


**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 №14 Тема: **«Ліпосомальні форми ад'ювантів та вакцин.»**

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: Ліпосомальні форми ад'ювантів та вакцин.

Мета: Ознайомитися з ліпосомальними формами ад'ювантів та вакцин

Основні поняття: Біотехнологія, біооб'єкти, біомолекули

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

Навчальний час: 4,0

План

I. Організаційний момент

Зміст теми

В даний час широкого поширення набули ліпосомальні препарати, які використовуються в медицині за різними напрямками. Одне з таких напрямків - застосування ліпосом як ад'ювант для конструювання вакцин. Ад'ювантне дію ліпосом по відношенню до різних антигенів встановлено після введення експериментальним тваринам антигенних субстанцій, вірусів і бактерій, глобулінів і альбумінів сироватки крові, ферментів. Основним завданням отримання антигенів, які використовуються в складі вакцин, є їх висока ступінь очищення від баластних домішок різної природи: білкових, ліпідних, ліпопротеїдних, полісахаридних та інших. Добре відомо, що дані сполуки здатні посилювати імуногенність вводяться речовин. У той же час їх присутність небажана в зв'язку з посиленням ними побічної дії вакцин. Саме цей факт змушує використовувати для конструювання вакцин імуностимулятори, що отримали назву - ад'юванти. До застосування ад'ювант в вакцинології накладаються досить жорсткі вимоги:

- ад'ювантидолжны бути вільними від сторонніх домішок і не викликати побічних імунних реакцій;
- ад'ювантине повинні бути онкогенними або алергогенни речовинами і викликати появу відповідних з'єднань в організмі;
- ад'юванти не повинні містити антигени, подібні до антигенами господаря (поява таких антигенів може привести до аутоімунних реакцій);
- після виконання своїх функцій ад'юванти повинні досить легко метаболізуватися. Посилення дії антигену в організмі при введенні його з ад'ювантами пояснюється декількома причинами:
 - сповільненій резорбцією антигену з утворився на місці введення «депо», що сприяє антигенною подразнення;
 - запальною реакцією організму в відповідь на введення ад'ювантов;
 - утворення комплексу антигену з ад'ювантом по типу хімічного зв'язку, в результаті чого підвищується імуногенність антигену;
 - стимуляцією ад'ювантом фагоцитарної активності ретикулоендотеліальної системи;
 - загальним посиленням синтезу білка в організмі;
 - уповільненням гідролізу антигену тканинними ферментами;

- стресових дією ад'юванта на організм;
- активацією системи комплементу;
- прискоренням транспорту антигену до імунокомпетентним клітинам;
- стимуляція освіти цитокінів;
- стимуляція проліферації, диференціювання і функціональної активності В клітин і їх взаємодії. Більшість дослідників вважають, що ад'юванти надають комбінована дія як на антиген, змінюючи його фізико-хімічні властивості і посилюючи імуногенність, так і безпосередньо на організм, викликаючи ряд неспецифічних реакцій. Вплив ад'ювантов на властивості антигену стосується зміни його структури, молекулярної маси, полімерності, розчинності та інших фізико-хімічних і імунохімічних властивостей. Сьогодні відомо значна кількість ад'ювантов відрізняються походженням (природні і синтетичні) і фізико-хімічні властивості:

1. Мінеральні ад'юванти;

2. Рослинні ад'юванти (сапоніни, ад'ювант - QS21 виділений з американського дерева *Quillaja Saponaria*. Імуностимулюючий комплекс «ISCOM», представляє собою ад'ювантна фракцію *Quillaja Saponaria*, включену в частинки, що складаються з холестерину, природних фосфоліпідів і антигенів клітинних мембран. «ISCOM» вводили до складу вакцин протів вірусу грипу, вірусу папіломи людини, ВІЛ, збудника малярії, ряду пухлин і ін. Показано, що ISCOMсодержащіе вакцини найбільш ефективні при інтраназальному застосуванні і індукують змішаний Th1 і Th2 імунну відповідь);

Масляні ад'юванти (ад'ювант Фрейнда, мінеральні олії, тваринні і рослинні масла);

4. Цитокіни (наприклад, інтерлейкіни ІЛ1 α і ІЛ1 β бета) і пептиди;

5. Мікробні ад'юванти: корпускулярні і суб'єдинічні структури, білки, нуклеїнові кислоти, ліпіди, вуглеводи, ліпополісахаридбелковие комплекси;

6. Синтетичні речовини: полінуклеотиди (Поліани: У, полії: Ц і ін.), Пептиди (мурамідпептид і його похідні, поліелектроліти - Поліаніонна, полікатіоніти);

7. Складні штучні ад'ювантні системи (ліпосоми, мікрокапсули).

У зв'язку з вищевикладеним стає зрозумілий значний інтерес, який виник в останнє десятиліття до ліпосомам, як перспективним ад'ювантним компонентів. Звертає на себе увагу той факт, що ліпосоми відповідають більшості вимог, висунутих до ад'ювант. Важливим є можливість отримання вакцин з ліпосомальна ад'ювантами, які можуть легко піддаватися стерилізующей фільтрації, на відміну від мінеральних сорбентів. Етов свою чергу дозволяє проводити стерилізуючу фільтрацію на кожному етапі отримання вакцинних препаратів. Ліпосоми знижують токсичність вбудованих антигенів і мають гарну біосумісність. Крім того, з'явилися

дослідження, в яких в складі вакцинних препаратів запропоновано використовувати комбінацію з декількох ад'ювантів: ліпосом, цитокінів, пептидів, імуностимулюючих комплексів.

протівірусні вакцини

Вакцини для профілактики гепатиту

Отримані різними авторами дані свідчать про те, що якщо введені в водному розчині антигени призводять до негативного або дуже слабкого імунної відповіді, то інкапсулювання їх в ліпосоми призводить до високих титрів сироватки крові. При підшкірній ін'єкції морським свинкам поверхневого антигену вірусного гепатиту отримані високі титри антитіл, які захищають тварин від інфекції гепатитом. Показано, що антиген вірусу гепатиту, включений в ліпосоми, призводить до появи антитіл в титрах в 750 разів більше, ніж при імунізації водним розчином антигену. Очищені препарати антигену вірусу гепатиту включали в ліпосоми, що складаються з яєчного фосфатидилхоліну, холестерину і додецилфосфата в співвідношенні 7: 2: 1. Автори визнають за ліпосомами властивості ад'ювант. Безсумнівний інтерес представляють дані про можливість зміни типу імунної реакції при введенні антигену в складі ліпосом. В якості антигену використовували пептид вірусу гепатиту В (HbS Ag), введення якого мишам C57BL приводив до Th2 типу реакції. Введення даного антигену в ліпосоми в присутності імуномодулятора показало сильну пролиферативну реакцію Тлімфоцитів. Тлімфоцитна підгрупа була ідентифікована як Th1 тип на підставі цитокінів профілю, котрий свідетельствовав про значне виділення \square інтерферона (цитокін типу Th1) і надзвичайно низькому рівні інтерлейкіна4 (цитокін типу Th2). Контрольна група мишей C57BL, імунізованих пептидом з галуном, показала дуже низький рівень проліферації Т-лімфоцитів, причому не відзначалося жодного збільшення у виділенні \square інтерферона або інтерлейкіна4. Таким чином, було встановлено, що реакція типу Th1 відбувається у тварин, яким вводили пептид тільки в складі ліпосом. НераХеп ТМ ліпосомальна вакцина для профілактики гепатиту В проводиться фірмою «Lipoxen». При застосуванні цієї вакцини рівень антитіл в 20 разів перевищує рівень специфічних антитіл в порівнянні з використанням НЕ ліпосомальної вакцини. У зв'язку з цим з'явилася реальна можливість зменшити профілактичну дозу вакцини і скоротити кількість ін'єкцій. Авторами отримано ліпосомальна вакцина проти гепатиту В, в якій був інкапсулюваний рекомбінантний поверхневий антиген гепатиту В (HbS Ag) розміром 22 нм. Ліпосоми отримували з диміристоїлфосфатиділхоліна і диміристоїлфосфатиділгліцеріна в молярному співвідношенні 9: 1. Розмір ліпосом після гідратації 4, 5 мкм. При порівнянні вільного HbS Ag, ліпосомальної вакцини і HbS Ag адсорбованого на гелі

гідроксиду алюмінію встановлено, що ліпосомальний препарат приводив до більш високого рівня гуморального відповіді (титр специфічних антитіл).

Ерохал - вакцина для профілактики гепатиту А.

Препарат являє собою фосфатиділхолінові ліпосоми, що містять вірус гепатиту А, інактивованний формаліном, і гемаглютинін вірусу грипу. Вакцина проявляла високі імуногенні властивості і нешкідливість при вивченні на 117 волонтерах. При вивченні рівня захисних антитіл в крові імунізованих тварин імуноферментним аналізом виявлено, що сероконверсія на 14 і 28 день становила 97% і 98%, відповідно. Після другої ін'єкції ліпосомальної вакциною рівень сероконверсії склав 100%. Фірма «Лірохеп» розробила першу в світі вакцину для профілактики гепатиту Е, що містить рекомбінантний білок гепатиту Е в ліпосоми, отриманих за відомою технологією Imuxen.

Вакцини для профілактики грипу

Грип і його ускладнення дають істотну захворюваність і смертність у літніх людей. У людей молодого віку імуногенність при вакцинації забезпечує 70 - 90% захист, а у літніх людей лише близько 50%. Запропоновано ліпосомальна тривалентна вакцина, що містить по 15 мкг гемаглютиніну кожного вірусного штаму і 33 мкг інтерлейкіну-2 людини. Проведено вивчення імуногенності і нешкідливості запропонованої ліпосомальної вакцини при порівнянні зі стандартною комерційною вакциною. Вакцини вводили внутрішньом'язово людям похилого віку (середній вік 80 років). При вивченні рівня захисних антитіл за допомогою імуноферментного аналізу встановлено присутність захисного титру антитіл у 33% людей при використанні стандартної вакцини і 48% при імунізації ліпосомальної вакциною. При цих дослідженнях показана однакова нешкідливість вакцин, а імуногенність була вище у ліпосомального препарату. Причому, антитіл до інтерлейкіну-2 не виявлено. Чи не виявлено також збільшення рівня в крові імунізованих антифосфоліпідних антитіл. Існуючі вакцини проти грипу, що застосовуються в даний час, є переважно вакцини з інактивованого вірусу. Існує три види вакцин:

вакцини з цільного вірусу;

вакцини з фрагментів вірусу;

вакцини на основі окремих активних фрагментів вірусу грипу. Для підвищення імуногенної активності даних вакцин використовують як різні ад'юванти (наприклад, МГ59) так і ліпосомальні форми вакцин.

Вивчення нешкідливості та імуногенності комерційних протигрипозних вакцин проводили на двох групах хворих. Першій групі вводили вакцину, яка містить гемаглютинін, виділений з вірусу, а другій групі осіб вводили вакцину, отриману шляхом введення гемаглютиніну в мембрану ліпосом, що складається з природного фосфатидилхоліну. Для дослідження

використовували тривалентну вакцину. Обидві вакцини викликали однаковий достовірний підйом середнього титру протівогемагглютинінових антитіл проти всіх трьох компонентів вакцини через 1 місяць після імунізації. Однак, достовірно більшу кількість осіб, імунізованих ліпосомальною формою вакцини, демонстрували більш ніж чотирикратне підвищення титру проти вірусу штаму Сінгапур і Пекін в порівнянні з вільною вакциною. Відсоток хворих, у яких титр при імунізації ліпосомальною формою досягав захисної величини, був також значно вище. Особливе клінічне значення мав той факт, що у 68,4% осіб, імунізованих ліпосомальною вакциною, досягався захисний рівень антитіл проти всіх трьох компонентів вакцини, на відміну від 38% при вакцинації звичайною вакциною. Численні дослідження ліпосомальних вакцин, що містять вірус грипу або його високоочищені компоненти, привели до створення комерційних ліпосомальних препаратів для профілактики грипу. Одним з таких препаратів є вакцина «Інфлексал» виробництва Berna Biothec, Швейцарія. Препарат являє собою поливалентну ліпосомальну (віросомальну) інактивовану вакцину проти грипу, до складу якої входять поверхневі антигени трьох штамів вірусу грипу типів А і В. Віруси інактивують формальдегідом, після чого з вірусів виділяють і очищують антигени гемагглютиніни і нейрамінідази. В одній дозі міститься по 15 мкг гемагглютиніну кожного штаму. Ліпосоми одержують з фосфатидилхоліну, зміст якого в одній дозі препарату (0,5 мл) - 117 мкг. Віруси грипу постійно змінюються, тому склад вакцини, що випускається в різні роки, може відрізнятися. Перевагою вірусом є можливість імітації ними вірусних частинок. Механізм дії вірусом можна представити таким чином: фагоцитоз вірусом імунокомпетентними клітинами; презентація антигенів, включених в ліпосом (гемагглютиніни та нейрамінідази) імуній системі; активація CD4 + хелперів для вироблення цитокінів; цитокіни стимулюють клітини В для вироблення антитіл до антигенів вірусу грипу. Захисний рівень антитіл в крові зазвичай досягається через 2 - 3 тижні після вакцинації. Тривалість поствакцинального імунітету становить 6 - 12 місяців.

Вакцина для профілактики герпесу

Вірус простого герпеса2 (HSV2) є найбільш поширеним збудником герпесу статевих органів. Запропоновано ліпосомальна вакцина, що містить пептиди, виділені з вірусу герпесу. У модельних експериментах на мишах заражених вірусом герпесу (самки заражені вагінально, самці - інтравектально) одноразове введення ліпосомальної вакцини призводило до 86 - 100% виживання при інтравагінальному зараженні і 71 - 100% при інтравектальному зараженні мишей. Різні за складом пептиди вірусу герпесу володіли різною імуногенністю активністю. LipoRab™ - вакцина для профілактики сказу. Підвищує імуногенність ліпосом з включеним в них

вірусу сказу. Перевагою цієї вакцини є можливість зменшення доз і кількості ін'єкцій.

2. Антибактеріальні вакцини

Вакцини, що містять токсини і анатоксини

Внутрішньовенне введення водного розчину дифтерійного анатоксіна сенсibilізованим мишам призводило до загибелі 70% тварин протягом 1 хвилини, а у 30% мишей спостерігалися симптоми важкої форми сироваткової хвороби. Тварини, імунізовані анатоксином, укладеними в ліпосоми, вижили, і у них були відсутні симптоми сироваткової хвороби. У сенсibilізованих дифтерійним анатоксином тварин після підшкірного введення ліпосомального препарату антигену не спостерігається феномен Артюса. Проведено дослідження імуногенності анатоксинів Edsmatiens, укладених в ліпосоми різного складу. Найбільша виживаність була в групі тварин, імунізованих ліпосомами, до складу яких входили яєчний фосфатидилхолін, кардіоліпін, виділений з серця великої рогатої худоби, а також Фосфатидилсерин сфингомиєлін, виділені з мозку великої рогатої худоби.

Так як ліпосоми, що складаються з фосфатидилхоліну і кардіоліпіну, пов'язують білки класу FIE більше, ніж фосфатидилхолінові ліпосоми, то, ймовірно, їх велика імуногенність пов'язана з присутністю кислого фосфолипіда - одного з небагатьох антигенних ліпідних речовин. Так як сфингомієліну приписують важливі функції в генетичному апараті клітини як неспецифічному активатора синтезу нуклеїнових кислот, то можна припустити, що сфингомиєлін входить в ліпосоми і здатний проникати разом з антигеном в імуно-компетентну тканину організму, призводить до збільшення синтезу антитіл проти антигенів анатоксину. При використанні ліпідів в неозвучених стані не вдавалося отримати значного збільшення імуноної відповіді. Правцевий очищений анатоксин Кон'юговані з ліпосомами за допомогою глутарового альдегіду. Отриманий препарат вводили внутрішньочеревно мишам BALB / с. Встановлено, що імунізація призводить до появи високого рівня протиправцеву G імуноглобулінів. Одночасно показано, що зміст специфічних протиправцеву імуноглобулінів класу E було досить незначним. Отримані сироватки містили захисний титр антитіл, т. К. Введення летальних доз токсину (100 dlm) повністю захищало тварин від загибелі. Імунізація тварин вільним розчином правцевого анатоксину або анатоксину, сорбованої на гелі гідроксиду алюмінію, викликали утворення імуноглобулінів як класу G, так і класу E. Більш того, повторна імунізація мишей ліпосомальної формою правцевого анатоксину після первинної імунізації сорбованих антигеном приводила до появи, в основному, імуноглобуліну G. при ліофілізації ліпосомальної форми антигену,

імуногенність препарату зберігалася протягом 6 місяців при 37 ° С. На мишах BALB / с вивчали вплив різних ліпосом, що складаються з фосфоліпідів і холестерину, взятих в еквімолярних співвідношеннях, на імуногенні властивості вбудованого правцевого анатоксину. Антитіла визначалися за допомогою імуноферментного методу. В результаті встановлено, що ад'ювантні властивості ліпосом найбільш виражені при співвідношенні фосфоліпідів до правцевого анатоксину по масі 2050 1; збільшення співвідношення між білковою фракцією і ліпосомами призводило до значного зниження титрів. Рівень антитіл не змінюється при використанні ліпосом, що складаються з фосфоліпідів з температурою фазового переходу - гель-рідина від 32 ° С до 41, 5 ° С. При вивченні ад'ювантних властивостей ліпосом на імунітет правцевого анатоксину використовували два методи включення до складу ліпосом: методом дегідратації - регідратації і нековалентним зв'язуванням. Автори не встановили відмінностей у дії препаратів на гуморальну імунну відповідь. Відзначено, що 82, 3% антигену зв'язується з ліпосомами незалежно від їх заряду - нейтрального, негативного чи позитивного. Виявлено відмінності у зв'язуванні з антигеном ліпосом, що містять жирні кислоти різного ступеня насиченості. Проведено вивчення ліпосомальної комбінованої вакцини, що містить анатоксини: дифтерійний і правцевий.

Ліпосоми були отримані ультразвуковою обробкою суміші ліпідів, що складається з соєвого фосфатидилхоліна і холестерину. В 1 мл вакцини містилося по 5 Lf кожного анатоксину.

Мишам BALB / с препарат вводили підшкірно. Встановлено, що максимальне включення анатоксинів в ліпосоми було при співвідношенні фосфатидилхоліну: холестерин - 7: 3: дифтерійного анатоксину 39, 8% і правцевого анатоксину 38, 7%. Антитіла в крові тварин визначали імуноферментним аналізом на 15, 30 і 45 день. Встановлено, що комбіноване використання анатоксинів у вакцині призводить до більш високого рівня антитіл до правцевим антигену в порівнянні з моноліпосомальною вакциною, яка містить правцевий анатоксин. В рівні антитіл дифтерійного анатоксину відмінностей не виявлено. Встановлено, що холерний токсин і його В субодиниця підвищували імунну відповідь до антигенів при спільному проникненні через слизову оболонку. При оральному введенні антигенів, які перебувають на поверхні малих фосфатидилхолінових ліпосом спостерігалася збільшення імунної відповіді. Для вивчення протективних властивостей холерних вакцин добровольцям перорально вводили трикомпонентну ліпосомальну холерну вакцину. Як контролю пацієнтам вводили вільну форму трьохкомпонентної вакцини. Обидві вакцини забезпечували 100% імуногенність, що було підтверджено наявністю захисного титру антитіл в крові пацієнтів. У той же час, вакциновані люди, які отримали антигени в

ліпосоми, продемонстрували більш високу швидкість антигенспецифічної реакції антитіл, ніж пацієнти, які отримували вільну форму вакцини. На можливість використання ліпосомальної холерної вакцини вказують і інші автори, де в якості антигену використовували інактивовані теплом цільні клітини холерних вібріонів. Використання ліпосомальних вакцин призводило до гальмування процесу колонієобразування на слизовій оболонці у щурів.

Вакцини, що містять ліпід А

Безсумнівно, дуже перспективним є використання ліпосом як контейнерів для ад'ювантів різної структури. Одним з таких ад'ювантів є ліпід А, що представляє собою ліпополісахарид, виділений з грамнегативних бактерій. Висока ад'ювантна активність ліпіда А встановлена за останні 10 - 15 років численними дослідженнями. Однак застосування вакцин, в складі яких в якості ад'юванта використовується ліпід А, гальмується його високою пірогенною активністю. Введення ліпіда А до складу ліпосом значно зменшує пірогенність ліпополісахариду. Так, наприклад, ліпід А, виділений з *S. minnesota R 595* і інкапсульований в ліпосоми, виявляв меншу пірогенність в порівнянні з вільною формою ліпіда А. Так, непірогенна доза ліпіда А у вільному стані становила 0,32 мкг / кг маси кролика, а в ліпосомальній формі вдавалося вводити 8,1 мкг / кг маси кролика без прояву пірогенної реакції. Авторами проведено вивчення імуногенності ліпосомального малярійного плазмодія на мавпах, де в якості ад'юванта використовували непірогенний ліпосомальний ліпід А.

Вакцини, що містять пептиди різної структури

Ад'ювантна активність має мікобактеріальні пептидоглікани, зокрема, мураміддіпептід, його аналоги і стереоізомери. За багатьма властивостями мураміддіпептід в ліпосомах дозволяє значно підвищити імунну відповідь і знизити його негативні властивості. Поруч авторів запропоновано використовувати мураміддіпептиди і його похідні ВЗОМДР, 18МДР, С12МДР, що представляють собою кон'югат мураміддіпептида з жирними кислотами для підвищення антигенної активності ряду антигенів при імунізації тварин. Показано, що введення 18МДР досить ефективно для створення захисного імунітету у мавп проти малярійного плазмодіума. Для дослідження ролі макрофагів в індукції утворення антитіл на антигени стафілокока застосовувалися ліпосоми, що містять С12МДР. Миші, що отримували ліпосоми С12МДР, за два дні до ін'єкції отоксину золотистого стафілокока демонстрували збільшення освіти антистафілококкового антиотоксину Ig (імуноглобуліни М і антиколлагенсвязиваючий білок Ig G). Встановлено, що похідні мураміддіпептида або комплекс мурамідтріпептида з фосфатидилетаноламін є ефективними агентами для активації макрофагів, спрямованих проти пухлинних клітин або клітин вірусів. Ліпосомальний комплекс мурамідтріпептід - фосфатидилетаноламін (МТР - ФЕА),

призначений для внутрішньовенного введення, знаходиться на I фазі вивчення. Необхідно відзначити, що на відміну від ліпосомального ліпіда А, ліпосомальний МТР - ФЕА токсичний і пірогенів, що затримує його застосування в якості ад'юванта для вакцин в медицині. Мавп імунізували проти людського малярійного паразита *Plasmodium Falciparum*. Дві ін'єкції антигеном, включеним в ліпосоми спільно з 60-стероїл-N-ацетілмураміл-D-аланіл-D-ізоглутамін, захищали всіх тварин при зараженні летальною дозою збудника. Була оцінена імуногенність ліпосомальної вакцини з антигенними пептидами, отриманими з глікопротеїну вірусу лімфоцитарного хориомеїнігиту. Інкапсульовані в ліпосоми пептиди мали високу імуногенність при внутрішньошкірне введення і викликали захисний протівірусний імунітет. Після внутрішньої ін'єкції ліпосоми утворювали «депо» -антиген, яка полегшувала тривалу завантаження антигену дендритними клітинами практично тільки в місцеві лімфовузли.

Імуногенність ліпосомальної пептидного вакцини ще більш підвищувалася при введенні в ліпосоми імуностимулюючих олігонукліотидів, що призводило до значного активуванню дендритних клітин. Запропонована ліпосомальна пептидна вакцина викликала захисний протипухлинний імунітет. З огляду на, що реакції протипухлинних і протівірусних Т-клітин викликаються в основному дендритними клітинами, що транспортують антиген з периферії в організовані лімфоїдні тканини, можна припустити, що активація дендритів ліпосомальна пептидними вакцинами свідчить обох високою імуногенності і можливості створення захисної протівірусної або протипухлинної імунної реакції. Безперечно, перспективним є використання ліпосомальних вакцин, що містять патогенні пептиди, за допомогою яких можна запобігти аутоімунні захворювання без неспецифічного придушення реакцій Т-клітин, як це було показано при підшкірному введенні мишам ліпосом, що містять пептид К2, який відповідає залишкам 201 - 216 бичачого інтерфоторецептора рітеноїд -зв'язуючим білка. Інтерес представляє ліпосомальна вакцина, що містить пептид, виділений з пілей *Pseudomonas aeruginosa*, як В-епітоп. У ліпосоми також включали очищений гемаглютинін з вірусу грипу, як Th-епітоп, а також ад'ювант. Отримано імунну відповідь у вигляді вироблення специфічних антитіл, здатних захистити від інфекції, викликаной *P. aeruginosa*.

Ліпосоми як імунологічні ад'юванти були використані для отримання антитіл, специфічних до поліпептид. Ліпосоми були приготовлені з суміші фосфатидилхоліну, холестерину, доцетілфосфата і α -токоферолу в молярних співвідношеннях 4: 3: 0, 1: 0, 5 і мали негативний заряд. У ліпосоми поміщали негативно заряджений поліпептид, який внаслідок заряд не комплексірованне з ліпосоми і знаходився всередині ліпідної структури.

Найкращі результати отримані при внутрішньовенній або внутрішньочеревно імунізації.

Вакцини, що містять бактеріальні полісахариди

Запропоновано методи отримання ліпосомальних вакцин для профілактики правцевої, гемофільної, менінгококової, стрептококової інфекції. Ліпосоми отримували з яєчного фосфатидилхоліну соступенню чистоти 90% або соєвого гідрованого фосфатидилхоліна зі ступенем чистоти 98%. Оптимальний розмір ліпосом 80 - 300 нм. Як полісахариду використовували капсульний полісахарид *Haemophilus influenzae*. Структура капсульного полісахариду, що грає важливу роль в вірулентності бактерій *Haemophilus influenzae*, встановлена як 3-В-D-рібофунарозіл (11) -D-рибітол-5-фосфат.

рибосомальні вакцини

Рибосоми - органели, які продукують білок по матриці і-РНК. Виділені рибосоми з матрицею в чистому вигляді і являють собою рибосомальної вакцину. Рибосомальні вакцини являють собою рибосомальної фракцію, виділену з мікроорганізмів і володіє імуногенні властивості: здатність індукувати синтез антитіл і захищати людину і тварин від зараження відповідними мікроорганізмами. Протективна активність рибосомних вакцин може бути пов'язана з адсорбованими на рибосомах молекул бактеріальних антигенів. У зв'язку з цим введення рибосомних антигенів в ліпосоми дозволяє підвищити ефективність вакцини. Відомо, що рибосомальні вакцини ефективні в імунопрофілактики ряду інфекційних захворювань. Вивчено здатність рибосом, виділених з штаму *S. Sobrinus 6715* і включених в ліпосоми на основі фосфоліпідів і холестерину, індукувати синтез специфічних антитіл Ig A в слині щурів. Показано, що рівень Ig A проти рибосом і цілісних клітин *S. Sobrinus 6715* бил у імунізованих пацюків значно вище, ніж у контрольних тварин. Була також різко знижена колонізація *S. Sobrinus* в порожнині рота. Автори запропонували використовувати ліпосомальні рибосомальні вакцини для захисту від карієсу. Так, наприклад, при введенні 12, 5 мкг ліпосомальної вакцини виявлені значні захисні титри антитіл, а введення чистої вакцини без ліпосом в дозі 250 мкг не виявляється імуногенності. Запропоновано вакцина, в якій в якості антигену використані рибосоми *Candida albicans*. Ліпосоми отримували з димірістоілфосфатиділхоліна і димірістоілфосфатиділгліцеріна в молярному співвідношенні 9: 1. В якості ад'юванта використовували липид А. Проведено вивчення ліпосомальної вакцини, що містить рибосоми при порівнянні з вакциною з ад'ювантом Фрейнда (один з найбільш поширених ад'ювантов, містить убиті туберкульозні мікобактерії, суспендовані в масляній фазі водної емульсії) на мишах. Рівень імуноної відповіді був вищим. Досліджували вплив ліпосом на виникнення імунологічної пам'яті на

антиген. Для цієї мети кроликам вводили ліпосоми, що містять в якості антигену сироватковий альбумін людини, пероксидазу хрому, ліпополісахариди. Встановили, що при первинному і вторинному імунному відпові на альбумін ліпосоми надають ад'ювантне дію. Якщо вводяться дози ліпосом з альбуміном були настільки малими, що не викликали імунологічної відповіді, то не виникало і імунологічна пам'ять на альбумін. Введення ліпосом, що містять пероксидазу, що не визивало первинної імунної відповіді, але приводило до появи імунологічної пам'яті на фермент. Описано вивчення багаточасткових ліпосом, приготованих з фосфатидилхоліну і холестерину в молярних співвідношеннях 7: 2 в якості імунологічних ад'ювантів при імунізації кроликів лизоцимом. Продемонстровано можливість отримання високо титрові сироваток проти лизоциму, активність яких перевищувала титри, отримані при використанні індивідуального лизоциму або лизоциму, пов'язаного з ад'ювантом Фрейнда. На інтенсивність імунної відповіді впливає спосіб введення ліпідних препаратів, ліпідний склад і поверхневий заряд ліпосомальної мембрани. Відомо, що ліпід-білкові комплекси мають більшу імуногенність, ніж індивідуальні ліпіди. Природно припустити, що при включенні білка в ліпосоми можуть формуватися білково-ліпідні комплекси, які в свою чергу будуть посилювати імунну відповідь. Однак поряд авторів вивчений гуморальну імунну відповідь у щурів після введення комплексу фосфатидилхоліну - людський сироватковий альбумін. Встановлено, що показники титрів антитіл практично не збільшуються при імунізації зазначеними комплексами в порівнянні з водним розчином антигену. Отже, ліпосомальні ад'юванти можна успішно використовувати для отримання сироваток проти різних антигенів: ферментів, токсинів, білків крові, вірусів, бактерій та інших з'єднань.

Вакцини, що містять антигени риккетсій

Ліпосоми отримували з використанням методу механічного диспергування з фосфоліпідних антигенів *R. prowazekii*. До складу ліпосом вводили хімічну висипнотифозну вакцину. Імунобіологічні властивості фосфоліпідних антигенів вивчали в складі риккетсіозних ліпосомальних препаратів як в реакціях *in vitro*, так і шляхом підшкірної імунізації кроликів, морських свинок та мишей 50 мкг фосфоліпідних антигенів з питомою активністю 2 ЄС / мкг і 48 ЄС хімічної висипнотифозної вакцини в 0, 5 мл. Встановлено, що ліпосомальні препарати не володіють гематотоксичністю і не надають токсичної дії в дослідках на тваринах. Виявлено потенціуючу дію фосфоліпідних антигенів у складі ліпосомальних препаратів на імуногенність хімічної вакцини. Показані ад'ювантні властивості риккетсіальних фосфоліпідів у складі ліпосом на основі хімічної висипнотифозної вакцини. Відзначено ад'ювантне дію ліпосом при введенні

чумний живої вакцини, істотно підвищує напруженість імунітету у лабораторних тварин. Але при цьому ліпосоми не впливали на рівень титрів специфічних антитіл. Здається, посилення імунізують ефекту живої чумний вакцини пов'язано з неспецифічним клітинним впливом ліпосом на елементи РЕЗ і більш інтенсивним включенням їх в процес імуногенезу. Ключовими аспектами, що впливають на розробку нових ефективних ад'ювантів і вакцин, призначених для людини, є безпека, висока ступінь очищення і фізико-хімічні характеристики остаточного складу ад'ювантів.

Ліпосоми проявляють свою безпеку в клінічних умовах при використанні їх як ад'ювант вакцин для вірусних і бактеріальних антигенів. Були підтверджені в клінічних умовах тести контролю якості, які встановили високу ступінь очищення, безпеку і стабільність ліпосомальних вакцин. Ліпосоми можна розглядати як основних кандидатів для поліпшення імуногенності як антигенів з гідрофобними ділянками, так і розчинні не мембранних протеїнів. Розташування антигену (т. Е. Абсорбований він, або приєднаний до ліпосомальної поверхні за допомогою ковалентних зв'язків, або інкапсулюваний у внутрішній обсяг ліпосоми) має важливе значення і визначає в значній мірі імунобіологічні властивості вакцин. Таким чином, накопичені в літературі дані свідчать про високий ад'ювантної дії ліпосом. Негативно заряджені ліпосоми стимулюють вищі показники титрів антитіл, ніж позитивні. Показники титрів при вторинної імунізації були на три порядки вище, ніж при первинному введенні антигенів. Відзначено також зниження імунологічної відповіді на антиген в ліпосоми, що містять більше 30% холестерину і приготованих з фосфоліпідів з високою температурою фазового переходу. На інтенсивність імунної відповіді впливає також спосіб введення ліпосомальних препаратів. Найбільш високі титри антитіл виявляються при підшкірному введенні. Необхідно відзначити, що ряд ліпідних сполук володіє власною імуногенністю, внаслідок чого для ад'ювантів доцільно використовувати ліпіди, позбавлені імуногенних властивостей. Наприклад, фосфатиділхолінові ад'юванти є перспективними при поверхневому експонуванні різних антигенів, так як не володіють власною імунологічної активністю. Важливою умовою для створення ліпідних ад'ювантів є наявність високоочищених і мінімально окислених ліпідів. Тому фосфатидилхолін є дуже зручним об'єктом для дослідження ад'ювантної активності ліпідів, так як для його виготовлення розроблені промислові технології, що дають можливість отримувати цільовий продукт високої якості у великих кількостях і порівняно недорого, що вкрай важливо для практичного використання фосфатиділхолінових ад'ювантів для масової імунізації. На відміну від інших ад'ювантів, в місці ін'єкції освіти гранульом не відбувалося. Ще одна перевага застосування ліпосом як імунологічних ад'ювантів полягає в тому, що якщо антиген укладений всередину ліпосом,

то можна уникнути реакції гіперчутливості. У разі використання ліпосомальних вакцин імунна відповідь посилюється внаслідок того, що антигени, асоційовані з ліпосомами, потрапляють безпосередньо в антиген представляє клітини. У ліпосоми включають крім антигену (вірусний капсид) ще білки, що сприяють злиттю мембран ліпосом і клітин, наприклад, для ліпосомальної вакцини проти гепатиту А - гемаглютинін вірусу грипу. Для таких препаратів використовують термін «віросоми». «Віросоми» повторюють природний шлях вірусної частинки, в результаті чого на поверхні антигену представляє клітини виявляється експонований фрагмент антигену у вигляді пізнаваному Т-хелперами. В даний час проводиться випробування декількох ліпосомальних вакцин проти шигел і патогенної E. coli. Ведуться розробки ліпосомальних вакцин проти грипу, дифтерії, правця, гепатиту А і В.

Перевагою ліпосомальних ад'ювантів і ліпосомальних вакцінів є наступне:

- антигени з низькою імуногенністю можуть бути перетворені в високоефективні антигени;
- в ліпосоми можна включати гідрофобні антигени;
- ад'юванти і антигени можуть одночасно бути включені в структуру ліпосоми;
- ліпосомальні вакцини дозволяють отримувати високі титри специфічних антитіл;
- за допомогою ліпосомальних вакцин можна досягти тривалого продовження специфічної дії антитіл;
- використання ліпосом дозволяє зменшити токсичні і пірогенні властивості антигенів і ад'ювант. Ліпосомальні препарати знайшли застосування для вакцинації людини і тварин. Використання ліпідів в якості ад'ювантів дозволяє при введенні меншої кількості лікарських засобів (антигенів) отримувати значний імунну відповідь. Ймовірно, такі властивості ліпідних ад'ювантів, як нешкідливість і біодеградіруемість роблять їх вельми перспективними.

II. Контроль опорних знань

Виконати тестові завдання:

1. Прямий перенесення чужорідної ДНК в протопласти можливий за допомогою:

- а) мікроін'єкції;
- б) трансформації;
- в) упаковки в ліпосоми;
- г) культивування протопластів на відповідних поживних середовищах.

2. Субстратами рестриктаз, які використовуються генним інженером, є:

- а) гомополісахаріди;

- б) гетерополісахаріди;
 - в) нуклеїновікислоти;
 - г) білки.
2. Генмаркер »необхідний в генетичній інженерії:
- а) для включення вектора в клітини господаря;
 - б) для відбору колоній, утворених клітинами, в які проник вектор;
 - в) для включення «робочого гена» в вектор;
 - г) для підвищення стабільності вектора.
3. Поняття «липкі кінці» стосовно генетичної інженерії відображає:
- а) комплементарність нуклеотидних після послідовно;
 - б) взаємодія нуклеїнових кислот і гістонів;
 - в) реагування один з одним 8Н-груп з утворенням дисульфідних зв'язків;
 - г) гідрофобна взаємодія ліпідів.
4. Пошук нових рестриктаз для використання в генетичній інженерії пояснюється:
- а) відмінностями в каталітичній активності;
 - б) різним місцем впливу на субстрат;
 - в) видоспецифічністю;
 - г) високою вартістю.
5. Успіх і генетичної інженерії в області створення рекомбінантних білків більше, ніж у створенні рекомбінантних антибіотиків, що пояснюється:
- а) більш простою структурою білків;
 - б) складністю підбору клітин господарів для біосинтезу антибіотиків;
 - в) великою кількістю структурних генів, включених в біосинтез антибіотиків;
 - г) проблемами безпеки виробничого процесу.
6. Фермент лігаза використовується в генетичній інженерії оскільки:
- а) скріплює вектор з оболонкою клітини господаря;
 - б) каталізує включення векторів хромосом у клітин господаря;
 - в) каталізує ковалентное зв'язування вуглеводно-фосфорноїцепі ДНК гена з ДНКвектора;
 - г) каталізує замикання пептидних містків в пептиди-гліканеклеточной стінки.
7. Біотехнологія «ген-маркер» необхідний:
- а) для підвищення активності рекомбінантного;
 - б) для утворення компетентних клітин господаря;
 - в) для модифікації місця взаємодії рестриктаз з субстратом;
 - г) для відбору рекомбінантов.
8. Послаблення обмежень на використання в промисловості мікроорганізмів-рекомбінантний, які продукують гормони людини, стало можливим завдяки:

- а) вдосконалення методів ізоляції генно-інженерних рекомбінантов від навколишнього середовища;
- б) підвищення кваліфікації персоналу, що працює з рекомбінантов;
- в) встановленої експериментально слабкою життєздатності рекомбінантов;
- г) експериментальному підтвердженню обов'язкової втрати чужорідних генів.

9. Вектор на основі плазміди краще вектора на основі фагової ДНК завдяки:

- а) великим розміром;
- б) меншу токсичність;
- в) більшою частоти включення;
- г) відсутності лізису клітини господаря.

10. Активація нерозчинного носія в разі іммобілізації ферменту необхідно:

- а) для посилення включення ферменту в гель;
- б) для підвищення сорбції ферменту;
- в) для підвищення активності ферменту;
- г) для утворення ковалентного зв'язку.

11. Іммобілізація індивідуальних ферментів обмежується такою обставиною, як:

- а) висока лабільність ферменту;
- б) наявність у ферменту коферменту;
- в) наявність у ферменту субодиниць;
- г) приналежність ферменту до гідролаз.

12. Іммобілізація цілих клітин продуцентів лікарських речовин нераціональна в разі:

- а) високою лабільності цільового продукту (лікарської речовини);
- б) використання цільового продукту тільки в ін'єкційній формі;
- в) внутрішньоклітинної локалізації цільового продукту; г) високою гідрофільності цільового продукту;

III. Обговорення теоретичних питань:

1. Пояснити якими перевагами володіють ліпосоми в складі вакцинних препаратів.

2. Яку роль відіграють ад'юванти в імунології, і які властивості ліпосом визначають їх ад'ювантною?

3. Вказати які рекомбінантні продукти використовуються в складі ліпосомальних вакцин. Переваги ліпосомальних рекомбінантних вакцин.

4. Вказати що спільного у вірусної частинки і ліпосоми. Привести приклади ліпосомальних вірусних вакцин, описати структуру і властивості.

5. Наведіть характеристику рибосомних вакцин і їх ліпосомальних форм.

6. Привести приклади бактеріальних білкових ліпосомальних вакцин, описати структуру і властивості.

7. На прикладі ліпосом, що містять антиген MUC1 описати переваги ліпосомальних протипухлинних вакцин.

8. Опишіть механізм забезпечує збереження антигенного матеріалу в складі ліпосомальної вакцини.

Теми доповідей/ рефератів

1. Опишіть основні фізико-хімічні та фармакологічні методи контролю ліпосомальних вакцин.

2. Навести приклади бактеріальних полісахаридних ліпосомальних вакцин, описати структуру і властивості.

3. Які переваги мають ліпосомальні вакцини в порівнянні з вакцинами класичного складу?

4. Доведіть переваги ліпосом як ад'ювант у порівнянні з мінеральними і олійними підсилювачами імунітету.

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. –