інтерферон. Всі інтерферони I типу мають дуже багато спільного в амінокислотних, і відповідно, в нуклеотидних послідовностях і структурі відповідних генів. У всіх видів тварин α інтерферон складається з багатьох індивідуальних представників (близько 20 підвидів), гомологічність між якими на рівні нуклеотидних послідовностей становить близько 80%. Всі гени цього сімейства формують кластер, згрупований переважно на одній хромосомі (у людини - хромосома 9). На відміну від α інтерферона у більшості видів тварин β -інтерферон існує у вигляді лише одного представника. Крім того, на відміну від α інтерферона, β -інтерферони представляють собою глікопротеїни. При аналізі бібліотеки ДНК були відкриті ω інтерферони. Вони присутні не у всіх видів тварин, а у людини з 6 представників цього сімейства тільки один існує в функціональній формі, а решта представлені псевдогенами. Тільки у корів і овець в епітелії ембріонів на ранніх стадіях ембріонального розвитку був виявлений τ інтерферон. Інтерферону не має структурної гомологічності з інтерферонами I типу. На відміну від генів інтерферону I типу, гени інтерферону II типу містять інтрони (ділянка ДНК, який є частиною гена, але не містить інформації про послідовність амінокислот білка). Інтерферони типу II виконують важливі функції регуляторів імунної системи. Інтерферон β , як і γ інтерферон є глікопротеїн. Інтерферони I і II типів об'єднані тільки по основній функції, а саме по противірусної активності. Як правило, в нормі клітини не продукують помітної кількості інтерферонів до тих пір, поки не відбудеться його індукція. Однак дуже невеликі кількості мРНК інтерферону можна визначити за допомогою високочутливих методів аналізу і без будь-якої явної індукції

інтерферону. Можна говорити про те, що при нормальних умовах, постійної продукції інтерферону не спостерігається. Необхідно зупинитися на механізмі дії інтерферонів. Самі по собі молекули інтерферону не впливають безпосередньо на внутрішньоклітинні процеси. Подібно гормонів, факторів росту та інших медіаторів міжклітинної взаємодії інтерферони взаємодіють лише з рецепторами, розташованими на поверхні клітинних мембран. Ендогенні інтерферони для прояву своєї біологічної активності повинні спочатку секретуватися клітинами, в яких вони синтезуються, а потім взаємодіють з поверхневими рецепторами. Після зв'язування інтерферону з рецепторами ініціюється ланцюг складних внутрішньоклітинних реакцій, які починаються передачею сигналу до ядра і активацією транскрипції генів, які відповідають на інтерферони. Транскрипція відповідних генів і синтез відповідних білкових продуктів призводить до вироблення ефекторних внутрішньоклітинних механізмів, що і є специфічним дією інтерферонів. У підсумку ми спостерігаємо ланцюжок численних ефектів інтерферону (як на клітинному рівні, так і на рівні організму в цілому), головним з яких є пригнічення реплікації вірусу в інфікованих клітинах. Рецептори інтерферону I і II типу різні, хоча і мають певну структурну спільність. Всі інтерферони I типу конкурують за одні й ті ж рецептори, в той час як взаємодія інтерферона з клітинами здійснюється за участю інших рецепторів. Під дією інтерферонів спостерігається продукція інших цитокінів, індукція специфічних ферментів, пригнічення проліферації клітин, імуномодуляція (посилення фагоцитарної активності макрофагів, специфічної цитотоксичності лімфоцитів по відношенню до клеткамішеням) і т.д. Сьогодні в Україні зареєстровано низку препаратів інтерферону: природні (α-інтерферони: людський лейкоцитарний інтерферон (ЗАТ «Біолік», ВАТ «Біофарма»); β-інтерферони: людський фібробластний інтерферон β 1b (Бетаферон - «Schering AG») і рекомбінантні

(Роферон - α 2a - «Roche», Інтрони - α 2b - «ScheringPlough», Лаферон - α 2b - «ФармБіотек»). Ми розглянемо методи біотехнологічного отримання ряду фармацевтичних препаратів, що містять інтерферони різних типів. Отримання лейкоцитарного α-інтерферона. Лейкоцитарний інтерферон відноситься до інтерферонів першого покоління і його виробництво до цих пір існує в ряді країн (Фінляндія, Україна, Росія та ін.). Ми розглянемо основні етапи отримання інтерферону з лейкоцитів крові людини під впливом вірусу - інтерфероногена. Перш за все, зупинимося на культивуванні вірусів за допомогою курячих ембріонів і контролі вірусів на культурі клітин в реакції гемаглютинації або визначення цитопатичної дії. Початок застосування курячих ембріонів для вирощування вірусів доводиться на 1928- 1935 рр. Цей період австрійський вчений Бернет назвав «першою золотою епохою» розвитку вірусології, оскільки вона відкрила можливість культивування вірусів на досить зручною лабораторною моделі,

як правило, інтактною щодо багатьох збудників інфекційних захворювань. По суті, це був перший біотехнологічний процес накопичення вірусів, придатний для промислового і масового виробництва вірусної біомаси. Країни, що розвиваються курячі ембріони є універсальним і простим для маніпуляцій об'єктом. Це пояснюється тим, що курячий ембріон містить чотири різних природних поживних субстрату для накопичення вірусів (амніотическую і аллантаісную рідину, хоріоналлантаісної оболонку і жовтковий мішок), клітини яких, як і клітини самого ембріона, є високочутливими до різних вірусів. Для отримання курячих ембріонів використовують яйця від білих леггорнів, що мають тонку шкаралупу. Вони можуть бути використані тільки протягом 10 днів після знесення. В іншому випадку розвиток зародка, незважаючи на запліднення, сильно затримується. Інкубацію проводять в звичайних інкубаторах з автоматичним пристосуванням для перевертання яєць, вентилятором, термометром і гігрометром, при температурі 37,2- 37,8 ° С і вологості 60- 70%. Роботу по зараженню курячих ембріонів проводять в асептичних умовах. В даний час, згідно з міжнародними вимогами (GMP), роботу з вірусодержачим матеріалом проводять в ламінарних боксах, забезпечених надмірним потоком стерильного повітря, що пройшло через мембранні фільтри. Для отримання вірусу, який використовується при виробництві інтерферону, зараження проводять в аллантаісную порожнину. Зараження здійснюють на 10- 11 добу розвитку ембріона. В області повітряної камери шкаралупу дезінфікують спиртовим розчином йоду і пропалюють. Потім проколюють її зондом і в отвір вносять 0,1 0,2 мл інокулята з відтитрувати вірусом. При цьому ін'єкційну голку вводять на 1 2 мм нижче кордону. Зараження проводять вірусом в певному титрі. Щоб мати стерильну суспензію вірусу до вірусного матеріалу додають по 100- 1000 мг стрептоміцину і 100- 1000 ОД пеніциліну. Після зараження ембріона отвір в шкаралупі заливають парафіном і яйця поміщають в інкубатор. Яйця з ембріонами витримують протягом 48 годин. Потім їх охолоджують протягом 3 4 годин при температурі 2 4 ° С і піддають овоскопії (від лат. Ovum - яйце і грец. Skopos - дивлюся). При виявленні загиблих ембріонів яйця вибраковують. Перед отриманням вірусу шкаралупу над повітряною камерою дезінфікують і відокремлюють пінцетом. Аллантаіснуюжідкість відсмоктують піпеткою або за допомогою спеціального апарату. З одного ембріона, в залежності від його віку, можна зібрати до 8- 10 мл аллантаісної рідини. Аллантаісную рідину можна отримати без еритроцитів, піддавши її центрифугуванню при 3000 об / хв протягом 20- 30 хвилин при температурі 2 6 ° С. Після отримання аллантаісної рідини її перевіряють на стерильність, а також на вміст вірусу і його кількості шляхом титрування, наприклад, в реакції гемаглютинації або визначення цитопатического дії. Для критерію оцінки біологічної активності вірусів використовують титрування на клітинній культурі - виявляють дозу,

що викликає цитопатичної ефект в 50 % заражених культур (ЦПД50) або визначають гемаглютинирующие одиниці вірусу. Одним із методів контролю активності вірусу є реакція гемаглютинації, заснована на здатності вірусу склеювати еритроцити. Для проведення реакції готують ряд послідовних дворазових розведень вірусу і додають до них певну кількість еритроцитів (наприклад, курячих). У тих зразках, де кількість вірусу було досить для повної аглютинації, спостерігається утворення конгломератів з еритроцитів, які швидко осідають на дно, утворюючи на всій поверхні червону плівку. При відсутності вірусу еритроцити осідають на дно у вигляді компактного осаду. За титр приймають граничне розведення віруссодержашей рідини, яка викликала аглютинацію еритроцитів на 50% . Іншим методом контролю активності вірусу є визначення ЦПД50. Цитопатична дію вірусу використовуюваного при виробництві лейкоцитарного інтерферону має бути 108- 109ЦПД50. Титрування вірусів проводять на культурі клітин, наприклад, фібробластів. Рідина, яка містить вірус, розводять методом послідовних розведень (на середовищі Голка, середовищі 199 і ін.) Від 101 до 1010. Зразки розведень вірусу 108- 1010в необхідній кількості переносять в лунки плашок, що містять культуру клітин. Плашки з культурою клітин, заражених вірусом, поміщають в термостат при температурі $(37 \pm 1) ^\circ \text{C}$ на 72 години. Потім проводять облік біологічної активності вірусу за ефектом цитопатичної дії. Титром вірусу вважається максимальне розведення вірусу, при якому ефект цитопатичної дії виражений в зразках з однаковим розведенням. Технологія отримання лейкоцитарного інтерферона складається з наступних стадій: 1. Для отримання лейкоцитарної плівки використовують кров або плазму донорів зі спеціалізованих центрів (в Україні це центри переливання крові), затверджених національним органом контролю імунобіологічних препаратів. Донори проходять контроль на контамінацію вірусними (гепатити В і С, ВІЛ та ін.) І бактеріальними агентами. Кров або плазму центрифугують при 1000- 1500 об / хв протягом 20- 25 хвилин при температурі $2- 8 ^\circ \text{C}$. Відокремлюють шар лейкоцитів зі значним вмістом еритроцитів. У ряді методів пропонується використовувати полівініловий спирт для кращого поділу компонентів крові. Кількість живих лейкоцитів в отриманій плівці повинно бути не менше 97%. Визначення нежиттєздатних лейкоцитів проводять фарбуванням еозинат натрія. 2. Еритроцити лизують за допомогою хлориду амонію (0,83% ий розчин при значенні рН - $7,0 \pm 0,5$) відповідно до методики Кентелла (1981 р.). 3. Оброблену хлоридом амонію лейкоцитарну плівку ресуспендірують в середовищі MEM, що містить бікарбонат натрію, антибіотик і сироватку крові людини, очищену від імуноглобулінів. 4. В якості праймера додають 20 ОД / мл сирого інтерферона (сирої інтерферон - це продукт отриманий в результаті процесу індукції, але неподвергшійся очищенню і обробці хлористоводневою кислотою при рН = 2,0 протягом 5 днів з метою інактивації вірусних агентів)

.5. Отриману суспензію інкубують в стерильних скляних ємкостях. Лейкоцити прайміруєт протягом 2- 3 годин при температурі $(36 \pm 0,5) ^\circ \text{C}$ і періодичному перемішуванні (50 200 об / хв), а потім додають вірусіндуктор (вірус Сендай або вірус хвороби Ньюкасла і ін.) До кінцевої концентрації 150 - 250 гемагглютінаційних одиниць / мл. Використовується аллантаїсна рідина з титром вірусу не менш 10^8 / мл ЦПД50. Після 1 год інкубації для прикріплення вірусу лейкоцити розводять до $4 \cdot 10^6$ кл / мл (в 2,5 рази) тієї ж середовищем. Потім культуру інкубують 15- 20 годин при $(36 \pm 0,5) ^\circ \text{C}$, видаляють клітини і дебрис при 500- 1000 об / хв протягом 15- 20 хвилин при температурі $2- 8 ^\circ \text{C}$. В отриманому розчині визначають титр інтерферона.6. Розчин інтерферону концентрують в 50 разів, використовуючи систему фільтрів з тангенціальним потоком через яку проходять з'єднання з молекулярною масою 10 кДа і менш. Процес проводять при температурі $2- 8 ^\circ \text{C}$. Концентрований розчин інтерферону центрифугують при 9000 g протягом 30 хвилин при температурі $2- 8 ^\circ \text{C}$. Можливо зберігання розчину при температурі мінус $60- 70 ^\circ \text{C}$. 7. Потім проводять очистку інтерферону за допомогою афінної хроматографії. Даний метод очищення передбачає використання моноклональних антитіл, специфічних до інтерферону людини, наприклад, антитіл NK2 комерційного виробництва («Celltech Limited», England). Моноклональні антитіла з'єднують з активованою CNBr сефарози 4В. Концентрований сирі інтерферон розморожують і очищають центрифугуванням 15000 18000 g протягом 60 хвилин при температурі $2- 8 ^\circ \text{C}$. Прозорий розчин інтерферону фільтрують через фільтри з розміром пор $0,22- 0,45$ мкм і наносять на колонку з моноклональними антитілами. Інтерферон елюїрують з колонки розчином, що містить $0,1 \text{ M}$ лимонної кислоти і $0,3 \text{ M}$ хлористого натрію (рН - 2,0) .8. Кислотну інкубацію і нейтралізацію вірусів при рН 2,0 проводять при $4 ^\circ \text{C}$ протягом не менше 5-ти діб. За цей період відбувається необхідна інкубація сторонніх агентів, включаючи віруси. 9. Після 5ти днів інкубації рН розчину доводять до значення 7,2 7,4 і стандартизують розчин до вмісту білка $1-3 \text{ mg / ml}$.10. На даному етапі проводять гельфільтраційну хроматографію інтерферону. Розчин інтерферону наносять на колонку з препаративної гранульованої сефарозой в кількості 5% від обсягу колонки. Елюювання проводять фосфатним буфером. Всі фракції, що містять основну кількість інтерферону об'єднують і піддають стерилізуючій фільтрації через мембрани з розміром пір $0,22$ мкм. Розчин зберігають при температурі мінус $60- 70 ^\circ \text{C}$. 11. При отриманні інтраназального інтерферону проводять очистку ультрафільтрацією через мембрани з порогом відсікання 300 кДа (без проведення стадії афінної хроматографії). До розчину інтерферону додають кріопротектори, препарат розливають у флакони і піддають ліофілізації.

II. Контроль опорних знань

Виконати тестові завдання:

1. До активної імуномодуляції відносяться
 - А) вакцини
 - Б) поліклональні антитіла
 - В) моноклональні антитіла
 - Г) рекомбінантні інтерлейкіни
2. Пасивну специфічну імуномодуляцію викликають
 - А) поліклональні антитіла
 - Б) вакцини
 - В) рекомбінантні інтерлейкіни
 - Г) рекомбінантні інтерферони
3. До пасивної неспецифічної імуномодуляції відносяться
 - А) рекомбінантні інтерферони
 - Б) вакцини
 - В) поліклональні антитіла
 - Г) моноклональні антитіла
4. Місцевий імунну відповідь більшою мірою обумовлений антитілами класу
 - А) IgAБ) IgE
 - В) IgM
 - Г) IgG.
5. До пасивної імуносупресії відноситься
 - А) специфічна плазмоімуносорбція
 - Б) неспецифіческая гемосорбція
 - В) імуноплазмофорез
 - Г) трансплантація кісткового мозку
6. Міткою в класичному імунохімічному методі визначення інсуліну є
 - А) радіоактивний йод
 - Б) НАД
 - В) флуоресцеин
 - Г) АТФ
7. До складу вакцини як імунобіотехнологічного препарату обов'язково входить
 - А) діючий компонент (антиген)
 - Б) консервант
 - В) стабілізатор
 - Г) ад'ювант.
8. До неспецифічної імуносупресії відносяться
 - А) анти-ЦИТОКІНОВИЙ моноклональні антитіла
 - Б) рекомбінантні антигени
 - В) анти-ідіотипіческие антитіла
 - Г) вакцини.

9. По завершенні імунохімічної реакції вимірюють
- А) кількість мітки, пов'язаної з антитілами
 - Б) кількість свободної метки
 - В) кількість мітки, пов'язаної з антигеном
 - Г) кількість мітки, пов'язаної з Мультиферментний комплексом
10. До специфічної пасивної імуносупресії відносяться
- А) антиідіотипічні антитіла
 - Б) рекомбінантні антигени
 - В) толерогена
 - Г) анти-ЦИТОКІНОВИЙ моноклональні антитіла
11. Область застосування моноклональних антитіл, що відносяться тільки до технології
- А) ідентифікація молекул
 - Б) імунохімічні аналізи біологічних рідин і клітин організму
 - В) імуно-регуляція за допомогою антиідіотипічних антитіл
 - Г) дослідження етіології і патогенезу різних захворювань
12. У якості мітки в імунохімічній аналізі використовують
- А) радіоактивні атоми елементів
 - Б) іони важких металів
 - В) аніони
 - Г) катіони
13. До специфічної активної імуносупресії відносяться
- А) імунотоксини
 - Б) рекомбінантні антигени
 - В) антиідіотипічні антитіла
 - Г) анти-ЦИТОКІНОВИЙ моноклональні антитіла
14. Якщо вплив специфічне активну, то супресію імуного отвтавизивает
- А) рекомбінантні антигени, толерогена
 - Б) неспецифічна гемосорбція і імуноплазмафорез
 - В) специфічна гемосорбція і імуноплазмафорез
 - Г) імунотоксини, антиідіотипічні антитіла (мішені для аутоантитіл), моноклональні антитіла проти цитокінів
3. Область застосування вакцин включає
- А) профілактику інфекційних захворювань
 - Б) інактивацію ентеротоксинів кишечника
 - В) діагностичні системи
 - Г) інактивацію токсинів при укусах змій
15. Якщо вплив специфічне активну, то супресію імуного отвтавизивает
- А) рекомбінантні антигени, толерогена
 - Б) неспецифічна гемосорбція і імуноплазмафорез

- В) специфічна гемосорбція і імуноплазмафорез
Г) імунотоксінів, антиідіотипіческіе антитіла (мішені для аутоантитіл), моноклональні антитіла проти цитокінів
5. До пасивної неспецифічної імуномодуляціїіотносїтся
- А) трансплантація кісткового мозку
Б) імуноплазмафорез
В) специфічна плазмаімуносорбція
Г) неспецифічна гемосорбція
16. Імуномодулятори можуть забезпечити
- А) дозрівання і дифференіровку Т-і В-клїтин
Б) всі етапи імуногенезу
В) розрегулювання проліферативної активності Т-і В-клїтин
Г) розвиток депресїї окремих етапів імуногенезу
17. Імуномодулятори можуть забезпечити
- А) дозрівання і дифференіровку Т-і В-клїтин
Б) всі етапи імуногенезу
В) розрегулювання проліферативної активності Т-і В-клїтин
Г) розвиток депресїї окремих етапів імуногенезу
18. Супресїї імуної відповіді при специфіческомпассивном впливі викликає застосування імунобіопрепаратів і методів
- А) імунотоксінів, антиідіотипіческіх антитіл, моноклональних антитіл
Б) неспецифіческойгемосорбціїі імуноплазмафореза
В) специфіческойгемосорбціїі імуноплазмафореза
Г) рекомбінантнихантігенів, толерогенніє, гаптенів, поліклональних антитіл
19. Застосування будь імунобіопрепаратів і методоввизивает супресию імуної відповіді, якщо вплив неспецифічне
- А) неспецифіческойгемосорбціїі імуноплазмафореза
Б) специфічна гемосорбція і імуноплазмафорез
В) імунотоксінів, антиідіотипіческіхантітел (мішені для аутоантитіл), моноклональнихантітел проти цитокінів
Г) рекомбінантних антигенів, толерогенніє
20. Механізм дії полієнових антибіотіковзаключається в
- А) зміні функції цитоплазматичної мембрани
Б) порушенііісинтеза біомакромолекул в клітці
4В) воздействиюна синтез білка в рибосомах
5Г) інгібірованііісинтеза РНК і метаболізму фолієвої кислоти
21. Механізмом дії групи антибіотіків: левоміцетину, тетрацикліну, фузидин, -є
- А) вплив на синтез білка в рибосомах
Б) порушення синтезу біомакромолекул в клітці
В) зміна функції цитоплазматичної мембрани

- Г) інгібування синтезу РНК і метаболізму фолієвої кислоти
22. Механізм дії антибіотиків Актіноміцини спрямований на
- А) інгібування синтезам РНК
 - Б) зміна функції цитоплазматичної мембрани
 - В) вплив на синтез білка в рибосомах
 - Г) інгібування синтезу РНК і метаболізму фолієвої кислоти
23. Возможенлі отримання вторинних метаболітів (антибіотико в) в режимі безперервного культивування?
- А) можливо за схемою двоступеневого Хемостат
 - Б) неможливо
 - В) можливо в турбідостатіческом режимі
 - Г) можливо в хемостатіческом режимі

III. Обговорення теоретичних питань:

1. Імунобіотехнології як один з розділів біотехнології. Основні складові та шляхи функціонування імунної системи.
2. Усіленіє імунної відповіді за допомогою імунобіопрепаратів, їх класифікація. Імуносупресори.
3. Вакцини. Визначення, класифікації.
4. Склад вакцин, функції компонентів, приклади.
5. Традиційні методи отримання вакцин, генно-інженерні живі вакцини. Порівняльна характеристика. Стандартизація.
6. Сироватки. Визначення, методи отримання. Стандартизація.
7. Бактеріофаги. Визначення, методи отримання. Асортимент.
8. Інтерлейкіни: механізм біологічної активності; перспективи практичного застосування.
9. Мікробіологічний синтез інтерлейкінів. Отримання продуцентів методами генетичної інженерії. Перспективи біотехнологічного виробництва.
10. Інтерферони. Класифікація. Видоспецифічність інтерферонів.
11. Методи отримання інтерферонів і їх обмеження. Індуктори інтерферонів: їх природа; механізм індукції.
12. Промислове виробництво інтерферонів на основі природних джерел. Синтез різних класів інтерферону людини в генетично сконструйованих клітинах мікроорганізмів. Проблеми стандартизації.

Теми доповідей/ рефератів

Питання 1

Імунобіотехнології як наука і виробництво, з одного боку, пропонує засоби для посилення імунного захисту організму у відповідь на різні несприятливі чинники навколишнього середовища - вакцини, сироватки, рекомбінантні інтерферони, інтерлейкіни та інші цитокіни, з іншого боку, шляхом широкого застосування моноклональних антитіл вирішує такі актуальні для фармації

завдання, як безпека і контроль якості лікарських препаратів. Виберіть імунобіопрепарати для посилення імунної відповіді:

- пасивні специфічного типу впливу;
- пасивні неспецифічного типу впливу;
- активно типу впливу.

Прокоментуйте можливості використання моноклональних антитіл при вирішенні проблеми безпеки ЛЗ (моніторинг ЛЗ)

Завдання 2

Імунобіотехнології вносить вагомий внесок у створення ЛЗ, профілактичних і діагностичних препаратів. Однак не у всіх людей і не завжди імунна система забезпечує захист організму від різних мікробних і вірусних інфекцій. Вона може бути неадекватна зовнішніх умов, і іноді потрібна допомога в посиленні імунної відповіді. При аналізі даної ситуації:

- сопоставьте види і цілі імунізації з класифікацією вакцин по способам їх отримання і застосування;
- свяжіте атакуючі агенти (ксенобіотики) з відповідною реакцією організму, використовуючи поняття «антиген», «антитіло», «антигенні детермінанти» («епітопи»), «гаптени»;
- Прокоментуйте прояв імунної відповіді і способи його посилення.

Завдання 3

Вакцини та сироватки, як відомо, застосовують з метою профілактики або лікування. Вакцинація сприяє формуванню у реципієнта імунітету до патогенних мікроорганізмів і тим самим захищає його від інфекції. У разі введення сироватки організм отримує вже готові антитіла.

Зіставте вакцини і сироватки як профілактичні засоби:

- по імунної відповіді;
- по способу отримання та застосування;
- по ефективності їх використання.

Завдання 4

Відомо, що головним компонентом імунохімічної реакції є антитіла (імуноглобуліни), що представляють собою білки сироватки крові, що синтезуються в організмі людини як прояв захисної реакції (імунітету) при попаданні в нього чужорідного речовини (ксенобіотики). Зіставте функції імуноглобулінів (антитіл):

- з їх класифікацією і структурою;
- з схемою взаємодії антигену з антитілом, поданням про структуру антигену;
- з принципами розширення меж чутливості і підвищення специфічності імунохімічних тестів.

IV. Підведення підсумків

Список рекомендованої літератури

1. S. Spada. G. Walsh Directory of Approved Biopharmaceutical Products 1st Edition . – CRC Press, 2019. – 336 p.
2. C. Kokare PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY 1st Edition. – Nirali Prakashan, 2017. – 274.
3. Лихач А. В. Промислова біотехнологія / А. В. Лихач. – МНАУ. – 2016. – 116 с.
4. Краснопольский Ю.М., Звягинцева О.В. Фармацевтическая биотехнология. Аспекты фармацевтической химии. Ю.М. Краснопольский, О.В. Звягинцева. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2018. – 248 с.
5. Державна фармакопея України : в 3 т. / ДП “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”. –2-е вид. –Харків : Державне підприємство “ Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів ”, 2015. –Т.1. –