

Ю. М. Краснопольский  
М. И. Борщевская

# ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ.

**Технология производства  
иммунобиологических  
препаратов**



Учебное пособие

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
«Харьковский политехнический институт»

**Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская**

**ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ.  
ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА  
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

Учебное пособие

для студентов (в том числе иностранных)  
биотехнологического направления

Утверждено  
редакционно-издательским  
советом университета,  
протокол № 2 от 18. 09. 09.

Харьков НТУ «ХПИ» 2009

ББК 52.6я73  
К 78  
УДК 615.012 (075)

Рецензенты: *И. С. Грищенко*, д-р хим. наук, проф., зав. кафедрой медицинской химии Национального фармацевтического университета  
*Ю. Л. Волянский*, д-р мед. наук, проф., директор Государственного предприятия «Институт микробиологии и иммунологии им. Мечникова И. И.»

Посібник включає необхідні при вивченні біотехнології відомості про принципи досліджень, розробок та виробництва імунобіологічних препаратів. У трьох розділах описані методи одержання і контролю біотехнологічних препаратів: бактеріальних та вірусних вакцин, антитілівмісних продуктів, препаратів на основі штамів пробіотиків. До основного тексту надається глосарій найбільш важливих біотехнологічних термінів.

Призначено для студентів біотехнологічного напрямку підготовки.

### **Краснопольский Ю. М.**

К 78: Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов: учеб. пособие / Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2009.– 352 с.– На рус. яз.

ISBN 978-966-593-777-7

Пособие включает необходимые при изучении биотехнологии сведения о принципах исследований, разработки и производства иммунобиологических препаратов. В трех разделах описаны методы получения и контроля биотехнологических препаратов: бактериальных и вирусных вакцин, антителсодержащих продуктов, препаратов на основе штаммов пробиотиков. К основному тексту прилагается глоссарий наиболее важных биотехнологических терминов.

Предназначено для студентов биотехнологического направления подготовки.

Ил. 15. Табл. 19. Библиогр.: 55 назв.

**ББК 52.6я73**

ISBN 978-966-593-777-7

© Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская, 2009

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Введение</b> .....	5
<b>Раздел 1. Вакцины – вчера, сегодня, завтра</b> .....	7
1.1. История и классификация вакцин.....	7
1.2. Антигены и иммунный ответ.....	18
1.3. Адьюванты.....	28
1.4. Бактериальные вакцины для профилактики инфекционных заболеваний.....	36
1.4.1. Дифтерия.....	37
1.4.2. Столбняк.....	54
1.4.3. Коклюш.....	66
1.4.4. Вспомогательные компоненты вакцин.....	77
1.4.5. Получение адсорбированной коклюшно-дифтерийно- столбнячной вакцины (АКДС).....	81
1.4.6. Туберкулез.....	91
1.4.7. Гемофильная b-инфекция.....	107
1.5. Вирусные вакцины для профилактики инфекционных заболеваний.....	119
1.5.1. Корь, краснуха, эпидемический паротит.....	127
1.5.2. Полиомиелит.....	156
1.5.3. Гепатит В.....	170
1.6. Комбинированные вакцины.....	184
1.7. Завтрашний день вакцинации.....	188
1.7.1. Растительные вакцины.....	188
1.7.2. ДНК-вакцины.....	190
1.7.3. Генно-инженерные вакцины.....	194
1.7.4. Пептидные вакцины.....	197
1.7.5. Рибосомальные вакцины.....	202
1.8. Производство вакцин.....	204

<b>Раздел 2. Препараты иммуноглобулинов различной направленности</b>	215
2.1. Иммуноглобулины крови человека	215
2.1.1. Иммуноглобулин человека нормальный для внутримышечного введения	216
2.1.2. Иммуноглобулины для внутривенного введения	230
2.2. Препараты моноклональных антител	244
<b>Раздел 3. Биотехнология пробиотических препаратов</b>	266
3.1. Характеристика и отбор штаммов	268
3.2. Биотехнологические методы получения препаратов пробиотиков и методы испытаний	275
3.3. Препараты, содержащие штаммы пробиотиков и форма их выпуска	288
3.4. Рекомбинантные пробиотики	298
<b>Раздел 4. Интерфероны</b>	303
4.1. Получение лейкоцитарного альфа-интерферона	306
4.2. Получение рекомбинантного интерферона	312
4.3. Методы контроля препаратов интерферона	318
<b>Глоссарий</b>	323
<b>Список литературы</b>	348

## ВВЕДЕНИЕ

Ни одной медицинской науке человечество не обязано спасением стольких жизней, как вакцинологии. Вакцинопрофилактика доказала свою эффективность как наиболее экономичное средство предупреждения инфекционных болезней. Созданы вакцины против 34 социально значимых инфекций, что привело к значительному снижению заболеваемости дифтерией, столбняком, корью, туляремией, полиомиелитом и исчезновению оспы.

Основной задачей исследования в области вакцинологии является разработка безопасных и высокоэффективных вакцинных препаратов. Весь путь создания вакцин был возможен только при использовании основных достижений биотехнологической науки: открытие анатоксинов и возможность их получения, создание клеточных культур, аттенуация вирусов и бактерий, выделение и очистка полисахаридов, создание рекомбинантных технологий. Каждое открытие биотехнологии и иммунологии – это очередной шаг к созданию новых вакцин, причем, не только для профилактики инфекционных заболеваний. Сегодня вакцины активно используются для лечения ряда заболеваний: аллергических, аутоиммунных, онкологических и др. Так, например, в Украине зарегистрированы две вакцины для лечения и профилактики онкологических заболеваний: вакцина URO-BCG, применяемая для лечения поверхностного рака мочевого пузыря (производства NVI, Нидерланды) и вакцина Гардасил против вируса папилломы человека, рекомбинантная (производство Merck Sharp & Dohme B.V., Нидерланды). Многообещающими являются комбинированные вакцины, обеспечивающие иммунизацию против нескольких инфекционных заболеваний. Совершенствование и развитие производства традиционных вакцин идет параллельно с развитием технологий принципиально новых вакцинных препаратов: ДНК-вакцин; вакцин на основе пептидов; мукозальных и рибосомальных вакцин; создание препаратов, с помощью которых появится возможность влиять на иммунную систему при использовании новых иммуномодуляторов, повышающих иммунный ответ; создание новых систем переносчиков, например, липосом для доставки антигенов или иммуномодуляторов; рекомбинантных вакцин и ряда других.

## Раздел 1. ВАКЦИНЫ – ВЧЕРА, СЕГОДНЯ, ЗАВТРА

### 1.1. История и классификация вакцин

История иммунологии – пример успеха чисто эмпирического метода. Иммунология одерживала победы еще до того, как кто-либо заподозрил существование микроорганизмов, от которых она защищала. Все, по-видимому, началось с древних китайцев и арабов, которые много веков назад заметили, что человек, перенесший оспу, редко болеет ею вновь. В Европу оспа была завезена в VI веке н. э. Крупные эпидемии оспы уносили миллионы жизней. В XVII веке от оспы умерли более 60 млн европейцев. В 1770 году в Индии умерли 3 млн человек, в 1782 году болели оспой почти 90 % населения Италии. В Англии практику оспопрививания ввела леди Монтэгю, супруга британского посла в Константинополе, которая во время пребывания там привила оспу собственному сыну. Вернувшись в 1718 году в Лондон, она сделала решительную попытку приобщить к оспопрививанию своих соотечественников. Несмотря на обрушившиеся на неё громы и молнии леди Монтэгю испробовала прививку на шести осужденных в Ньюгэйтской тюрьме, а затем на сиротах из прихода Лондонской церкви Св. Иакова. Настоящий триумф наступил, когда принцесса Каролина позволила привить оспу двум дочерям короля. С тех пор практика прививок получила широкое распространение. Доктор Уилсон автор книги «Тело и антитело» писал: «В 1718 году одна принцесса стояла в качестве доказательства столько же, сколь сотни тысяч обыкновенных детей в 1956 году...». Как бы то ни было, прививки быстро распространились не только в Англии, но и по всей Западной Европе. Указывалось, что способность оспопрививания предупреждать смерть, особенно молодых мужчин и женщин, послужила решающим фактором значительного прироста населения Англии в первой половине XVIII века. Но, разумеется, и сами прививки вызывали смертность, и притом немалую, т.к. это была крайне опасная процедура, а прививочный материал вполне мог дать толчок к эпидемии оспы. В связи с этим начались поиски более безопасного материала для проведения прививок.

В России оспа была известна еще в XV веке. В XVII веке оспа унесла треть населения Сибири, а у переболевших оставила тяжелейшие послед-

С развитием технологии рекомбинантных ДНК стало возможным создание вакцин следующего поколения, лишенных недостатков традиционных вакцин. Интенсивное развитие биотехнологии, биохимии, иммунологии определило прогресс в развитии мировой фармации и создания высокоэффективных вакцин, как традиционных, так и вакцин нового поколения; препаратов крови, интерферонов, цитокинов и рекомбинантных продуктов различной направленности.

В данном учебном пособии невозможно осветить вопросы, касающиеся разработки и производства всех существующих сегодня в мировой практике вакцин. В связи с этим остановимся только на вакцинах входящих в Календарь прививок, действующий сегодня в Украине.

Широкий спектр вакцин и других иммунобиологических препаратов, применяемый сегодня в мировой практике, требует дальнейшего исследования. Это касается вакцин для профилактики бешенства, различных типов герпеса, гриппа, пневмонии, гепатита А и ряда других вакцин для профилактики инфекционных заболеваний и патологических состояний. Будут рассмотрены вопросы получения и использования ряда генноинженерных продуктов (интерлейкины, интерфероны, цитокины и другие препараты). Вполне возможно, что уже через короткий срок в Календарь прививок будут внесены и другие вакцинные препараты, которые сегодня рассматриваются как кандидаты для обязательных прививок.

Технологии, приведенные в данном учебном пособии, являются принципиально возможной схемой получения иммунобиотехнологических препаратов и не являются технологией конкретного производителя. Попытка их воспроизводства не может закончиться успешно, так как приведены только общие характеристики процессов, позволяющие представить и оценить современное состояние проблемы.

Будущим современной вакцинологии является разработка новых вакцин, основанных на вирусных, бактериальных и других переносчиках, модифицированных с помощью технологии генной инженерии, против одной или нескольких инфекций. Приход биотехнологии и понимание факторов вирулентности инфекционных агентов, соединенное со знанием иммунного ответа человека, свидетельствует о революционном изменении в подходах к разработке вакцин и использованию вакцин в клинике.

В этой публикации суммированы основные технологии, ключевые проблемы и иммунологические цели создания различных видов противовирусных и антибактериальных вакцин.

ствия – слепоту и глухоту. В 1904–1913 гг. в России оспой болели свыше 4 млн человек, из них 400 тыс. погибли, многие десятки тысяч ослепли.

Так, при знакомстве с исследованиями в области конструирования вакцин обращает на себя факт значительной интенсификации в вопросе создания и использования вакцин после 1970 года. С начала 1771 года (Англия) до конца XIX века были предложены и апробированы 4 вакцины (осповакцина, холерная вакцина Хавкина, антирабическая вакцина Пастера, тифозная вакцина Райта). Основателем вакцинологии по праву может считаться Эдуард Дженнер (1749–1823 гг.). Дженнер обнаружил, что крестьяне, работающие с крупным рогатым скотом и переболевшие коровьей оспой не погибали от натуральной оспы. В 1776 году им был использован материал пустулы одной из доярок, который он ввел мальчику – восьмилетнему Джеймсу Фиппсу, о жизни которого до и после опыта нам ничего не известно. С помощью ланцета Дженнер взял немного жидкости из гнойника женщины, заразившейся коровьей оспой, а затем немедленно сделал тем же ланцетом надрезы на руке мальчика. Через несколько дней у Джеймса появились жар и головная боль, а в месте надреза образовался гнойник. Однако температура и все симптомы быстро исчезли, гнойничок, просуществовав несколько дней в виде маленькой язвы, благополучно подсох. Мальчик переболел коровьей оспой, после чего через шесть недель Дженнер заразил его вирусом натуральной оспы. Мальчик не заболел. К счастью для обоих, Дженнера и Фиппса, иммунитет действительно выработался. Таким образом, практика вакцинации получила экспериментальную основу. Эта процедура стала называться *вакцинацией*, т.к. основной болезнетворный материал брался от коровы (по латыни – «*vacca*»). Э. Дженнер начал проводить массовые прививки, что позволило значительно снизить смертность в Англии от натуральной оспы. Как видно, вакцинация против оспы была первой осознанной массовой прививкой в мировой практике. К 1800 г. было вакцинировано 100000 человек. Сегодня, через 230 лет, мы можем говорить о победе вакцинологии над этим особо опасным заболеванием. Подтверждением этого является факт отмены обязательных противооспенных прививок в связи с полным, глобальным искоренением данного вируса на Земле. Последний случай натуральной оспы в результате естественного заражения имел место в Сомали в 1978 году. В настоящее время вирус натуральной оспы рассматривается мировым сообществом в качестве одного из наиболее вероятных объектов применения в био-

террористических акциях. Кроме того, существует реальная угроза появления оспоподобного заболевания, о чем свидетельствуют многочисленные вспышки заболевания людей оспой обезьян (Заир) и оспой буйволов (Индия). Значительный вклад в развитие вакцинологии внес Луи Пастер (1822–1895 гг.), который заслуженно считается основоположником иммунологии. С 1880 года Л. Пастер приступил к проведению экспериментов, направленных на искусственное снижение вирулентности возбудителей инфекционных заболеваний и получению аттенуированных штаммов. Им получены ослабленные штаммы возбудителей куриной холеры и сибирской язвы. Принципы и методы аттенуации бактерий Пастер использовал при получении и практическом использовании вакцины против бешенства, о вирусной природе которого он на современном ему уровне знаний мог только предполагать. Действительно, получив так называемый фиксированный вирус бешенства со стандартной степенью вирулентности, Пастер вносил его субокубитально кроликам, вызывая их заражение. Затем спинной мозг этих кроликов подвергался высушиванию в разные сроки, что вызывало аттенуацию вируса и уменьшение количества живых частичек. Эти исследования привели к созданию антирабических вакцин. И вот наступил день, когда Пастер применил свое искусство и свои открытия уже не на животном, а на человеке: из Эльзаса к нему привезли мальчика по имени Жозеф Майстер, которого искусила бешеная собака. Пастер начал курс, состоящий из 13 инъекций эмульгированного материала спинного мозга кролика, через три дня после того, как ребенок был укушен. Мальчик выжил и до конца своих дней служил привратником Пастеровского института в Париже.

На протяжении многих столетий холера была бичом Западной Европы, унося сотни тысяч жизней. Неудивительно, что разработка холерных вакцин наглядно иллюстрирует развитие иммунологии в начальные годы её практического применения. Первые прививки против холеры с применением живых ослабленных организмов оказались слишком опасным экспериментом, не позволившим начать осуществление сколько-нибудь широких программ. Однако благодаря небольшим изменениям в технологии производства убитой вакцины (вибрион холеры стали убивать не высокой температурой, а химическим веществом – фенолом) удалось получить вакцину, обеспечивающую иммунитет примерно в течение одного года. Но для полной безопасности требовалась повторная иммунизация каждые шесть месяцев. Поэтому вакци-

на годилась только для использования в преддверии эпидемии. Тем временем болезнь в Европе была практически побеждена, причем, не программами иммунизации, а строительством канализационной сети и водопровода. Значительный вклад в борьбу с холерой и чумой внес русский бактериолог и эпидемиолог В. А. Хавкин (1860–1930 гг.). Верный учению Пастера об аттенуации микробов для приготовления вакцин, Хавкин приступил к созданию препарата против холеры. Им была доказана инфекционная природа холеры и впервые разработаны вакцины против холеры (1892 г.) и чумы (1896 г.). В. А. Хавкин провел на себе опыты, доказавшие эффективность и безопасность этих вакцин. Будучи государственным эпидемиологом индийского правительства, непосредственно участвовал в вакцинации населения в Индии во время эпидемий холеры и чумы.

Вопросами борьбы с брюшным тифом занимался англичанин Альмрот Райт – ученый, иммунолог, победивший брюшной тиф. В 1917 году он применил вакцинацию не просто в качестве профилактической меры, а как общий метод лечения инфекций. Райт определял тип микробов, вызывающих местную инфекцию, культивировал их, убивал и вводил полученную вакцину пациенту.

С 1900 по 1960 год были разработаны 10 вакцин (БЦЖ-вакцина, вакцины против коклюша, столбняка, дифтерии, живая и инактивированная вакцина против полиомиелита, вакцины против кори, паротита, гриппа и желтой лихорадки). В 1970–1975 гг. были созданы полисахаридные вакцины против менингококка А и С, вакцины против краснухи и паротита, вакцины живая и инактивированная против полиомиелита на основе человеческих диплоидных клеток. После 1975 года были предложены вакцины против менингококка В, пневмококков, псевдомонасы, герпеса 1 и 2, цитомегаловируса, гриппа, гепатита А и В и др.

Мы подробно остановились на истории создания первых четырех вакцин, используемых цивилизацией для борьбы с особо опасными инфекциями: брюшным тифом, холерой, бешенством, натуральной оспой, которые унесли десятки миллионов человеческих жизней. История создания современных вакцин будет изложена в соответствующих разделах, посвященных отдельным вакцинным препаратам. Осветить принципы конструирования, производства и контроля всех существующих сегодня вакцин практически невозможно. В связи с этим мы остановимся на вакцинных, применяемых в насто-

ящее время в Украине и входящих в *перечень Календаря прививок*, утвержденного МОЗ Украины.

Историю создания вакцин для основных инфекций можно представить в следующем хронологическом порядке:

- оспа – 1798 год;
- бешенство – 1895 год;
- чума – 1897 год;
- дифтерия – 1923 год;
- коклюш – 1926 год;
- туберкулез – 1927 год;
- столбняк – 1927 год;
- желтая лихорадка – 1935 год;
- полиомиелит (инактивированная) – 1955 год;
- полиомиелит (живая) – 1962 год;
- корь – 1963 год;
- эпидемический паротит – 1967 год;
- краснуха – 1969 год;
- гепатит В (плазменная) – 1981 год;
- гепатит В (рекомбинантная) – 1986 год;
- гемофильная В инфекция (НВ) – 1990 год;
- гепатит А – 1992 год;
- ветрянка – 1995 год;
- коклюш (ацеллюлярный) – 1996 год;
- пневмококк – 2000 год.

*Вакцинопрофилактика* – это стимуляция иммунного ответа при введении вакцинных препаратов с целью создания защитного иммунитета к различным инфекциям. При этом происходит активация иммунной системы по следующей схеме:

- захват макрофагами антигенных субстанций;
- представление макрофагами информации об антигене Т-лимфоцитам;
- пролиферация и дифференциация Т-клеток с появлением регуляторных хелперов и супрессоров;
- превращение активированных В-клеток в плазматические антитело-продуцирующие клетки;
- формирование клеток памяти;

- продукция специфических антител.

В процессе антителообразования условно можно выделить три фазы.

*Первая фаза* охватывает период времени с момента введения антигена до формирования антителопродуцирующих клеток. Продолжительность этой фазы 12–24 часа. Её отличительная особенность в том, что в этот период еще можно воздействовать на иммуногенез, усиливая или замедляя его.

*Вторая фаза* – это собственно продукция антител, вплоть до максимального уровня, в соответствии с силой антигена. Продолжительность этой фазы бывает различной – от нескольких дней до 3–5 недель, и повлиять на неё уже нельзя.

*Третья фаза* начинается после достижения наивысшего уровня иммунного ответа, когда концентрация антител медленно снижается в течение нескольких месяцев (шигеллез, сальмонеллез и др.) и многих лет (корь, дифтерия, столбняк и др.). Иммунный ответ на введение антигена всегда строго специфичен, и, кроме того, один и тот же антиген вызывает иммунный ответ разной интенсивности – от слабого или даже нулевого до очень сильного, в соответствии с генотипом и наоборот, один и тот же организм бывает в разной степени реактивным по отношению к различным антигенам.

Имеются существенные различия в иммунной реакции на введение живых и инактивированных вакцин, на первичное и повторное введение антигенов находящихся в вакцинах. При первичной вакцинации в неиммунном организме вакцинный штамм возбудителя, несомненно, попадает в тропный орган, в котором происходит его репродукция с последующим выходом в свободную циркуляцию и включением цепи иммунных реакций, идентичных последовательности реакций при естественной инфекции. Именно поэтому реакция на введение живых вакцин особенно часто возникает по истечении как бы инкубационного периода и проявляется ослабленным симптомокомплексом естественной инфекции. Иммунный ответ в этом случае характеризуется появлением в крови антител класса IgM с последующим переходом на синтез антител класса IgG. При повторном введении антигена (ревакцинация) характеристика иммунного ответа также будет зависеть от типа вакцины (живая или инактивированная). При введении инактивированной вакцины возникает бустерный эффект за счет включения клеток памяти. При этом практически сразу начинается продукция специфических антител, и их уровень бывает более значительным, чем при первичном введении. Третья доза

антигена обычно еще больше усиливает процесс антителообразования, но эта закономерность не бесконечна, поскольку сила иммунного ответа генетически детерминирована. Последующие дополнительные дозы антигена скорее всего не приведут к усилению антителообразования, и, вероятнее всего, могут вызвать эффект иммунодепрессии.

Принципиально иные механизмы включаются при введении живой вакцины в качестве ревакцинирующей дозы, а именно:

✓ у ребенка сохранился уровень специфических антител после вакцинации – ревакцинирующая доза будет нейтрализована находящимися в крови антителами и не произойдет усиления специфического антителообразования;

✓ у ребенка утрачен иммунитет, но сохранились клетки памяти – вторая доза вакцины обеспечит быстрый и выраженный иммунный ответ;

✓ у ребенка отсутствует иммунитет и клетки памяти за счет использования неэффективной вакцины (низкое качество, нарушение холодовой цепи и др.) – введение ревакцинирующей дозы вакцины вызовет цепь последовательных иммунных реакций, свойственных таковым при первой встрече с этим антигеном.

Рассмотрев механизмы действия вакцин, целесообразно представить весь спектр используемых сегодня вакцинных препаратов и дать их классификацию (см. рис. 1).

Прежде всего необходимо отметить, что вакцины, приведенные на схеме можно разделить на *две основные* группы – противовирусные и антибактериальные. В каждой группе присутствуют живые вакцины (корь, краснуха, эпидемический паротит, БЦЖ, полиомиелит), инактивированные вакцины (полиомиелит, коклюш) и субъединичные – химические вакцины, рекомбинантные, анатоксины. *Третьей важной группой* являются комбинированные вакцины, в которые могут входить как противовирусные, так противобактериальные антигены, причем разных типов – инактивированные, субъединичные и живые (АКДС-вакцина, корь – краснуха – паротит, АКДС + гепатит В).



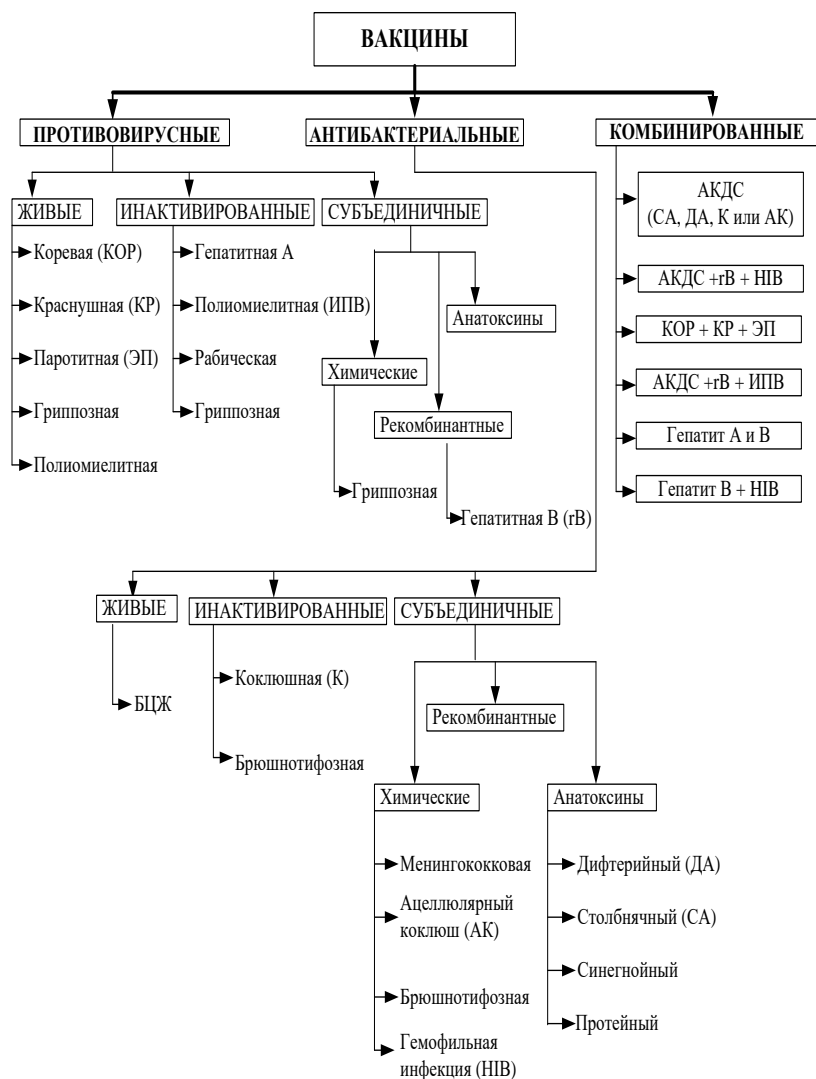


Рисунок 1 – Классификация вакцин

*Живые вакцины* представляют собой препараты, состоящие из аттенуированных возбудителей инфекционных болезней: бактерий и вирусов. Микроорганизмы не способны вызывать специфические заболевания, но сохраняют способность размножения в организме вакцинированного и создания активного иммунитета. Аттенуирование осуществляют следующими методами:

А – искусственное получение аттенуированных штаммов возбудителей путем длительного культивирования на питательных средах в условиях не оптимальных для роста; методом адаптации к новому хозяину путем перевода вируса или бактерии на другой вид животного с отличной восприимчивостью; путем непосредственного воздействия мутагена на генетический материал микроорганизма.

Б – искусственное получение генетических рекомбинантов, сохранивших иммуногенность (при сниженной вирулентности).

В – селекцией спонтанно возникших мутантов с ослабленной вирулентностью, но с сохранением специфических протективных антигенов и иммуногенности.

*Инактивированные вакцины* – получают путем инактивирования вируса или бактерий физическими методами (температура, различные виды облучения и др.), химическими методами (формальдегид, глутаровый альдегид, фенол и др.). При указанной обработке сохраняется как целостность вируса или бактерии, так и их протективные антигены, обеспечивающие иммуногенность вакцины.

*Субъединичные вакцины* представляют собой препараты, содержащие очищенные индивидуальные протективные антигены, полученные из бактериальных экзотоксинов (дифтерийный или столбнячный анатоксины), из капсульных полисахаридов (Hib-вакцина), или очищенные антигены, например, рекомбинантный белок (HbsAg) для профилактики гепатита В.

*Основные требования, предъявляемые сегодня к качеству вакцин* можно сформулировать как: безопасность; иммуногенность, обеспечивающая

высокие протективные свойства и защиту в течение нескольких лет от циркулирующих штаммов.

В последующих разделах будут подробно описаны методы выделения указанных протективных антигенов и принципы конструирования соответствующих вакцин.

Сегодня в перечень обязательных календарных прививок (см. табл. 1) входят вакцины, антигенный состав которых практически неизменен и их применение позволяет держать под контролем инфекционные заболевания, против которых направлены эти вакцины.

Вакцины против туберкулеза – БЦЖ; гепатита В – сорбированная вакцина, содержащая HbsAg; полиомиелита – ИПВ (инактивированная полиомиелитная вакцина), ОПВ (оральная живая полиомиелитная вакцина); кори, краснухи, эпидемического паротита – живые вакцины; гемофильной инфекции – Hib (вакцина, содержащая конъюгированный полисахарид-белковый комплекс); дифтерии, столбняка, коклюша – комбинированная вакцина, содержащая дифтерийный и столбнячный анатоксины и коклюшный компонент – цельноклеточный (АКДС-вакцина) или ацеллюлярный (АаКДС); дифтерии и столбняка – соответствующие анатоксины (АДС, АДСм, АДм).

В тех случаях, когда антигенный состав вирусов или бактерий подвержен систематическим изменениям, создание высокоэффективных вакцин весьма затруднительно (ВИЧ, грипп и ряд других).

Таблица 1 – Календарь профилактических прививок Украины

Возраст	Вакцинация					
		Гепатит В				
1 день		Гепатит В				
3–7 дней	Туберкулез					
1 мес.		Гепатит В				
3 мес.			Дифтерия Столбняк Коклюш	Полиомиелит ИПВ	Гемофильная инфекция	
4 мес.			Дифтерия Столбняк Коклюш	Полиомиелит ИПВ	Гемофильная инфекция	
5 мес.			Дифтерия Столбняк Коклюш	Полиомиелит ОПВ	Гемофильная инфекция	
6 мес.		Гепатит В				
12 мес.						Корь Краснуха Паротит
18 мес.			Дифтерия Столбняк Коклюш	Полиомиелит ОПВ	Гемофильная инфекция	
6 лет			Дифтерия Столбняк	Полиомиелит ОПВ		Корь Краснуха Паротит
7 лет	Туберкулез					
14 лет	Туберкулез		Дифтерия Столбняк	Полиомиелит ОПВ		
15 лет						Краснуха (девочки) Паротит (мальчики)
18 лет			Дифтерия Столбняк			

## 1.2. Антигены и иммунный ответ

*Антигены* – вещества, несущие признаки генетически чужеродной информации, вызывающие при введении в организм его иммунную перестройку и специфически взаимодействующие с лимфоцитами и антителами как *in vitro*, так и *in vivo*. Иммунная перестройка организма в ответ на введение антигенов может проявляться как накоплением, так и специфическим ослаблением или подавлением иммунного ответа. Другими словами, антигены способны взаимодействовать с лимфоцитами и антителами, а при попадании в организм – «запустить» процессы иммуногенеза (иммунологическая активность антигенов) или вызвать состояние иммунологической толерантности (толерогенная активность антигенов).

Если антиген попадает в организм, предрасположенный, то есть имеющий наследственную склонность, к избыточному иммунному ответу (гиперчувствительность), то его называют аллергеном, а специфическое изменение состояния организма, являющееся предпосылкой возникновения патологического иммунологического процесса, аллергией.

В зависимости от иммунологической активности антигены подразделяют на полноценные антигены и гаптены. Полноценные антигены индуцируют иммунный ответ организма и специфически реагируют с иммунокомпетентными клетками и антителами. Гаптены взаимодействуют *in vitro* и *in vivo* со специфическими антителами и лимфоцитами и могут вызывать иммунный ответ организма лишь в тех случаях, когда они искусственно или естественно конъюгированы с другими крупными молекулами, выступающими в роли носителей гаптенных.

Существует несколько понятий, характеризующих вещество как антиген.

1. *Чужеродность* – необходима, чтобы вещество выступало антигеном в отношении данного организма. Например, белок плазмы человека не будет для него антигеном, так как данный белок человеку генетически не чужероден. Если этот белок ввести кролику, для которого он чужероден, то будет наблюдаться иммунный ответ.

2. *Антигенность* или *антигенная специфичность* – способность антигена взаимодействовать с антигенспецифическими рецепторами Т- и В-лимфоцитов и антителами. Это взаимодействие отличается уникальной

специфичностью, так что лимфоциты способны различать особенности строения четвертичной и более низких структур молекул, осуществляя распознавание различных антигенных детерминант, то есть химических групп, определяющих специфичность антигена. Специфичность взаимодействия антител или иммуноглобулиновых рецепторов клеток с антигеном обусловлена их высоким сродством (комплементарностью) к определенным участкам молекулы антигена, называемыми детерминантными участками, или антигенными детерминантами. Число детерминант на молекуле антигена меняется в зависимости от размера молекулы и сложности её строения. Чем больше детерминант имеет данный антиген, тем больше молекул антител он может связать и тем выше его валентность. Валентность антигена возрастает пропорционально молекулярной массе антигена. Так, валентность сывороточного альбумина (м. м. – 70 кДа) равна 6; дифтерийного токсина (м. м. – 70 кДа) равна 8; тиреоглобулина (м. м. – 650 кДа) равна 40; гемоцианина (м. м. – 6500 кДа) равна 230.

3. *Иммуногенность* – способность антигена вызывать иммунный ответ. Детерминанты, обуславливающие антигенную специфичность молекул антигена, могут не совпадать с участками, определяющими их иммуногенность. Иммуногенная активность антигена зависит от его физико-химических свойств и от способности иммунизируемого животного отвечать на данный антиген. По активности (по интенсивности вызываемого антигенами антигенеза) антигены могут быть сильные и слабые. Сильные антигены, как правило, выполняют механическую функцию, обеспечивая определенную прочность клеточных структур; слабые антигены в большинстве своем являются биохимически активными компонентами. К сильным антигенам относятся большинство структур компонентов клетки, к слабым – ферменты, нуклеиновые кислоты, пептиды и др. Антитела против структурных антигенов слабо влияют на жизнедеятельность патогенных микробов. Антитела против ферментов подавляют жизнедеятельность микроорганизмов. Достаточно высокая молекулярная масса – условие хорошей иммуногенности антигенов. Например, если молекулярная масса вещества ниже 10 кДа, то оно, как правило, слабоиммуногенно. Большинство высокоиммуногенных белков имеют молекулярную массу около 100 кДа и выше. Доказано, что способ-

ностью вызывать образование антител в большей степени обладают вещества, имеющие на поверхности заряженные группировки, чем антигены, лишённые заряда. Замечено, что чем сложнее строение молекулы антигена, тем он более иммуногенен. Это было убедительно доказано при изучении синтетических полипептидов. Если полипептид построен из остатков только одной аминокислоты, он, как правило, слабоиммуногенен. Если же полипептид состоит из остатков двух или трех аминокислот, он приобретает иммуногенные свойства. Наличие в антигене ароматических аминокислот (например, тирозина или триптофана) также обеспечивает иммуногенность молекулы.

Для понимания процессов, происходящих при введении вакцин, нам необходимо рассмотреть основные этапы инфекционного процесса. Патогенность микроорганизмов обусловлена наличием трех основных свойств: а) вирулентности – способности жить, размножаться и синтезировать токсины в организме человека или животного; б) инвазивности – свойства преодолевать тканевые барьеры; в) токсигенности – активности образуемого токсина.

В общем виде возникновение инфекционного процесса происходит следующим образом. Патогенный высоковирулентный микроорганизм, проникнув в организм с помощью инвазивности, адгезируется к рецепторам цитоплазматической мембраны или проникает внутрь клетки организма и адгезируется на эндоплазматических мембранах или других структурах. Затем, используя некоторые ферментные звенья и метаболиты клеток хозяина, он адаптируется и начинает быстро размножаться, а также продуцировать токсины. Вмешательство ферментных циклов микроорганизма в ферментные циклы хозяина и действие токсических продуктов вызывает заболевание.

Антигены клеток возбудителя инфекции уже через 12 часов вызывают образование антител к сильным структурным антигенам. Но защитные механизмы под управлением антител против сильных структурных антигенов не замедляют размножения клеток возбудителя заболевания, так как на начальном периоде инфекционного процесса они слабые. Это позволяет микроорганизму с помощью своих ферментов (которые вследствие слабой антигенности на начальном периоде инфекционного процесса не вызывают образования антител) и используемых им ферментных звеньев клеток хозяина жить, размножаться и синтезировать токсин. Сильные структурные антигены, вы-

зывая антителигенез на себя, конкурентно подавляют антителигенез против ферментов микроорганизма. Вследствие слабой антигенности токсинов и конкурентного подавления антителигенеза против них сильными антигенами, образование антител против ферментов (токсинов) микробов происходит значительно позже. После того, как полностью сформировались механизмы антителигенеза к сильным структурным антигенам, по-видимому, начинают формироваться механизмы синтеза антител против слабых антигенов, в основном, ферментов. Антиферментные антитела ингибируют трофические ферментные циклы возбудителя инфекции, лишают его энергии, и он погибает. С появлением в организме антител против токсинов начинается освобождение большого организма от микроорганизмов и выздоровление.

У микроорганизмов антигены связаны с клеткой (эндоантигены) или выделяются ею во внешнюю среду (экзоантигены). Среди эндоантигенов различают антигены жгутиков (Н-антигены), ресничек, капсульные антигены (К-антигены), антигены клеточной стенки (О-антигены), внутриклеточные антигены. Среди экзоантигенов различают экзотоксины, гемолизины, фибринолизины, ферменты. Поверхностные эндоантигены (жгутиковый, капсульный, клеточной стенки) характеризуются большей антигенностью, чем внутриклеточные. Иммуногенность биополимеров, полученных из микробных клеток после выделения и очистки, значительно ослабевает.

Жгутиковые Н-антигены (от нем. *Nauch* – дыхание) – термолабильные белковые антигены, в которых носителем антигенности является флагеллин.

Капсульные К-антигены, разделяющиеся по чувствительности к температуре на А- (наиболее термостабильные), В- (менее термостабильные) и L- (термолабильные) антигены, в большинстве случаев состоят из кислых полисахаридов.

*Антигены клеточной стенки.* Это, прежде всего, О-антиген (от нем. *Ohne hauch* – без дыхания), локализующийся в клеточной стенке грамотрицательных бактерий. О-антиген представляет собой комплекс липидов (в основном фосфолипидов), белков и углеводов, обозначаемый как эндотоксин. По существующим представлениям, белок отвечает за иммуногенность О-антигена, липид отвечает за острые неспецифические токсические эффекты, а полисахарид определяет антигенную специфичность.

**Внутриклеточные антигены.** Это антигены цитоплазматических мембран, цитоплазмы, митохондрий, рибосом ядра и другие, определяющие органоидную специфичность. Эти антигены представлены белками и нуклеиновыми кислотами.

**Бактериальные белковые токсины.** Эта группа антигенов относится к экзотоксинам. Значительная часть токсинов – ферменты, обладающие протеолитической, липолитической или коагулирующей активностью.

**Протективные антигены.** Это группа иммунологически активных компонентов патогенных микроорганизмов, включающая антигены различной химической структуры. Их общее свойство – способность вызывать продукцию защитных антител, предохраняющих макроорганизм от развития патологического процесса. В состав протективных антигенов входят представители всех групп антигенов. Все вакцины, используемые в настоящее время, содержат в своем составе протективные антигены.

**Антигены вирусов.** Антигенный состав вирусов сложен и зависит от структуры вирусов. Вирусы, как правило, являются сильными иммуногенами. Носителями их антигенности чаще всего выступают белки и комплексы белков с углеводами, липидами и нуклеиновыми кислотами. У вирусов различают поверхностные антигены (антигены, имеющие первостепенное значение для формирования активного иммунитета) и внутренние антигены (антигены, играющие роль в патогенезе инфекции, которые являются чужеродными, аллергенными и нередко токсигенными веществами). Те и другие являются *вирусоспецифичными антигенами*. Так, например, для вируса гриппа это гликопротеин, гемагглютинин и фермент нейраминидаза. Кроме вирусоспецифических антигенов, у вирусов формируются антигены клетки-хозяина – *клеточноспецифические антигены* вириона. Они образуются во время созревания и «отшнуровывания» вируса из ядра и клеточной мембраны. Способность вируса включать в структуры своих наружных оболочек антигенные компоненты клеток, в которых они репродуцируются, является особенностью вирусов, отличающей их от бактерий и всех других живых организмов.

Антигены подразделяются на Т-зависимые и Т-независимые. Антигены, которым для начала образования антител В-клетками требуется участие

Т-лимфоцитов, называют *Т-зависимыми*. Антигены, которые могут вызвать выработку антител В-клетками без помощи Т-лимфоцитов, называют *Т-независимыми* антигенами.

К Т-независимым антигенам относятся высокополимерные белки (флаггелин, ферритин), полисахариды, декстраны, синтетические полимеры и др. Для Т-независимых антигенов характерно многократное повторение однородных детерминант на молекуле антигена, которая обычно имеет форму длинной, иногда разветвленной цепочки. Т-независимые антигены легко индуцируют антителообразование, однако антитела к ним обладают сравнительно низким аффинитетом. Бактерийные полисахаридные антигены относятся к Т-независимым антигенам. Сахара определяют иммунологическую специфичность антигенов. Полисахариды, находящиеся на поверхности грамотрицательных бактерий, состоят из повторяющихся олигосахаридных цепочек, которые характерны для отдельных видов бактериальных антигенов и определяют их специфичность.

К Т-зависимым антигенам относятся белки и полипептиды (альбумины, глобулины, бактериальные белки и др.). Как правило, бактериальная клетка содержит Т-зависимые и Т-независимые антигены, вирус – только Т-зависимые антигены.

Антиинфекционный иммунитет находится под контролем генов, расположенных как в главном комплексе гистосовместимости (МНС), так и вне его.

Существует две системы генетического контроля иммунологической устойчивости организма к инфекциям:

а) контроль неспецифической резистентности организма к инфекциям. Эта резистентность зависит от функционального состояния макрофагов и контролируется генами, не связанными с МНС;

б) контроль развития приобретенного иммунитета за счет генов МНС.

Генетический контроль приобретенного иммунитета осуществляется Ig-генами (immune respons), обеспечивающими силу иммунного ответа, регулирующими клеточное взаимодействие, кодирующими первичную структуру иммуноглобулинов и рецепторов лимфоцитов. Иммунологическая способность адекватного ответа на введение в организм антигенов вакцины не свя-

зана с особенностями самого антигена, а контролируется генетически у каждого человека Ig-генами главного комплекса гистосовместимости. Иммуноглобулины кодируются тремя не сцепленными группами структурных генов. В состав каждой группы генов входят наборы генов, кодирующих переменную и константную области иммуноглобулинов. В генетических особенностях отдельных групп людей кроется причина неоднородности иммунного ответа, появление слабых и сильных реакций на инфекцию и вакцинацию. Ig-гены – доминантные гены, они контролируют: тимусзависимое антителообразование; развитие повышенной чувствительности замедленного типа; Т-хелперы; рестриктирование по МНС; пролиферирующие Т-клетки и эффекторные Т-клетки. Ig-гены локализованы в МНС. Продуктами Ig-генов являются антигены классов I и II. Оба класса антигенов принимают участие практически во всех иммунологических реакциях. При вирусных инфекциях антигены класса I играют главенствующую роль в формировании антигенспецифических цитотоксических лимфоцитов. В других проявлениях антиинфекционного иммунитета в качестве продуктов Ig-генов выступают антигены класса II, названные Ia (I region associated) антигенами (Ia-a).

Основными причинами слабой иммунной реакции на антиген являются отсутствие соответствующего антигена гистосовместимости, способного давать комплекс с пептидом антигена и (или) отсутствие клона Т-лимфоцитов, способных распознавать такой комплекс. МНС человека расположен в 6-й хромосоме.

Антигены I класса являются гликопротеинами, включенными в мембрану практически всех клеток микроорганизма. Они построены из двух полипептидных цепей: тяжелой цепи (м. м. 44 кДа), несущей антигенную специфичность и нековалентно связанную с ней легкую цепь (м. м. 11,5 кДа), представляющую собой B2 –микроглобулин. Каждая цепь контролируется отдельным геном. Антигены I класса являются продуктами трех редуцированных локусов HLA-A, HLA-B, HLA-C.

Антигены II класса представляют собой гликопротеиды (м. м. 60–65 кДа). Молекула Ia-a состоит из двух полипептидных цепей: альфа (м. м. 29 кДа) и бета (м. м. 34 кДа), нековалентно связанных. Третья, инвариантная цепь (м. м. 31 кДа), не участвует непосредственно в клеточном

взаимодействии. Основным источником Ia-a служат макрофаги, дендритные клетки, клетки Лангерганса и В-клетки. Эти же клетки выполняют функции вспомогательных клеток, участвующих в процессинге и презентации антигена. Антигены II класса являются продуктами тесно сцепленных генов, обозначаемых как зона HLA-D.

Обнаружены антигены III класса, представляющие собой компоненты системы комплемента C4, C2, BF.

Антигены I класса экспрессированы всеми клетками организма, антигены II класса экспрессированы, в основном, на клетках иммунокомпетентной системы или клетках, принимающих неспецифическое участие в формировании иммунного ответа, например, на клетках эпителия. Антигены класса I присутствуют с разной плотностью на многих тканях организма, включая В-клетки, Т-клетки, тромбоциты. Количество серологически выявляемых специфичностей достаточно велико, и система HLA является наиболее полиморфной из всех известных генетических систем человека.

С участием Ia-a происходит активация следующих групп иммунокомпетентных клеток: Т-клеток, пролиферирующих под влиянием антигена; Т-хелперов образования антител; Т-хелперов, обеспечивающих созревание клеток-киллеров; клеток эффекторов повышенной чувствительности замедленного типа (ПЧЗТ); клеток мишеней для хелперных и супрессорных лимфоцитов; некоторых В-клеток и некоторых Т-супрессоров. Ia-a способны взаимодействовать с антигенами и служат мишенью для антигенреактивных клеток при первичном иммунологическом распознавании. Таким образом, антигены класса I и II являются продуктами Ig генов, средством клеточного взаимодействия и генетической рестрикции иммунологических реакций.

Таким образом, МНС принимают непосредственное участие в инициации иммунного ответа, контролируя молекулы представляющим антиген в иммуногенной форме для его распознавания цитотоксичным Т-клеткам и хелперным Т-клеткам. Под контролем МНС проходят такие иммунные процессы, как регуляция силы гуморального (В-клеточного) и клеточного (Т-клеточного) иммунного ответа, обеспечение иммуногенности проникшего или введенного в организм антигена, а также селекция специфических Т-клеток в тимусе.

Н.В. Медуницын (1999 г.) описал стадии иммунного ответа в виде следующей схемы (см. табл. 2).

Таблица 2 – Стадии развития иммунного ответа

Стадии иммунного ответа	Клетки, участвующие в развитии стадии	Иммунологические процессы
1	2	3
	Макрофаги	Процессинг и презентация антигена
Пролиферативная стадия	Дендритные клетки Клетки Лангерганса Антигенреактивные лимфоциты Т-хелперы, Т-супрессоры, В-супрессоры Амплифайеры Контрсупрессоры	<p>Сущность процессинга заключается в ферментативной переработке антигена, пептидные детерминанты которого становятся доступны для распознавания их Т-клетками. Происходит восстановление дисульфидных связей, что позволяет развернуть белковую молекулу антигена. Эта стадия состоит из трех этапов: эндоцитоз антигена (фагоцитоз, пиноцитоз); его расщепление (процессинг) и представление (презентация) антигена Т-клеткам. Нативный антиген взаимодействует с поверхностью вспомогательной клетки за счет рецепторов неспецифического связывания с мембраной клетки. Образующиеся фагоцитарные и пиноцитарные пузырьки погружаются внутрь клетки и сливаются с лизосомами. Благодаря кислой среде и наличию протеаз происходит переработка антигена – расщепление белковых молекул антигена на мелкие фрагменты (пептиды) или отдельные аминокислоты.</p> <p>Пептидные фрагменты взаимодействуют с Ia-a, которые образуются в той же клетке.</p> <p>Комплекс Ia-a с фрагментом антигена с помощью экзоцитоза транспортируется на поверхность клетки, где распознаются Т-хелперами. Комплекс пептида с антигенами класса II получил название суперантигена. Антигенность такого комплекса во много раз выше по сравнению с активностью пептида и непротессированного нативного антигена.</p> <p>Стадия характеризуется пролиферацией, дифференцировкой иммунорегуляторных клеток и действием иммунорегуляторных медиаторов (цитокинов) клеточного взаимодействия.</p>

Продолжение таблицы 2

1	2	3
Эффекторная стадия	Т-киллеры Т-эффекторы ПЧЗТ Плазматические клетки	Эффекторная стадия заключается в активации эффекторных клеток, в результате происходит выделение неспецифических эффекторных медиаторов, развитие клеточных реакций и образование циркулирующих антител.
Иммунологическая память	Т-киллеры Т-эффекторы ПЧЗТ Плазматические клетки Т- и В-клетки памяти	Благодаря иммунологической памяти организм приобретает способность быстро реагировать на повторный контакт с антигеном. Она характерна для клеточного и гуморального иммунитета, зависит от формирования дочерних Т-клеток и, вероятно, В-клеток. Малые лимфоциты под влиянием антигена превращаются в бласты, проходят серию митозов и снова превращаются в малые лимфоциты, возможно, в клетки памяти. Иммунологическая память, особенно память Т-лимфоцитов, очень стойкая и может сохраняться многие годы. При некоторых инфекциях антитела в крови сохраняются на протяжении десятилетий. Полупериод жизни самого устойчивого иммуноглобулина составляет в среднем 25 дней. Таким образом, в организме постоянно происходит ресинтез специфического иммуноглобулина.

Таким образом, реакцию организма на введение антигенов различной природы можно представить как:

- захват антигена макрофагами;
- расщепление (процессинг) и представление (презентация) пептидных фрагментов антигена Т-клетками;
- пролиферация и дифференцировка Т-клеток с появлением регуляторных хелперов и супрессоров, цитотоксических клеток и клеток памяти;

- активация В-клеток с превращением их в плазматические антитело-продуцирующие клетки;
- формирование иммунной памяти;
- продукция специфических антител;
- снижение уровня антител.

### 1.3. Адьюванты

Основной задачей получения антигенов, используемых в составе вакцин, является их высокая очистка от балластных примесей различной природы: белковых, липопротеидных, полисахаридных и других. Хорошо известно, что данные компоненты способны усиливать иммуногенность вводимых веществ. В то же время их присутствие нежелательно в связи с их влиянием на проявление побочного действия вакцин. Именно этот факт заставляет использовать для конструирования вакцин иммуностимуляторы, получившие название *адьюванты*. К применению адьювантов в вакцинологии предъявляются довольно жесткие требования. *Во-первых*, они должны быть свободными от посторонних примесей и не вызывать побочных иммунных реакций. *Во-вторых*, они не должны быть онкогенными или аллергенными веществами и вызывать появление соответствующих соединений в организме. *В-третьих*, адьюванты не должны содержать антигены, сходные с антигенами хозяина (появление таких антигенов может привести к аутоиммунным реакциям). *В-четвертых*, после выполнения своих функций адьюванты должны достаточно легко метаболизироваться.

Большинство исследователей считают, что адьюванты оказывают комбинированное действие как на антиген, изменяя его физико-химические свойства и усиливая иммуногенность, так и непосредственно на организм, вызывая ряд неспецифических реакций, которые или сами выполняют защитные функции (воспаление, плазмоцитарная функция), или на основе которых разворачивается процесс иммуногенеза, но уже под влиянием присутствия в организме специфического чужеродного антигена. Влияние адьювантов на свойства антигена касается изменения его структуры, молекулярного веса, полимерности, растворимости и других физико-химических параметров антигена.

Сегодня известно значительное количество адьювантов, отличающихся происхождением (природные и синтетические) и физико-химическими свойствами.

1. Минеральные адьюванты.
2. Растительные адьюванты (сапонины, адьювант – QS21), выделенный из южноамериканского дерева *Quillaja Saponaria*. Иммуностимулирующий комплекс «ISCOM» представляет собой адьювантную фракцию *Quillaja Saponaria*, включенную в частицы, состоящие из холестерина, природных фосфолипидов и антигенов клеточных мембран. ISCOM вводили в состав вакцин против вируса гриппа, вируса папилломы человека, ВИЧ, возбудителя малярии, ряда опухолей и др.
3. Масляные адьюванты (адьювант Фрейнда, минеральные масла, животные или растительные масла).
4. Цитокины (например, интерлейкины ИЛ-1- $\alpha$  и ИЛ-1- $\beta$ ) и пептиды.
5. Микробные адьюванты: корпускулярные и субъединичные структуры, белки, нуклеиновые кислоты, липиды, углеводы, липополисахарид-белковые комплексы.
6. Синтетические вещества: полинуклеотиды, пептиды.
7. Сложные искусственные адьювантные системы (липосомы, микрокапсулы).
8. Белки теплового шока, обладающие способностью доставлять антиген антигенпредставляющим клеткам.

В использовании адьювантов нуждаются высокоочищенные вакцины бактериальных лизатов, анатоксины, рекомбинантные, синтетические и вирусные вакцины. Выбор адьюванта при создании вакцины зависит, прежде всего, от свойств используемого антигена: размера молекулы, её заряда и молекулярной массы, химической структуры, степени растворимости и т.д. В результате взаимодействия адьювант не должен изменять специфичность антигенных свойств вакцины. Взаимодействие антигена с адьювантом не должно необратимо изменять структуру антигена.

При всем многообразии адьювантов, известных в настоящее время, для нас наиболее интересными являются адьюванты, используемые в составе коммерческих вакцинных препаратов. Поэтому мы остановимся на нескольких группах адьювантов, наиболее часто используемых в составе вакцин.



**Минеральные адьюванты.** В качестве минеральных адьювантов наиболее часто используются гидрат окиси алюминия, фосфат алюминия, фосфат кальция, хлористый кальций. Минеральные адьюванты стимулируют преимущественно гуморальный иммунитет, действуя на вспомогательные клетки и лимфоциты. Иммуногенность сорбированных препаратов повышается в сотни раз. Эффективность сорбированных вакцин зависит от степени сорбции, соотношения антигена и адсорбента в процессе сорбции, ионной силы, pH, температуры и времени сорбции.

В сорбированных препаратах сорбент добавляют на завершающих стадиях изготовления вакцин. Адсорбент добавляют в количестве, обеспечивающем максимальную сорбцию необходимой дозы антигена. Более полная сорбция антигена на гидроокиси алюминия происходит при значении pH 6,7–7,3; на фосфате алюминия – при значении pH 5,0–5,5. Установлено, что белки вируса гриппа, адсорбированные на производных алюминия, вызывают значительно более высокие титры противогриппозных антител, при значительно меньшей реактогенности по сравнению с несорбированными вирусными препаратами. Адьюванты на основе солей алюминия создают условия для депонирования препарата, что приводит к замедлению его всасывания. При работе с данным видом адьювантов необходимо учитывать и отрицательные стороны их использования: старение геля, расслоение при хранении, недостаточную дисперсность и десорбцию антигена с адьюванта при замораживании и оттаивании препаратов. В таблице 3 приведены вакцины, содержащие в качестве адьюванта минеральные вещества.

**Синтетические полиионы.** За последние годы разработаны новые синтетические полиионы с контролируемой структурой. Такие адьюванты индуцируют T-независимый ответ и позволяют обойти генетический контроль иммунного ответа. Такая фенотипическая коррекция обеспечивает высокий уровень ответа даже у низкореагирующих пациентов. В России уже несколько лет выпускается гриппозная вакцина с полиоксидонием, который представляет собой N-производное полиэтиленпиперозина с высоким молекулярным весом. Проходят испытания еще две вакцины с таким же адьювантом: сальмонеллезная и чумная. Авторами полиоксидония проведены исследования по изучению иммуномодулирующего влияния адьюванта на иммуногенность вакцины против гепатита А – «Геп-А-ин-ВАК» производства «Вектор-БиАльгам» (Россия). В работе были использованы коммерческая форма указанного препарата, адсорбированная на гидроокиси алюминия;

экспериментальные серии вакцины, в которые вместо гидроокиси алюминия был добавлен полиоксидоний. Оценку иммуногенности проводили по двум показателям: проценту сероконверсий и титру антител.

Несомненно, интересен адьювант IC 31 с контролируемой структурой, разработанный австрийской фирмой Intercell и нашедший применение при испытаниях противотуберкулезных вакцин. В состав адьюванта входит короткий катионный пептид KLK и олигодеоксинуклеотид – ODN1a. Разработчики установили индуцирование адьювантом T-независимого ответа.

**Липосомы.** Создание искусственных мембран-липосом является одним из перспективных направлений современной нанобиотехнологии. Липосомальные носители обладают рядом несомненных преимуществ:

- защищают клетки организма от токсического действия лекарственных средств;
- пролонгируют действие введенного в организм лекарственного средства;
- защищают лекарственные вещества от деградации;
- способствуют проявлению нацеленной специфичности за счет селективного проникновения из крови в ткани;
- изменяют фармакокинетику лекарственных препаратов, повышая их фармакологическую эффективность;
- позволяют создать водорастворимую форму ряда биологически активных веществ, увеличивая тем самым их биодоступность.

В связи с вышеизложенным становится понятен интерес, который возник в последнее десятилетие к липосомам как к перспективным адьювантным компонентам. Одно из основных требований к адьювантам – их способность расщепляться и выводиться из организма. Липосомы в полной мере отвечают этим требованиям. Состоящие из природных или (реже) синтетических фосфолипидов (фосфатидилхолина, фосфатидилинозита, фосфатидилсерина и др.) с определенным количеством природного холестерина, липосомы легко биодеградируемы и безвредны. Кроме того, методы очистки липидов позволяют получать высокоочищенные компоненты, в которых количество примесей не превышает 5–10 %, причем эти примеси также фосфолипидной природы. Субстанции для липосом апирогенны и нетоксичны. Немаловажным является возможность получения вакцин с липосомальными адьювантами, которые могут легко подвергаться стерилизующей фильтрации, в отличие от минеральных сорбентов. Это, в свою очередь, позволяет проводить стерилизующую фильтрацию на каждом этапе получения вакцинных препаратов, что может позволить отказаться в ряде случаев от консервантов. Липосомы снижают токсичность встроенных антигенов и обладают хорошей биосовместимостью. В табл. 3 приведены вакцины, содержащие в качестве адьювантов липосомальный компонент.

Таблица 3 – Адьювантный состав бактериальных и вирусных вакцин

Наименование препарата	Производитель	Наименование антигена	Адьювант	Примечание
1	2	3	4	5
<b>Avaxim</b> , вакцина, инактивированная для профилактики гепатита А	Aventis Pasteur, Франция	Вирус гепатита А	Алюминия гидроксид	Коммерческий препарат
<b>Heberbiovac</b> , вакцина для профилактики гепатита В	Heber Biotec, Куба	Антиген гепатита В, HBsAg	Алюминия гидроксид	Коммерческий препарат
<b>Engerix-B</b> , вакцина для профилактики гепатита В	SmithKline Beecham Biological, Бельгия	Антиген гепатита В, HBsAg	Алюминия гидроксид	Коммерческий препарат
<b>Encepur</b> , вакцина против клещевого энцефалита	Chiron Behring GmbH, Германия	Вирус клещевого энцефалита	Алюминия гидроксид	Коммерческий препарат
<b>Infanrix HepB</b> , вакцина для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша, гепатита В	SmithKline Beecham Biological, Бельгия	Дифтерийный и столбнячный анатоксины, антиген гепатита В, три очищенных коклюшных антигена	Алюминия гидроксифосфат сульфат	Коммерческий препарат
<b>Gardasil</b> , вакцины против вируса папилломы человека	Merck Sharp Dohme B.V., Нидерланды	Рекомбинантные антигены белка вируса папилломы	Алюминия гидроксифосфат	Коммерческий препарат
<b>TD-Vaccine Behring</b> , вакцина против дифтерии и столбняка	Chiron Behring GmbH, Германия	Дифтерийный и столбнячный анатоксины	Алюминия гидроксид	Коммерческий препарат
<b>D.T.COQ</b> , вакцина для профилактики, коклюша дифтерии и столбняка	Aventis Pasteur, Франция	Коклюшный компонент, дифтерийный и столбнячный анатоксины	Алюминия гидроксид	Коммерческий препарат

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5
<b>Epaxol – Berna Vaccine</b> , вакцина для профилактики гепатита А	Swiss Serum Vaccine Institute, Швейцария	Антиген гепатита А	Липосомы	Коммерческий препарат
<b>Inflexal virosomal Influenza</b> , вакцина для профилактики гриппа	Swiss Serum Vaccine Institute, Швейцария	Гемагглютинин и нейраминидаза	Липосомы	Коммерческий препарат
<b>Diphtheria/Tetanus/Hepatitis – A vaccine</b> , вакцина для профилактики дифтерии, столбняка, гепатита А	Swiss Serum Vaccine Institute, Швейцария	Антиген гепатита А, дифтерийный и столбнячный анатоксины	Липосомы	1–2 фаза изучения
<b>Hepatitis A/B, Tetanus and Diphtheria</b> , вакцина для профилактики гепатита А и В, дифтерийный и столбнячный анатоксины	Swiss Serum Vaccine Institute, Швейцария	Антигены гепатита А и В, дифтерийный и столбнячный анатоксины	Липосомы	1–2 фаза изучения
<b>Lipovaca Influenzal</b> , вакцина для профилактики гриппа	Болгария	Гемагглютинин и нейраминидаза	Липосомы	Коммерческий препарат
<b>Invivac virosomal Influenza vaccine</b> , вакцина для профилактики гриппа	Solvay, США	Гемагглютинин и нейраминидаза	Липосомы	Коммерческий препарат

Как видно из приведенных данных, основные используемые в настоящее время вакцины включают в качестве адьювантов либо минеральные адьюванты, содержащие алюминий, либо липосомы, которые являются более перспективными компонентами вакцин, так как они имитируют биологические мембраны клеток бактерий и вирусов. Это обеспечивает более естественную презентацию антигенов по сравнению с другими видами адьювантов.

Полученные различными авторами данные свидетельствуют: если введенные в водном растворе антигены приводят к отрицательному или очень

слабому иммунному ответу, то инкапсулирование их в липосомы позволяет получить высокие титры специфических антител в сыворотке крови. При подкожной инъекции морским свинкам поверхностного антигена вируса гепатита (HBsAg) получены высокие титры антител, защищающих животных от инфицирования вирусом гепатита В. Показано, что HBsAg, включенный в липосомы, состоящие из яичного фосфатидилхолина, холестерина и додецилфосфата в соотношении 7 : 2 : 1, приводит к появлению антител в титрах в 750 раз больше, чем при иммунизации свободным раствором антигена. Особый интерес представляют данные, полученные исследователями при изучении иммуногенности липосомальной вакцины с антигенными пептидами, выделенными из гликопротеина вируса лимфоцитарного хориоменингита. Инкапсулированные в липосомы пептиды обладали высокой иммуногенностью при внутрикожном введении и вызывали защитный противовирусный иммунитет. После внутрикожной инъекции липосомы образовывали депо антигена, которое облегчало длительную загрузку антигена дендритными клетками практически только в местные лимфоузлы. Иммуногенность липосомальной пептидной вакцины еще более повышалась при введении в липосомы иммуностимулирующих олигонуклеотидов, что также приводило к значительному активированию дендритных клеток. Предложенная липосомальная пептидная вакцина вызывала защитный противоопухолевый иммунитет. Учитывая, что реакции противоопухолевых и противовирусных Т-клеток вызываются, в основном, дендритными клетками, транспортирующими антиген с периферии в организованные лимфоидные ткани, можно предположить, что активирование дендритов липосомальными пептидными вакцинами свидетельствует об их высокой иммуногенности и возможности создания защитной противовирусной или противоопухолевой иммунной реакции.

С целью изучения возможности применения липосомальных вакцин для пероральной иммунизации готовили липосомы из фосфатидилхолина, содержащие в качестве антигена бычий сывороточный альбумин. Липосомы были покрыты выделенным из дрожжеподобного грибка полисахаридом. Последний был представлен в двух формах: природный и модифицированный в пальмитиновое производное. Иммуностимулирующее действие изучали путем определения содержания иммуноглобулинов А и G в сыворотке животных после перорального введения полученных липосом. Использование липосомального препарата приводило к более высоким титрам антиальбумино-

вых иммуноглобулинов по сравнению со свободным альбумином, причем модифицированный полисахарид приводил к значительно более высоким титрам, чем при иммунизации природным соединением. Полученные результаты дают основание предположить, что липосомы, покрытые химически модифицированным полисахаридом, могут быть использованы в качестве потенциальных адъювантов для эффективной пероральной иммунизации.

Существующие вакцины против гриппа, применяемые в настоящее время, представляют собой преимущественно вакцины из инактивированного вируса. Существует три вида вакцин: вакцины из цельного вируса, вакцины из фрагментированного вируса и вакцины на основе отдельных антигенных фрагментов вируса гриппа, например, гемагглютинина и нейраминидазы. Для повышения иммуногенной активности используют адъюванты липосомальной природы. Изучение безвредности и иммуногенности коммерческих противогриппозных вакцин проводили на двух группах больных. Первой группе вводили вакцину, содержащую гемагглютинин, а второй группе лиц вводили вакцину, полученную путем введения гемагглютинина в мембрану липосом, состоящих из природного фосфатидилхолина. Для исследования использовали трехвалентную вакцину. Обе вакцины вызывали одинаковый достоверный подъем среднего титра противогемагглютининовых антител. Однако достоверно большее количество лиц, иммунизированных липосомальной вакциной, демонстрировали более чем четырехкратное повышение титра против вируса штамма Сингапур и Пекин по сравнению с коммерческой вакциной. Процент больных, у которых титр при иммунизации липосомальной вакциной достигал защитной величины, был также значительно выше. Особое клиническое значение имел тот факт, что у 68,4 % лиц, иммунизированных липосомальной вакциной, достигался защитный уровень антител против всех трех компонентов вакцины, в отличие от 38 % при вакцинации обычной вакциной.

В настоящее время проводится изучение интраназального применения противогриппозной вакцины Invivac вместо общепринятого внутримышечного или подкожного.

Ключевыми аспектами, влияющими на разработку новых эффективных адъювантов и вакцин, предназначенных для человека, являются безопасность, высокая степень очистки и физико-химические характеристики окончательного состава адъювантов. Липосомы проявляют свою безопасность в

клинических условиях при использовании их как адъювантов вакцин для вирусных и бактериальных антигенов. Были подтверждены в клинических условиях тесты контроля качества, установившие высокую степень очистки, безопасность и стабильность липосомальных вакцин. Липосомы можно рассматривать как основных кандидатов для улучшения иммуногенности как антигенов с гидрофобными участками, так и растворимых немембранных протеинов. Расположение антигена, т.е. абсорбирован ли он или присоединен к липосомальной поверхности при помощи ковалентных связей, или инкапсулирован во внутренний объем липосомы, имеет важное значение и определяет в значительной степени иммунобиологические свойства вакцин.

Таким образом, накопленные данные свидетельствуют о высоком адъювантном действии липосом. Отрицательно заряженные липосомы стимулируют более высокие показатели титров антител, чем положительные. На интенсивность иммунного ответа влияет также способ введения препаратов. Наиболее высокие титры антител выявляются при подкожном введении липосомальных вакцин. В отличие от других адъювантов, в месте инъекции образования гранул не происходило. Еще одно преимущество применения липосом как иммунологических адъювантов состоит в том, что если антиген заключен внутрь липосомы, то можно в значительной степени избежать реакций гиперчувствительности.

Преимуществом липосомальных адъювантов является следующее: антигены с низкой иммуногенностью могут быть превращены в высокоэффективные антигены; в липосомы можно включать гидрофобные антигены; с помощью липосомальных вакцин можно достигнуть длительного продолжения специфического действия антител; использование липосом позволяет уменьшить токсичность и пирогенность антигенов и адъювантов.

Липосомальные адъюванты нашли широкое применение при вакцинации человека и животных. В настоящее время ведутся разработки липосомальных вакцин против гриппа, дифтерии, столбняка, гепатитов А и В, кишечных инфекций и ряда других.

#### **1.4. Бактериальные вакцины для профилактики инфекционных заболеваний**

Методы вакцинации, предложенные английским врачом Э. Дженнером в конце XVIII века, которые усовершенствовали Л.Пастер и другие ученые в XIX веке, дают возможность развить у организма приобретенный активный иммунитет. С помощью искусственно введенных патогенов, которые по

своему действию похожи на настоящих возбудителей болезни, организм учится бороться с попавшими в него опасными микробами и распознавать их. Другому исследователю, немецкому бактериологу Эмилю Адольфу Берингу, принадлежит первый метод создания пассивного иммунитета. Он разработал способ иммунизации против дифтерии. В 1890 году Беринг вместе со своим сотрудником, японским микробиологом Шибасабуо Китасато, установил, что при инъекции животным стерильных культур из бацилл столбняка или дифтерии в крови образуются антитела, способные нейтрализовать токсины, выделяемые живыми микроорганизмами. Выяснилось одно еще более важное обстоятельство – антитоксины (сыворотка) одного животного, введенная другому, может излечивать.

В настоящее время в Украине используется в зависимости от показаний пять препаратов, содержащих антигены против столбняка, дифтерии и коклюша: адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина (АКДС-вакцина); адсорбированный дифтерийно-столбнячный анатоксин (АДС-анатоксин); адсорбированный дифтерийно-столбнячный анатоксин с уменьшенным содержанием антигена (АДС-М анатоксин); адсорбированный дифтерийный анатоксин с уменьшенным содержанием антигена (АД-М анатоксин); адсорбированный столбнячный анатоксин (АС-анатоксин). Учитывая, что в АКДС-вакцине присутствуют все три компонента, мы рассмотрим производство только этого препарата.

##### **1.4.1. Дифтерия**

Дифтерийный токсин (*Corynebacterium diphtheriae* toxin) является первым из открытых микробных экзотоксинов. Изучение данного токсина проводится уже более 110 лет.

Дифтерийный анатоксин был одной из самых первых вакцин, предназначенных для защиты от бактериальной инфекции. Благодаря иммунизации эффективными препаратами по схемам, обеспечивающим выработку высоких титров антитоксина, удалось значительно уменьшить число случаев дифтерии.

**Штаммы – *Corynebacterium diphtheriae*.** Для получения дифтерийного токсина применяют штамм Parke-Williams 8 (Парк-Вильямс-8 (PW-8)), выделенный в 1894 году. В процессе многолетнего сохранения штамма PW-8 на искусственных питательных средах путем селекции и адаптации его к более

совершенным питательным средам и иным условиям культивирования получен ряд вариантов: Торонто, Вейсензее, Дессау, Массачусетс. Эти варианты отличаются друг от друга по способности синтезировать активный токсин в зависимости от состава питательной среды и условий культивирования в среде пептического переваривания, казеиновой среде (Торонто), мясных средах триптического переваривания (Массачусетс). В Украине для производства дифтерийного анатоксина используется вариант Массачусетс. По мнению ВОЗ, данный штамм вполне подходит для производства иммуногенных дифтерийных вакцин и, по-видимому, нет оснований менять его на другой штамм. Подход к производству дифтерийной вакцины заключается в получении как можно больших количеств токсина во время фазы роста микроорганизмов и последующим превращением токсина в стабильный анатоксин с помощью наиболее эффективного метода.

Дифтерийный микроб штамма PW-8 характеризуется следующими особенностями. Морфология: тонкие, прямые, иногда слегка изогнутые, с несколько закругленными краями палочки. Длина их колеблется от 2 до 5 мкм, толщина – от 0,3 до 0,6 мкм. Палочки неподвижны, жгутиков и капсул не имеют, спор не образуют. Хорошо окрашиваются анилиновыми красителями. Особенно интенсивно окрашиваются метакроматические образования (зерна волютина), которые располагаются по всей длине палочки. Микроб является аэробом, оптимальная температура культивирования 32–34 °С, рН 7,4–8,0. В процессе культивирования штамм, в зависимости от условий роста, может диссоциировать на R- и S-формы. Функция токсинообразования присуща только R-форме, в связи с чем для получения высокоактивных токсинов необходимо поддерживать штамм в R-форме. По характеру роста R- и S-формы имеют существенные различия. На жидких питательных средах S-формы образуют грубую пленку, вызывают легкое помутнение среды, продуцируют токсин слабой активности. R-форма образует нежную хрупкую пленку на поверхности среды без изменения её физических свойств. Активность токсина высокая. На агаровых средах S-форма образует колонии средней величины, правильно округлой формы с ровными краями, гладкой блестящей поверхностью. R-форма на агаровых средах образует мелкие колонии, края резко изрезаны, центр выпуклый, видна радиальная исчерченность (цветок маргаритки). Для сохранения биологической активности штамма целесообразно периодически проводить селекцию с выделением отдельных колоний R-формы

с адаптацией их к составу питательной среды и условиям культивирования. Хранение штаммов в процессе производства осуществляют на средах при температуре от 4 до 10 °С.

Штаммы, используемые для приготовления дифтерийного анатоксина, необходимо идентифицировать на основании документа, в котором содержатся сведения об их происхождении и результатах всех тестов, периодически проводимых для подтверждения свойственных им характеристик. Штаммы следует хранить в виде лиофилизированных культур. Производство дифтерийного токсина должно быть основано на системе посевных серий. Культуры рабочих посевных серий должны обладать теми же характеристиками, что и штамм, из которого получена исходная посевная серия.

Как правило, промышленная ферментация и очистка продукта – процессы многоступенчатые и начинаются обычно с приготовления и стерилизации культуральной среды и оборудования. Выращивание как дифтерийной, так и столбнячной культуры проводят в реакторе (ферментере) периодического действия – выращивание в стерильных условиях без добавления в ходе ферментации свежей культуральной среды.

*Питательная среда* является тем необходимым субстратом, от которого во многом зависит производство анатоксинов: продуцирование культурой токсина, возможность высокой очистки от балластных компонентов. Составу питательных сред и технологии их изготовления посвящены многие исследования, результаты которых изложены в многочисленной специальной литературе.

Очень важно добиться того, чтобы готовый продукт не содержал веществ, которые могут вызывать токсические или аллергические реакции у человека. Если среды готовят из продуктов гидролиза белков, например, из гидролизата казеина или гидролизованной мышечной ткани, необходимо принять меры, обеспечивающие достаточную эффективность процесса гидролиза. Нельзя превышать пределы, если они установлены, содержания в готовой продукции белков млекопитающих и группоспецифических факторов крови человека. К питательным средам, используемым для получения вакцин, должны предъявляться следующие требования:

- сбалансированное количество органических веществ, так как их недостаток снижает продуцирование токсина в культуральную жидкость, а избыток органических соединений значительно затрудняет процесс отделения биомассы и усложняет переход токсина в анатоксин;

- отсутствие в составе питательной среды нерасщепленных белковых молекул, так как их присутствие затрудняет процессы очистки и детоксикации;

- учитывая длительный рост бактерий для накопления токсина и изменение рН среды в процессе культивирования, в составе среды должны быть буферные смеси, поддерживающие рН на необходимом уровне;

- состав среды должен обеспечивать максимальное накопление токсина без значительного накопления биомассы, что, в свою очередь, упрощает процессы очистки и детоксикации;

- питательные вещества должны быть установлены в строго определенных соотношениях, так как избыточная концентрация питательного вещества может ингибировать рост клеток. Если клетки растут слишком интенсивно, то накапливающиеся конечные продукты метаболизма могут нарушать нормальные биохимические процессы в клетках, а это, в свою очередь, может снижать синтез токсина. Кроме того, при недостаточности питательных веществ, например, азотистых соединений, дифтерийная культура начинает проявлять «агрессивность» и интенсивней продуцировать токсин.

За годы производства дифтерийного токсина было предложено большое количество питательных сред, отличающихся по составу и технологии получения. Их разнообразие связано со свойствами используемой культуры, технологией получения токсина и методами его очистки. Одной из наиболее часто используемых питательных сред является *среда Лингуда*.

*Методика изготовления среды заключается в следующем:* измельченную говяжью ткань помещают в холодную воду, нагревают до температуры 90 °С, с последующим охлаждением до 48–50 °С и устанавливают рН 8,0–8,2 при помощи едкого натра. В полученную смесь добавляют эмульсию свиной поджелудочной железы и при указанной температуре и рН проводят гидролиз до прекращения нарастания аминного азота (120–130 мг). Процесс триптического гидролиза прекращается добавлением ледяной уксусной кислоты (1–2 %) и кипячением смеси. Гидролизат фильтруют, устанавливают рН 8,0–8,2 и добавляют пекарские дрожжи для проведения сбраживания сахаров при 80 °С в течение 1 часа. В среду добавляют натрий молочнокислый. Среду фильтруют и стерилизуют при 112 °С в течение 30 минут. Для сохранения

ростовых свойств питательной среды можно использовать метод мембранной фильтрации через фильтры с размером пор не более 0,22 мкм.

Концентрация пептона в среде составляет 1,2–1,3 %, аминного азота 120–130 мг, что позволяет обеспечить бактерии дифтерии источником азота, который необходим культуре микроорганизмов для жизнедеятельности. В состав среды в качестве источника углеводов вводится стерильный раствор мальтозы, которая используется микроорганизмами как источник энергии.

Культивирование дифтерийной культуры можно проводить и *на синтетической среде Мюллера*, содержащей аминокислоты (глицин, валин, цистин, метионин и др.), минеральные соли (магний сернокислый, фосфорнокислый калий, натрий хлористый, медь сернокислая и др.), сахара (мальтоза, глюкоза и др.). Содержание LF в токсине, полученном на среде Мюллера, уступает их содержанию в токсине, полученном на среде Лингуда на 20–30 %.

Хорошие результаты токсинообразования получены на *полусинтетической среде*, содержащей кислотный гидролизат казеина (35 г/л). Накопленный опыт дает основание говорить о влиянии ионов железа в составе питательной среды на токсинообразование. Высокий выход токсина наблюдается при содержании ионов железа в пределах 0,05–0,4 мкг в литре.

Оптимальность состава питательной среды для культивирования вакцинных штаммов бактерий необходимо оценивать не по показателю максимального сбора биомассы, а по величине накопления культурой протективных антигенов: для дифтерии и столбняка – накопление токсинов; для гемофильной В инфекции – полисахаридов и т.д.

**Получение дифтерийного токсина.** Изучение процесса токсинообразования в зависимости от соотношения питательной среды и её объема показало, что при одном и том же объеме среды с увеличением её поверхности повышается активность процесса роста и интенсивность токсинообразования дифтерийного микроба. Аэрирование и перемешивание питательной среды активизирует токсинообразование дифтерийной культуры. Усиленная аэрация увеличивает энергетическую способность микроорганизмов, а непрерывное перемешивание среды обеспечивает распределение питательных веществ и удаление с поверхности клеток бактерий продуктов обмена. Постоянный приток к микробным клеткам новых питательных веществ ускоряет течение

биологических процессов по сравнению с условиями роста микробов в стационарных условиях. При выращивании бактерий в условиях непрерывного перемешивания и аэрации они проходят шесть фаз развития (см. рис. 2).

1. *Лag-фаза* или индукционный период, начинается после инокуляции в питательную среду и является периодом адаптации к новым условиям (состав питательной среды, температура, рН и т.д.); продолжительность лаг-фазы зависит от времени, в течение которого клетки посевного материала находились в стационарной фазе и от того, как сильно различалась среда, в которой росла культура, и новая, свежая культуральная среда. Это диктует необходимость для сокращения лаг-фазы использовать одну серию питательной среды для получения каждой партии токсина.

2. *Фаза логарифмическая* (лог-фаза) или экспоненциального роста – период быстрого накопления и продуктов метаболизма.

3. *Фаза ускорения* (линейного роста).

4. *Фаза замедления*.

5. *Фаза стационарная* или линейного роста, характеризующаяся сбалансированностью роста в установленном состоянии, то есть скорость роста остается постоянной на протяжении всего процесса культивирования, а химический состав культуральной жидкости изменяется, поскольку потребляются питательные вещества и вырабатываются продукты метаболизма, в том числе и дифтерийный токсин. Причем в этот период количество микроорганизмов увеличивается незначительно, в то время как происходит основной прирост бактериальных токсинов; фаза замедления роста – снижение скорости роста культуры и токсинообразования.

6. *Фаза отмирания*, в которой энергетические запасы клеток оказываются исчерпанными и метаболизм прекращается.

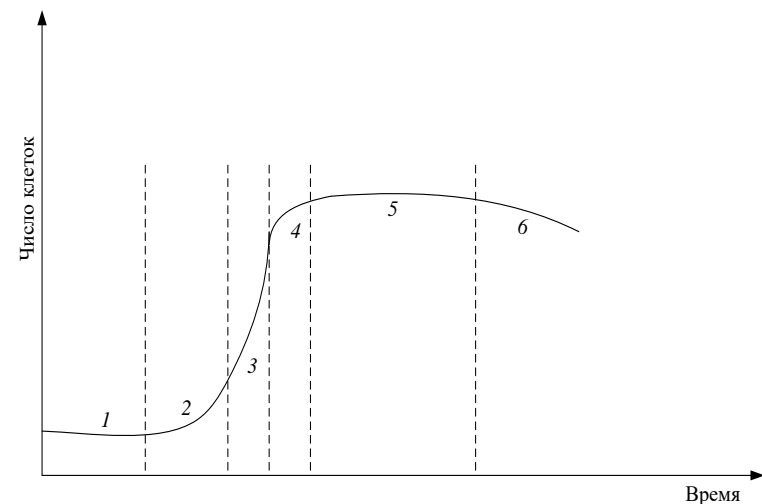


Рисунок 2 – Фазы роста микроорганизмов в закрытых системах: 1 – лаг-фаза (фаза приспособления или фаза отсутствия роста); 2 – лог-фаза; 3 – фаза линейного роста; 4 – фаза замедления роста; 5 – стационарная фаза; 6 – фаза отмирания культуры

Основное отличие размножения бактерий при перемешивании и аэрации от размножения в стационарных условиях заключается в отсутствии начальной стационарной фазы и в продолжительности фазы замедления размножения. Бактерии в условиях аэрации сразу начинают интенсивно размножаться:

- 1 генерация – 34–36 °С в течение 24 часов;
- 2 генерация – 34–36 °С при перемешивании в течение 24 часов;
- 3 генерация – 34–36 °С при перемешивании в течение 48 часов.

При проведении культивирования во всех трех генерациях используется 0,3–0,6 % раствор мальтозы.

Соотношение между объемами 1, 2 и 3 генераций (у разных производителей) колеблется в диапазоне 1 : (28–30) : (25–30).

Культуры инокулята должны обладать специфической морфологией. Необходимо отметить, что на длительность лаг-фазы большое влияние оказывает фаза роста, в которой находится инокулят, полученный, в свою оче-

редь, путем культивирования клеток в небольшом объеме. Для продукции токсина в наших интересах свести к минимуму лаг-фазу. Для этого необходимо соблюдать следующие условия:

- культура инокулята должна обладать максимальной активностью, а в момент введения в среду большого объема инокулят должен находиться в фазе экспоненциального роста;

- среда, в которой выращивается инокулят, должна по своему составу быть идентичной с составом среды для производственного процесса, находящейся в биореакторе;

- инокулят должен составлять 5–10 % от объема среды в производственном биореакторе.

Ферментер оборудован устройствами для измерения и регулирования температуры, количества продуваемого воздуха, давления внутри ферментера, pH среды, концентрации растворенного кислорода в культуральной жидкости. В ферментере присутствуют приспособления для механического или химического пеногашения, а также сигнализатор уровня пены. Кроме этого, биореактор обязательно должен быть снабжен специальными опциями для подачи питательной среды и углеводов, введения инокулята, подачи воздуха и пробоотборника.

Большую опасность представляет загрязнение реактора грибами или бактериями. Поэтому биореакторы конструируют таким образом, чтобы их можно было стерилизовать. Обычно используют пар под давлением. Внутри реактора не должно быть «застойных зон», недоступных для пара во время стерилизации. Обработке подлежат все клапаны, датчики, входные и выходные отверстия. Реакторы подвергают стерилизации либо в автоклаве, либо через рубашку при режиме: 2 часа при давлении 0,2 атм ( $132 \pm 1$ ) °C.

В реактор помещают среду. Необходимо тщательно контролировать температуру выращивания микроорганизмов. При снижении оптимальной температуры рост бактерий значительно замедляется, а повышение температуры активирует клеточные протеиназы и снижает выход токсина.

Процесс культивирования проводят при температуре 34–36 °C. в течение 36–50 часов. В зависимости от состава питательной среды и состояния культуры может меняться время культивирования. Так, например, при использовании казеинового кислотного гидролизата по Мюллеру выращивание проводят при 34 °C в течение 48–60 часов с добавлением мальтозы. Важным

является вопрос о концентрации водородных ионов (pH). Значение pH культуры микроорганизмов оказывает большое влияние на конечные продукты аэробного превращения источников углерода и энергии. pH среды благодаря своему действию на диссоциацию соединений, обладающих кислотными и основными свойствами, может оказать влияние на ингибирование синтеза этих соединений или изменить их токсические свойства, антигенный состав культур и их морфологию. Учитывая, что для роста коринебактерий используются органические аминосоединения, pH увеличивается за счет деаминирования этих соединений. При этом снижается активность выработки дифтерийного токсина. В случае повышения pH свыше 8,2 после 20–24 часов роста добавляют 40 %-ый раствор стерильной глюкозы. Установлено, что увеличение окислительно-восстановительного потенциала (RH 2) приводит к интенсивному накоплению дифтерийного токсина.

Серьезной помехой при культивировании микроорганизмов является образование пены в процессе биосинтеза при глубинном культивировании, что связано с увеличением содержания в питательных средах питательных субстратов, продуктов метаболизма и поверхностно-активных веществ. В случае получения дифтерийного токсина этот эффект усиливается за счет введения газовой фазы – подачи воздуха. Интенсивное пенообразование затрудняет максимальное использование емкости биореактора, так как способствует выбросу пены и потери целевого продукта. Кроме того, выброс пены зачастую приводит к нестерильности продукта. Для пеногашения в настоящее время используют различные методы: механические (разрушение пены за счет ударного воздействия твердых поверхностей, воздействие струями жидкости или газа, резкое изменение давления и др.); химические (добавление поверхностно-активных веществ, уменьшающих прочность пленок, добавление веществ, связывающих пенообразователи в поверхностно-неактивные комплексы); физические методы (электрическое пеногашение, воздействие колебаний звуковой или ультразвуковой частоты и др.); стабилизация уровня пены путем временного уменьшения подачи воздуха или временного прекращения механического перемешивания, вывода избыточной пены из биореактора. Наиболее эффективными являются химические и механические способы пеногашения или их комбинации. Использование для пеногашения при производстве дифтерийного токсина растительных масел, которые уменьшают прочность пленки, дает достаточно высокие результаты токсинообразования и значительно снижает объем пены. Причем необходимо отме-



тить отсутствие влияния данного пеногасителя на микроорганизмы и возможность удаления в процессе фильтрации.

Контроль процесса токсинообразования осуществляют путем определения следующих показателей: количество флоккулирующих единиц (Lf/мл), морфология культуры, концентрация микробных клеток, pH и бактериологическая чистота, величина минимальной смертельной дозы (dlm/мл). В результате контроля токсинообразования должно быть не менее 130–150 Lf/мл и не менее 10000 dlm/мл.

Подходящим методом определения концентрации антигена является реакция флоккуляции. Её следует выполнять с эталонным материалом, откалиброванным по отношению к Международному эталонному стандарту дифтерийного анатоксина для реакции флоккуляции.

Реакцию флоккуляции проводят следующим образом. Стандартную противодифтерийную сыворотку разводят 0,9 %-ым раствором натрия хлористого до конечной концентрации 100 МЕ/мл. Затем готовят разведения токсина (анатоксина) согласно табл. 4.

Таблица 4 – Разведения токсина (анатоксина)

№ пробирки	Кол-во стандартной сыворотки, мл	0,9 %-ый раствор NaCl, мл	Разведенный токсин, мл
1	0,3	0,7	1,0
2	0,4	0,6	1,0
3	0,5	0,5	1,0
4	0,6	0,4	1,0
5	0,7	0,3	1,0

Определяют первоначальную пробирку (инициальная), в которой наблюдается процесс флоккуляции и производят расчет единиц флоккуляции (LF):

$$LF = \frac{CC \times V_{\text{сыв.}}}{V_{\text{об. т.}}} \times PT,$$

где CC – стандартная сыворотка, МЕ/мл (антитоксин);

$V_{\text{сыв.}}$  – объем сыворотки в инициальной пробирке, мл;

$V_{\text{об. т.}}$  – объем образца токсина, мл;

PT – разведение токсина.

Образцы культур, использованных для получения разовых сборов анатоксина, необходимо испытывать на чистоту с помощью микроскопического изучения окрашенных мазков или путем посева на соответствующие культуральные среды. Разовые сборы нельзя использовать для получения объединенного материала, если на какой-либо стадии их приготовления произошла контаминация.

После завершения процесса культивирования микробную взвесь подвергают ультрацентрифугированию для отделения биомассы на сепараторах типа Вестфалия или суперцентрифугах со скоростью до 15000 об/мин. При этом должны быть приняты соответствующие меры предосторожности, предотвращающие образование потенциально опасных аэрозолей. Для отделения клеток из больших объёмов культуральной среды часто используют высокоскоростные центрифуги. Суспензию клеток непрерывно подают в барабан (ротор) работающей центрифуги, клетки микроорганизмов концентрируются в нем, а осветленная среда, содержащая токсин, удаляется. Недостатком этого метода является периодическая остановка центрифуги или сепаратора для очистки барабана (ротора) от биомассы, высокая стоимость оборудования, вероятность попадания микроорганизмов в раствор токсина.

Полученный прозрачный раствор токсина направляют на стерилизующую фильтрацию через фильтры с размером пор не более 0,22 мкм, например, фильтры типа «Millipore».

В последние годы предложено пропускать клеточную суспензию с высокой скоростью параллельно поверхности ультрафильтрационной мембраны так, что через мембрану за один цикл проходит только небольшая часть циркулирующей жидкости. Остальная её часть очищает мембрану от накопившихся клеток, в результате чего скорость фильтрации падает не так быстро, как при необратимом забивании фильтра. После многочисленных циклов фильтрации через мембрану проходит почти вся культуральная жидкость. Данный принцип удобен еще и тем, что существует возможность одновременного проведения и стерилизующей фильтрации. Возможен вариант ультрафильтрации на специальных керамических модулях, при которой через

керамические фильтры с установленным порогом отсека проходит токсин, а биомасса концентрируется в реакторе. Преимуществом такой фильтрации является отсутствие аэрозолей, относительно низкая цена оборудования, стандартизация процесса. Кроме того, два действия заменяются одним, т.к. такая фильтрация дает стерильный продукт, который поступает в реактор-детоксикатор. Балластные белки в процессе дальнейшей детоксикации за счет обработки формальдегидом претерпевают те же изменения, как и специфический белок токсина, и при осаждении выпадают в осадок при тех же значениях pH. Для уменьшения объема токсина, снижения количества балластных белковых компонентов, удаления остаточных продуктов питательных сред и др. проводится ультрафильтрация через аппараты с различным порогом отсека от 10 до 50 кДа. Различные производители определяют условия в зависимости от состава питательной среды, штамма продуцента, дальнейшего метода детоксикации и очистки.

**Детоксикация и очистка дифтерийного токсина.** В основе процесса обезвреживания дифтерийного токсина заложен принцип необратимого изменения участка его белковой молекулы, ответственного за проявление токсичности, при полном сохранении антигенной активности. *Метод детоксикации дифтерийного токсина формальдегидом* при температуре 37 °С был предложен Рамоном в 1924 году. При изучении механизма анатоксинообразования было установлено, что процесс перехода токсина в анатоксин проходит в два этапа.

*Первый этап* связан с реакцией между формальдегидом и NH<sub>2</sub>-группами белка. При этой реакции образуется метилоаминная группа. На этом этапе детоксикация дифтерийного токсина протекает очень быстро: уже в течение первых-вторых суток наблюдается снижение токсичности на 95 %. Однако такое обезвреживание обратимо, и если из препарата удалить избыток формалина, токсичность восстанавливается (реверсия).

*На втором этапе* происходят внутримолекулярные реакции: метилоаминные группы взаимодействуют с некоторыми активными радикалами аминокислот (амидные, индольные, фенольные и другие группы), что приво-

дит к созданию стабильных метиленовых мостиков. Стабильного обезвреживания можно добиться только после второго этапа формальдегидной детоксикации – образования метиленовых групп. Второй этап необратим. Он протекает достаточно медленно (20–40 суток) при температуре 39–40 °С в зоне нейтральных или слабо щелочных pH и завершается образованием дифтерийного анатоксина. Хотелось бы отметить, что условия детоксикации токсинов специфичны для каждого вида препарата. Так, можно привести данные о детоксикации токсина C1 Septicum: концентрация формалина 0,75 %; pH 6,9–7,1; температура 20–22 °С; время 10–14 суток. Вопросами детоксикации дифтерийного токсина занимаются более 70 лет, и несмотря на это, до сих пор не определен точный механизм этого процесса.

Обезвреживание дифтерийного токсина осуществляется в реакторе-детоксикаторе из нержавеющей стали, с рубашкой для водяного обогрева или охлаждения, снабженного мешалкой (60–80 об/мин). При постоянном перемешивании добавляют раствор 40 % формалина до конечной концентрации формальдегида 0,4–0,6 % и инкубируют при температуре 39–40 °С в течение 5 суток. По истечении указанного срока препарат охлаждают до температуры 2–8 °С непосредственно в реакторе-детоксикаторе и проводят процесс осаждения токсина и его очистки.

Очистка дифтерийного токсина от балластных веществ позволяет снизить реактогенность препарата, повысить его иммуногенность за счет лучшей сорбции на минеральных гелях.

При постоянном перемешивании к токсину прибавляют 10 % стерильный раствор гексаметофосфата натрия (соль Грехема) до конечной концентрации 0,25 %. При постоянном перемешивании к раствору частично обезвреженного токсина прибавляют 2N раствор трихлоруксусной кислоты до pH 3,8–4,0 (изоэлектрическая точка). Немаловажным является этап формирования осадка, который состоит из стадии зарождения и роста индивидуальных частиц, а также их последующую агрегацию, в результате которой образуются хлопья с размерами, обеспечивающими возможность их последующего отделения сепарированием. Смесь выдерживают в течение 40–60 минут

при температуре 4–10 °С. Полученную смесь подвергают сепарированию при 10–12 тыс. об/мин и температуре 4–10 °С. Осадок промывают водой для инъекций и растворяют в борно-боратном буферном растворе при рН 7,8–7,9 в отношении 1 : 15–1 : 20 к его первоначальному объёму. Продукт подвергают очистке от пигментных компонентов (порфириновые соединения) обработкой активированным углем в количестве 0,8–1,2 % и минеральными сорбентами, например, алюминия гидроокисью. Раствор подвергают стерилизующей фильтрации через фильтры с размером пор от 1,2 мкм до 0,22 мкм. К полученному раствору токсина добавляют 40 % раствор формалина до конечной концентрации 0,15–0,2 % формальдегида и инкубируют при температуре 39–40 °С не менее 15 суток. К этому сроку токсин полностью переходит в форму анатоксина. Возможна очистка полученного препарата путем ступенчатой ультрафильтрации раствора анатоксина через аппараты с порогом отсека от 50 до 300 кДа. При этом возможно удалить балластные примеси с меньшими и большими молекулярными массами по сравнению с дифтерийным анатоксином.

Мы рассмотрели один из вариантов получения дифтерийного анатоксина (токсоида), основанный на очистке частично обезвреженного токсина. В то же время ряд производителей используют и другую схему получения препарата – очистку на стадии дифтерийного токсина. Полученный стерильный раствор токсина подвергают концентрации путем обработки аммонием сернокислым до 40 % насыщения. Смесь выдерживают при температуре 4–8 °С в течение 1 часа и осадок балластных белков отделяют центрифугированием. К прозрачному раствору вновь прибавляют аммоний сернокислый до 60 % насыщения, выдерживают для формирования осадка при 4–8 °С и осадок отделяют центрифугированием. Полученный осадок растворяют в воде для инъекций. На этой стадии проводят определение Lf/мл и содержание белкового азота (мг/мл). Затем раствор подвергают колоночной ионообменной хроматографии на Q-Sepharose Fast Flow. Сорбированные фракции элюируют специальным буферным раствором. Процесс хроматографической очистки проводят дважды. Полученный раствор токсина концентрируют и очищают

ультрафильтрацией или диализом. Очищенный дифтерийный токсин контролируют на содержание Lf/мл, белкового азота (мг/мл) и эндотоксина. Раствор токсина подвергают детоксикации с помощью формалина. Для стабилизации токсина в раствор добавляют аминокислоты: лизин и N-ацетил-триптофан и процесс детоксикации продолжают в течение 18–21 дня при температуре 34–35 °С, причем формалин добавляют дробно, порциями в течение первых трех дней. При очистке полностью обезвреженного анатоксина используют метод спиртового фракционирования с последующей стабилизацией препарата аминокислотой – глицин.

**Контроль очищенного концентрированного дифтерийного анатоксина.** Это следующий этап изготовления. Полученный препарат контролируют в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения по следующим тестам:

1. *Стерильность* – проводят тест на бактериальную и грибковую стерильность в соответствии с требованиями ДФУ изд. 1/2.
2. *Специфическая токсичность* – проводят на 5-ти морских свинках массой 250–350 г.

Каждой свинке вводят подкожно 1 мл анатоксина того разведения, в котором содержится не менее 500 Lf анатоксина. Погибших животных нужно подвергнуть аутопсии с целью выявления симптомов дифтерийной интоксикации (например, красные надпочечники). Очищенный анатоксин считается успешно прошедшим испытание, если ни у одной морской свинки в течение 6 недель с момента введения не обнаружены симптомы специфической интоксикации и если к концу периода наблюдения в живых остается не менее 80 % животных. В Украине дополнительно проводят контроль на кроликах, путем введения внутрикожно 20 Lf анатоксина с последующим наблюдением за появлением специфической эритемы в местах введения. Кроме того, доза вводимого препарата в Украине составляет на морских свинках 1500 Lf, что в значительной степени гарантирует безвредность используемого препарата. При получении отрицательных результатов допускается проведение повторного процесса детоксикации с последующим контролем.

3. *Реверсия токсичности* – проводят с целью подтверждения невозможности реверсии токсичности в процессе хранения. Очищенный концентрированный анатоксин разводят до той его концентрации и концентрации химических веществ, какие приняты для готовой вакцины. Разведенный препарат хранят при температуре 34–37 °С и температуре 2–8 °С в течение 6 недель. Затем образцы препарата контролируют по тесту «специфическая токсичность».

4. *Чистота антигена* – проводят путем определения Lf/мл и белкового азота (мг/мл).

Очищенный анатоксин считается прошедшим испытание, если он содержит не менее 1500 Lf на 1 мг белкового азота.

5. *pH* – определение проводят потенциометрически. Норма pH от 6,0 до 7,3.

6. *Количество остаточного свободного инактивирующего агента* (формальдегида) определяют, например, калориметрическим методом при взаимодействии формальдегида со смесью фуксина и серной кислоты. Содержание формальдегида в анатоксине, разведенном до концентрации готового препарата, не должно превышать 0,2 г/л.

7. *Определение концентрации антигена.* Определение необходимо проводить реакцией флоккуляции (Lf/мл) с противодифтерийной флоккулирующей сывороткой.

8. *Определение белкового азота.* Содержание белкового азота определяют по методу Кьельдаля или по методу Несслера.

9. *Определение эндотоксинов* LAL-тестом или тестом на пирогенность.

10. *Определение фракционного состава анатоксина* методом электрофоретического разделения в полиакриламидном геле с додецил-сульфатом натрия.

Процесс изготовления дифтерийного анатоксина приведен на рис. 3. Во время проведения контроля препарат хранится при температуре 2–8 °С.

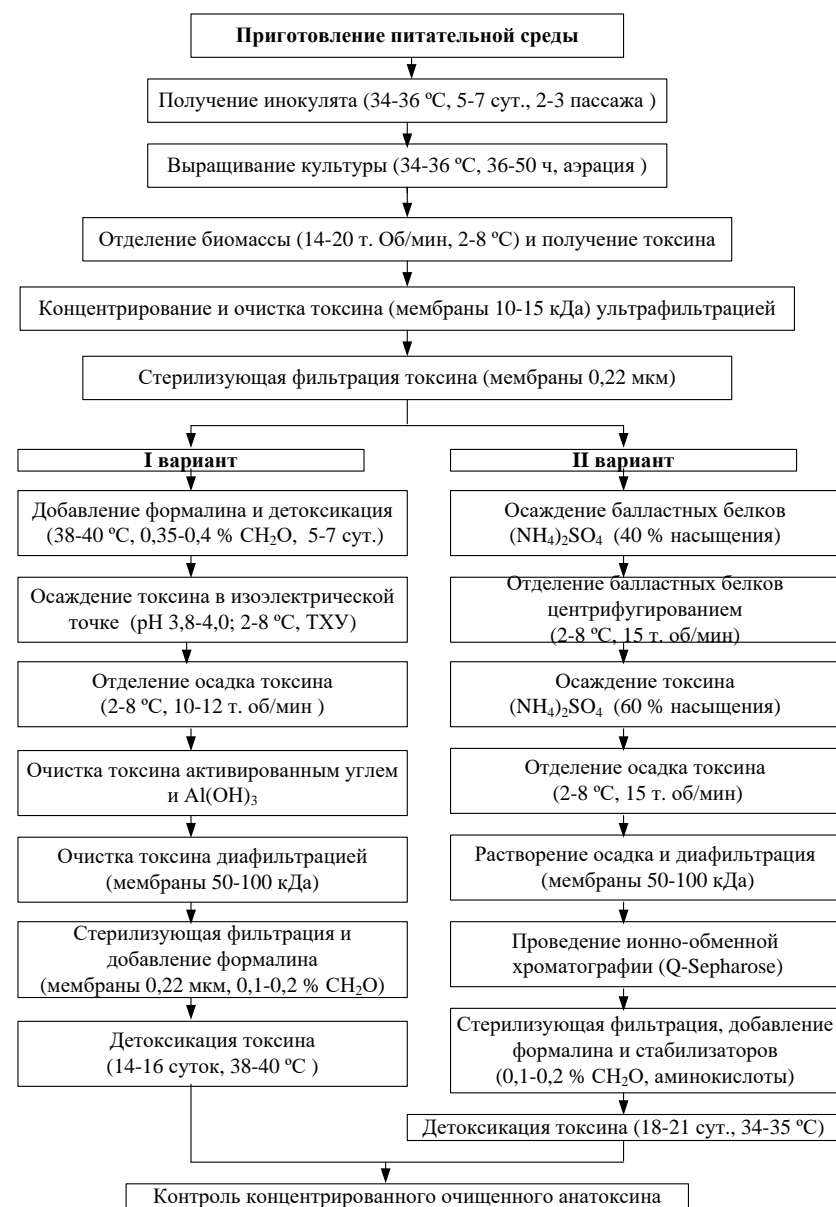


Рисунок 3 – Схема получения дифтерийного анатоксина

#### 1.4.2. Столбняк

Столбнячный токсин (*Clostridium tetani* toxin) представляет собой белок, непрочно связанный со стромой бактериальной клетки. Процесс образования токсина (тетаноспазмина) в культуре находится в прямой зависимости от наличия в питательной среде гистидинсодержащих пептидов. Предполагают, что эти пептиды индуцируют у столбнячных палочек синтез особой протеазы (пептидазы), принимающей участие или в активации тетаноспазмина, или же в его отщеплении от субклеточных мембранных структур. Молекулярная масса тетаноспазмина находится в пределах 141–160 кДа. Токсический белок термолабилен и после 20–25 минут прогрева при 60–62 °С теряет активность. Токсин состоит из двух субъединиц с молекулярными массами 53 и 107 кДа. При диссоциации оба фрагмента лишены токсических свойств. В культуральной жидкости обнаруживается помимо тетаноспазмина еще один компонент – тетанолизин с молекулярной массой около 60 кДа. Тетанолизин выделяется из клеток по типу экзотоксина с первых дней развития популяции через неповрежденные структуры клетки, по-видимому, посредством активного переноса. Тетаноспазмин через клеточные стенки не проходит и выделяется в культуральную жидкость лишь при распаде микробных клеток, главным образом, в фазе ускоренной гибели популяции.

**Штаммы *Clostridium tetani*.** Возбудитель столбняка относится к группе анаэробов и представляет собой грамположительную палочку длиной 4–8 мкм и толщиной 0,3–0,8 мкм, располагающуюся в одиночку или цепочкой. Она хорошо растет на средах, предназначенных для анаэробов. На среде типа Китт-Тароцци рост столбнячных бацилл проявляется в виде помутнения среды и сопровождается выделением осадка и газа. На полужидком агар-агаре столбиком при росте столбнячной палочки можно наблюдать появление плотных чечевицеобразных колоний (R-формы) и колоний, напоминающих пушинку (S-формы). S-форма обладает более выраженными токсигенными свойствами. Между спорообразованием и токсинообразованием существует определенная связь. Высокотоксигенные штаммы имеют слабо выраженную способность к спорообразованию, и наоборот. Столбнячная палочка вырабатывает несколько токсических и ферментных веществ, имеющих значение в патогенезе заболевания: тетаноспазмин, гемолизин и ферменты фибринолизин и протеазы. Тетаноспазмин вызывает типичную клиническую

картину столбняка; гемолизин обладает кардиотоксическим и гемолитическим действием. Ферменты столбнячной палочки расщепляют высокомолекулярные соединения тканей микроорганизма и способствуют быстрейшему проникновению и распространению тетаноспазмина. В Украине, России, Германии при производстве столбнячного токсина используют штамм Колле 154, № 471 и 473, в других странах используется штамм Гарвард. В литературе имеются указания на влияние возраста посевного материала. Отмечено преимущество старых культур от 2 месяцев до 3 лет. Рабочие штаммы хранят на питательных средах при 4–8 °С. Хранение архивных штаммов осуществляется в лиофилизированном состоянии. Штаммы, используемые для производства вакцин, должны быть идентифицированы на основании документа, в котором содержатся сведения об их происхождении, характеристиках в момент выделения, а также подробные данные о результатах всех тестов, регулярно проводимых для подтверждения свойственных этим штаммам характеристик.

**Питательные среды.** Для получения столбнячного токсина используется ряд питательных сред, подробно описанных в литературе. Выбор питательной среды во многом зависит от используемого штамма бактерий, методов культивирования, очистки и детоксикации. На территории СНГ для культивирования используется *казеиново-растительная среда*, так как в этих странах используется один штамм столбнячной культуры и достаточно близкие технологические схемы получения препаратов. Казеин (гликопротеин молока) является приемлемым источником питания столбнячной культуры. При проведении кислотного гидролиза казеина в гидролизате обнаруживаются аминокислоты, необходимые для роста культуры *Cl. Tetani* и образования столбнячного.

**Методика изготовления среды заключается в следующем:** готовят смесь казеина (содержание жира не более 2 %), очищенной воды, концентрированной хлористоводородной кислоты в соотношении 1 : 15 : 0,5. Гидролиз проводят при температуре 127 °С в течение 2 часов. Нерасщепленный в процессе гидролиза белок осаждают в изоэлектрической точке. Полученный гидролизат разводят водой до конечного содержания пептона около 3,0 % и обрабатывают активированным углем для осветления (из расчета 2 кг угля на 100 литров гидролизата). Смесь кипятят в течение 10–15 минут, а затем уголь

отделяют фильтрацией. Осветленный гидролизат содержит 450–470 мг % общего азота, 220–240 мг % аминного азота, 2,6–3,0 % пептона.

При производстве столбнячного токсина качество полученного кислотного гидролизата в значительной степени определяет как токсинообразование, так и процесс дальнейшей очистки. Необходимо учитывать, что кислотный гидролиз белкового сырья происходит не только на стадии собственно выдерживания реакционной смеси при заданной температуре, но и во время доведения её до данной температуры, а также при охлаждении полученного гидролизата до температуры, указанной в технологии. Так, при гидролизе казеина 80 % продуктов гидролиза накапливается на стадии нагревания. Причем вклад стадий нагревания и охлаждения в данный процесс возрастает с увеличением вместимости аппарата, что, естественно, требует проведения валидации процесса при масштабировании.

Для приготовления аутолизата отрубей используют пшеничные отруби крупного помола (влажность – 11–13 %, крахмала – 23–30 %), которые помещают в очищенную воду в соотношении 1:6, прибавляют 1 % хлороформа и для проведения аутолиза помещают при 45 °С на 15 часов при периодическом помешивании. К 100 литрам казеинового гидролизата прибавляют 25 литров аутолизата. Смесь разводят водой до аминного азота – 130–150 мг %, доводят до кипения, прибавляют 0,05 % двухзамещенного фосфата натрия и 0,05 % однозамещенного фосфата калия, устанавливают рН 7,4–7,6 и кипятят еще 10 минут. В среду добавляют витамины (пиридоксин гидрохлорид, рибофлавин, тиамин, фолиевую кислоту, никотиновую кислоту). Среду фильтруют и стерилизуют при 110–112 °С в течение 30 минут. Для сохранения ростовых свойств питательной среды можно использовать метод мембранной фильтрации.

Концентрация пептона в среде составляет 1,5–1,7 %, аминного азота 130–150 мг %, что позволяет обеспечить бактерии столбняка источником азота, который необходим культуре микроорганизмов для жизнедеятельности. В состав среды в качестве источника углерода вводится 0,5 % глюкозы (раствор вводится в среду стерильным), которая используется микроорганизмами как источник энергии. Продукты аутолизата отрубей и витамины используются как факторы роста, которые необходимы микроорганизмам в малых дозах для синтеза биологически активных веществ, регулирующих внутриклеточный метаболизм. Источником фосфорного питания являются добав-

ляемые в среду фосфаты калия и натрия. Неорганические соли служат не только источником ионов, необходимых для нормального функционирования клеток *Cl. Tetani*, но и выполняют буферную функцию, нивелируя большие изменения рН в процессе роста микроорганизмов.

Рядом производителей используются синтетические среды, например, среда Мюллера в модификации Миллера с добавлением экстракта ткани бычьего сердца и казаминовой кислоты. Добавление в среду белков ткани животных приводит к трудностям в процессе очистки и детоксикации токсина. Последнее время проводятся работы по получению питательных сред с использованием панкреатических гидролизатов соевых белков, причем важную роль в токсинообразовании играет соотношение ароматических аминокислот и пролина.

**Получение столбнячного токсина.** Первоначально получают маточные культуры двух-трех генераций на питательной среде, используемой для производственного посева, либо первую генерацию проводят на среде для выращивания анаэробных микроорганизмов.

Для производственного процесса используют реакторы объемом от 500 до 2000 литров питательной среды. Реактор представляет собой емкость из нержавеющей стали, имеет рубашечное пространство для подачи пара. Чем больше объем питательной среды в реакторе, тем выше выход при получении нативного токсина. Последнее, очевидно, связано со специфическими особенностями течения процесса токсинообразования в больших емкостях, где наблюдается интенсивное нарастание микробной массы (высокий столб среды – анаэробные условия), антигенных и токсигенных свойств токсина, сопровождающееся более выраженной перестройкой азотистого состава среды. Так, количество белкового азота и высокомолекулярных пептидов снижается, а содержание аминного азота возрастает. Кроме того, при токсинообразовании отмечено более энергичное потребление аспаргиновой, глутаминовой кислот и гистидина.

Реактор стерилизуют при 132 °С в течение 2 часов. Затем загружают питательную среду на 65–70 % объема и стерилизуют при 112 °С в течение 40 минут. После окончания стерилизации питательную среду охлаждают до 40–45 °С и через пробоботборник берут пробу для контроля стерильности. Затем в асептических условиях в реактор вводят 5–10 % инокулята маточной культуры. Выращивание можно проводить как при обычных условиях, так и

при барботаже стерильным азотом или инертным газом. Имеются данные о положительном влиянии периодического перемешивания при 50 об/мин на токсинообразование культуры столбняка. Активность токсина при этом значительно повышается (азотная подушка сверху). Выращивание проводят при температуре 34–35 °С в течение 5–7 суток. К 3–4 дню культивирования газообразование значительно снижается. Каждый производитель определяет для себя срок выращивания, зависящий как от токсигенности используемого штамма, так и от полноценности питательной среды, а также условий культивирования. При длительном выращивании нарастает количество биомассы и затрудняется очистка конечного продукта, а содержание токсина уже практически не увеличивается и даже наоборот – токсин гидролизуетса собственными протеазами. По окончании культивирования производят выемку содержимого реактора для проверки чистоты культуры. Суспензию столбнячной культуры подают на суперцентрифуги или сепараторы со скоростью вращения не менее 12–15 т. об/мин. Полученную культуральную жидкость фильтруют через многорамные фильтры с установленными на них глубинными фильтрами с размером пор от 2 мкм до 0,22 мкм. Фильтрацию проводят последовательно на двух видах глубинных фильтров: осветляющих (1–2 мкм и 0,5 мкм) и стерилизующих с размером пор 0,22 мкм. Профильтрованный токсин поступает в реактор-детоксикатор. На этом этапе возможно проведение ультрафильтрации токсина на мембранах с порогом отсека 50 кДа с целью удаления низкомолекулярных примесей токсина, остатков питательной среды и концентрации. Предложено также пропускать клеточную суспензию Cl. Tetani с высокой скоростью параллельно поверхности мембраны так, что через мембрану за один цикл проходит только небольшая часть циркулирующей жидкости. Остальная её часть очищает мембрану от накопившихся клеток, в результате чего скорость фильтрации падает не так быстро, как при необратимом забивании фильтра. После многочисленных циклов фильтрации через мембрану проходит почти вся культуральная жидкость. Данный принцип удобен еще и тем, что существует возможность одновременного проведения стерилизующей фильтрации. Данный метод мы обсуждали при описании производства дифтерийного токсина. Учитывая большие объемы культуральной жидкости, получаемые при производстве столбнячного токсина, этот метод является еще более перспективным. Возможен вариант ультрафильтрации на специальных керамических модулях,

при которой через керамические фильтры с величиной пор 0,2–0,3 мкм проходит токсин, а биомасса концентрируется в реакторе. *Преимуществом такой фильтрации*, по сравнению с сепарированием или ультрацентрифугированием, является отсутствие аэрозолей, относительно низкая цена оборудования, стандартизация процесса, два действия заменяются одним, так как такая фильтрация дает стерильный продукт, который непосредственно поступает в реактор-детоксикатор. Принимая во внимание, что столбнячный токсин очень нестоек и быстро разрушается под влиянием воздуха, света, температуры и различных химических факторов, важно подобрать такие условия обезвреживания, которые позволили бы получить безвредный препарат, максимально сохранивший антигенную активность. По данным литературы, токсин, содержащий не менее 500000 dlm/мл, наиболее пригоден для дальнейшей детоксикации и очистки.

**Детоксикация и очистка столбнячного токсина.** Детоксикация столбнячного токсина, как и в случае с токсином дифтерийным, протекает в две стадии. В течение первой стадии, быстрой и обратимой, происходит взаимодействие свободных аминокрупп (в первую очередь лизина) с формальдегидом, при этом образуются метилоаминные группы. На втором этапе в реакции участвуют активные радикалы циклических аминокислот, содержащие фенольные, амидозольные, индольные и гуанидиновые группы (тирозин, аргинин, гистидин, триптофан). Эти группы, сочетаясь за счет активных атомов водорода с метилоаминными группами, прочно соединяются с остатками лизина через метиленовые мостики. Наибольшее значение имеет соединение через формальдегид свободных аминокрупп лизина с СН–группами тирозина и гистидина, которые характеризуются большой стойкостью. Блокирование формалином активных радикалов токсина приводит к его обезвреживанию.

При обезвреживании нативных столбнячных токсинов полимеров не образуется, однако имеет место частичная конденсация с низкомолекулярными веществами, что приводит к незначительному увеличению молекул антигена. В результате блокирования свободных аминокрупп происходит также изменение заряда молекул антигена, а именно увеличение его отрицательного заряда, что выражается в различии изоэлектрических точек токсина и анатоксина. Все основные изменения происходят в первые 12 часов, когда токсичность и свободный формалин снижаются соответственно на 98 % и 63 %.

В реактор-детоксикатор прибавляют 0,35–0,4 % формалина и обезвреживание проводят при 37–38 °С в течение 2–4 суток. При детоксикации происходит как обезвреживание токсина, так и стабилизация структуры антигена.

Важное значение для процесса обезвреживания токсина имеет величина рН. Повышение рН способствует увеличению фиксации формальдегида. Для обезвреживания наиболее оптимальным является рН 7,2–7,3. Связывание аминокрупп приводит к высвобождению (СООН)-групп и снижению рН, что требует постоянной корректировки величины рН.

Для детоксикации столбнячного токсина был изучен ряд соединений: формальдегид, глутаровый диальдегид, малоновый диальдегид, янтарный диальдегид и бета-пропилактон. Формальдегид и глутаровый альдегид продемонстрировали практически одинаковые результаты. Остальные соединения показали невысокую активность при детоксикации столбнячного токсина. Обнаружена корреляция между процессом детоксикации и реакциями метилирования. Несмотря на значительный объем исследований, посвященных процессу детоксикации столбнячного (как и дифтерийного) токсина, четкий механизм этого явления до сих пор не описан.

Очистка столбнячных антигенов на стадии анатоксинов имеет существенный недостаток, так как очистке подвергается препарат, в котором молекулы специфического белка уже частично скомплексированы с низкомолекулярными и средномолекулярными соединениями нативного анатоксина и питательной среды. Кроме того, в процессе формальной детоксикации происходит образование полимерных комплексов из соединений питательной среды, которые затрудняют последующую очистку.

Столбнячный токсин после 2-дневного обезвреживания осаждают в изоэлектрической точке (рН 3,4–4,0), создаваемой 1N хлористоводородной кислотой в присутствии 0,25 % гексаметофосфата натрия (соль Грехема). Осаждение проводят в реакторе-детоксикаторе при температуре 2–6 °С и постоянном перемешивании при 50–70 об/мин. Полученный препарат с помощью давления или перистальтического насоса передают на суперцентрифугу или сепаратор с охлаждением, чтобы температура супернатанта не превышала на выходе 4–6 °С. Осадок растворяют в 0,005 М фосфатном буферном растворе. Далее проводят очистку препарата от балластных белковых примесей.

Существует несколько методов очистки, используемых в настоящее время мировыми производителями вакцин.

1. *Ультрафильтрация.* Основана на различном размере молекул столбнячного анатоксина и низкомолекулярных веществ, которые свободно проходят через разделительные мембраны. Проводя ступенчатую ультрафильтрацию, возможно, отделить и высокомолекулярные примеси. Подбор мембран для разделения определяют с учетом диаметра молекул выделяемых веществ, их молекулярной массы, рН раствора, концентрации белковых компонентов в растворе и температуры проведения процесса. Необходимо также учитывать эффект накапливающегося поляризационного слоя макромолекул, который может привести к образованию гелевой фазы, оказывающей заметное влияние на скорость и эффективность процесса ультрафильтрации.

2. *Гель-фильтрация.* Обеспечивает разделение веществ в соответствии с размером и молекулярной массой их молекул. При гель-фильтрации через пористые структуры малые молекулы глубже проникают в поры гранул и отстают от молекул большого размера, которые свободно обходят эти гранулы. Так, например, при гель-фильтрации через гели Сефадексов G-75, G-100 первыми элюируются наиболее крупные молекулы, а затем остальные в порядке уменьшения их размера. Гель-фильтрация позволяет освободить столбнячные анатоксины от основной массы низкомолекулярных и средномолекулярных примесей. На скорость движения растворенного вещества могут влиять коэффициент эффективной диффузии растворенного вещества в геле, способность растворенного вещества адсорбироваться на внутренних поверхностях адсорбента, а также осмотическое давление

3. *Ионно-обменная хроматография.* Проводится на диэтиламиноэтилцеллюлозе (ДЭАЭ-целлюлозе), карбоксиметилцеллюлозе, ионообменных сефадексах. Основана на использовании различий в зарядах молекул анатоксина и молекул балластных белков в препарате.

В ионно-обменной хроматографии раствор смеси белков токсина (анатоксина) пропускают через колонку с неподвижным слоем ионообменной смолы: например, карбоксиметилцеллюлоза – катионообменная смола, получаемая посредством введения карбоксиметильных групп, несущих отрицательный заряд, в целлюлозную матрицу. Белки в катионной форме, несущие положительный заряд, связываются с этой смолой электростатическими силами. Затем адсорбированный белок элюируют буферными растворами с возрастающими значениями ионной силы (или рН). Постепенное изменение свойств элюента приводит к тому, что слабо связанные со смолой белки де-



сорбируются первыми, а затем элюируются белки, связанные более прочно. Аналогично осуществляют и хроматографию анатоксинов на анионообменниках, например, на ДЭАЭ-целлюлозе. Элюирование проводят буферными смесями с рН около 7,5 (например, трис-буфером, содержащим 80 мМ натрия хлористого). Полученный частично обезвреженный очищенный концентрированный анатоксин подвергают стерилизующей фильтрации через фильтры с размером пор 0,22 мкм, добавляют 0,15–0,2 % формалина и помещают при температуре 37–38 °С. Препарат выдерживают в течение 15–18 дней для полного обезвреживания. При необходимости в процессе детоксикации используют L-лизин, который впоследствии удаляется ультрафильтрацией. На этом же этапе освобождаются от присутствия в препарате свободного формальдегида.

Рассмотрен один из вариантов получения столбнячного анатоксина (токсоида), основанный на очистке частично обезвреженного токсина. В то же время ряд производителей используют и другую схему получения препарата – очистка на стадии столбнячного токсина. Полученный стерильный раствор токсина подвергают концентрации путем обработки аммонием сернокислым до 25 % насыщения. Смесь выдерживают при температуре 4–8 °С в течение 1 часа и осадок балластных белков отделяют центрифугированием. К прозрачному раствору вновь прибавляют аммоний сернокислый до 45 % насыщения выдерживают для формирования осадка при 4–8 °С и осадок отделяют центрифугированием. Полученный осадок растворяют в воде для инъекций. На этой стадии проводят определение Lf/мл и содержание белкового азота. Определение Lf проводят аналогично методу, используемому для определения Lf в дифтерийном анатоксине (токсине). Затем раствор подвергают колоночной ионообменной хроматографии на Q-Sepharose Fast Flow. Сорбированные фракции элюируют специальным буферным раствором. Процесс хроматографической очистки проводят дважды. Полученный раствор токсина концентрируют и очищают ультрафильтрацией или диализом. Очищенный дифтерийный токсин контролируют на содержание Lf/мл, белкового азота (мг/мл) и эндотоксина. Раствор токсина подвергают детоксикации с помощью формалина. Для стабилизации токсина в раствор добавляют аминокислоты: лизин и N-ацетил-триптофан и детоксикацию проводят в те-

чение 18–21 дня при температуре 34–35 °С, причем формалин добавляют дробно, порциями, в течение первых трех дней. После завершения процесса детоксикации раствор анатоксина подвергают стерилизующей фильтрации через фильтры с размером пор 0,22 мкм, прибавляют консервант мертиолят и на весь период дальнейшего контроля помещают при температуре 2–8 °С.

**Контроль очищенного концентрированного столбнячного анатоксина.** Это следующий этап изготовления. Полученный препарат контролируют в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения по следующим тестам:

1. *Стерильность* – проводят на бактериальную и грибковую стерильность в соответствии с требованиями ДФУ изд. 1.

2. *Специфическая токсичность* – проводят на пяти морских свинках массой 250–350 г.

Каждой свинке вводят подкожно 1 мл того разведения анатоксина, в котором содержится не менее 500 Lf (500 ЕС) анатоксина. Погибших животных нужно подвергнуть аутопсии. За морскими свинками необходимо наблюдать ежедневно и тщательно исследовать их еженедельно с целью выявления симптомов параличей столбнячной этиологии. Очищенный анатоксин считается успешно прошедшим испытание, если ни у одной морской свинки в течение 21 дня с момента введения не обнаружены симптомы специфических параличей или других симптомов столбняка и если к концу периода наблюдения в живых остается не менее 80 % животных. Кроме того, доза вводимого препарата в Украине составляет на морских свинках 1500 Lf, что в значительной степени гарантирует безвредность используемого препарата. При получении отрицательных результатов допускается проведение повторного процесса детоксикации с последующим контролем.

3. *Реверсия токсичности* – проводят с целью подтверждения невозможности реверсии токсичности в процессе хранения. Очищенный концентрированный анатоксин разводят до той его концентрации и концентрации химических веществ, какие приняты для готовой вакцины. Разведенный препарат хранят при температуре 37 °С и температуре 2–8 °С в течение 6 недель. Затем образцы препарата контролируют по тесту «специфическая токсичность».

4. Чистота антигена – проводят путем определения Lf/мл и белкового азота (мг/мл).

Очищенный анатоксин считается прошедшим испытание, если он содержит не менее 1000 Lf (1000 ЕС) на 1 мг белкового азота.

5. pH – определение проводят потенциометрически. Величина pH должна быть от 6,0 до 7,0.

6. Количество остаточного свободного инактивирующего агента (формальдегида) – определяют, например, колориметрическим методом при взаимодействии формальдегида со смесью фуксина и серной кислоты. Содержание формальдегида в анатоксине, разведенном до концентрации готового препарата, не должно превышать 0,2 г/л.

7. Определение концентрации антигена. Концентрацию антигена желательно оценивать путем определения в тестах *in vivo* (ЕС) – реакцией анти-токсин связывания. Другим подходящим методом является реакция флоккуляции (Lf) с противостолбнячной флоккулирующей сывороткой.

8. Определение белкового азота. Содержание азота определяют по методу Кьельдаля или по методу Несслера.

9. Определение эндотоксинов проводят LAL-тестом или проводят тест на пирогенность.

10. Определение фракционного состава анатоксина проводят методом электрофоретического разделения в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия.

Процесс изготовления столбнячного анатоксина приведен на рис. 4.

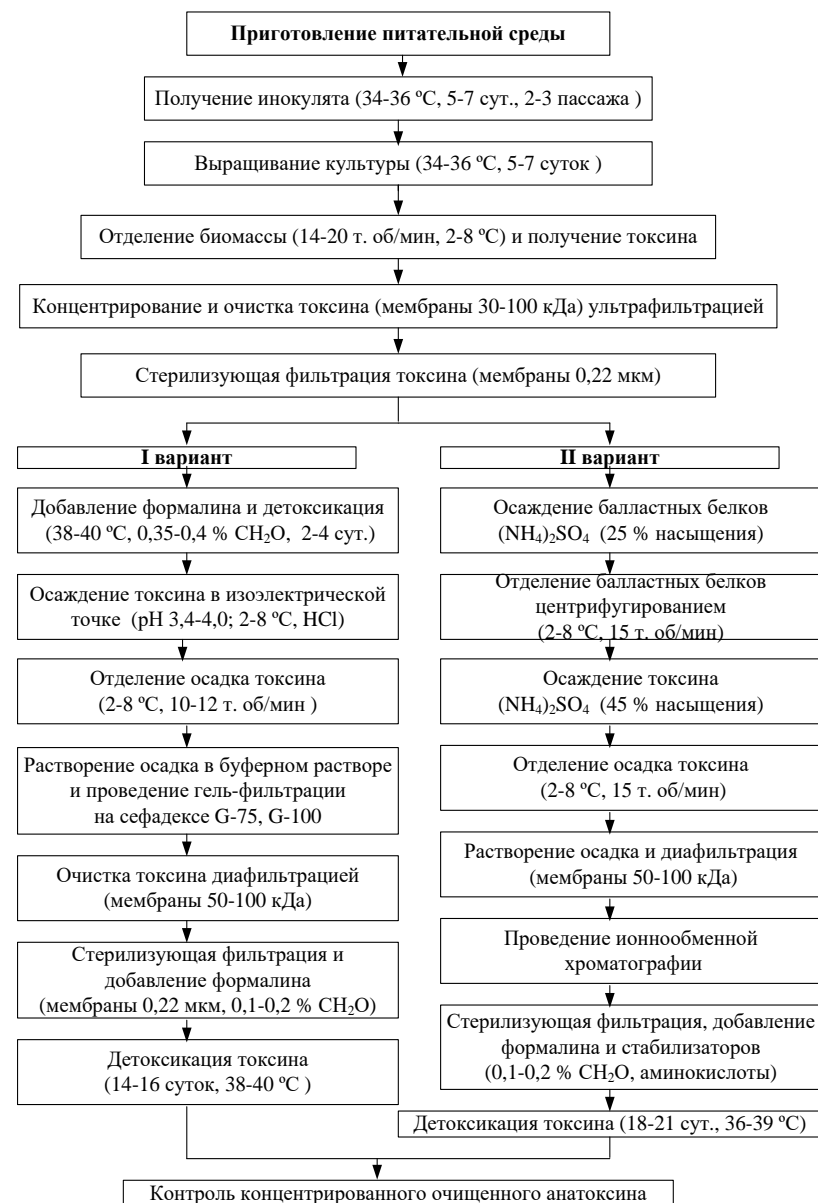


Рисунок 4 – Схема получения столбнячного анатоксина

### 1.4.3. Коклюш

Коклюшные антигены (*Bordetella pertussis*) представлены, в основном, четырьмя фракциями. Коклюшный токсин (КТ) прочно связан со стромой коклюшных бактерий. Максимальное количество обнаруживается в период экспоненциальной фазы, а в отмирающих популяциях токсин не выявляется. Для извлечения токсина из клеток наиболее часто используют их разрушение дезинтеграцией. Коклюшный токсин является ведущим токсином, определяющим патогенез и клинику заболевания, а также протективным антигеном, обеспечивающим формирование напряженного иммунитета.

Коклюшный токсин представляет собой сложный белок с молекулярной массой около 105 кДа. Подобно дифтерийному токсину, он состоит из А-промотора (S-26,2 кДа) и В-олигомера (S-21,9 кДа, S-21,8 кДа, S-12 кДа, S-11,7 кДа). Коклюшный токсин участвует в адгезии микроба к цилиарным клеткам и последующей его инвазии, модифицирует белковые регуляторные компоненты аденилатциклазной системы эукариотических клеток разных органов, лишая аденилатциклазу клетки возможности модулировать уровень циклического аденозинмонофосфата. Это приводит к нарушению нормальной работы эукариотической клетки и ее гибели. Антитоксические антитела против КТ обнаружены в сыворотках рековалесцентов и вакцинированных корпускулярно коклюшной вакциной (ККВ).

Филаментозный геагглютинин (ФГА) (фактор патогенности) также прочно связан со стромой коклюшных бактерий и может быть извлечен при разрушении клетки дезинтеграцией. ФГА представляет собой белок с молекулярной массой около 220 кДа, не обладающий токсичностью. Этот белок участвует в адгезии коклюшного микроба к цилиарным клеткам и колонизации респираторного тракта. Антитела против ФГА обнаружены у рековалесцентов и вакцинированных ККВ. Они предотвращают адгезию коклюшного микроба на поверхности реснитчатого эпителия дыхательных путей, тем самым, препятствуя инфицированию организма.

Пертактин (ПРН) (фактор вирулентности) представляет собой белок, входящий в состав наружной мембраны клетки коклюшного микроба с молекулярной массой 69 кДа. Участвует в адгезии и инвазии клеток, включая реснитчатый эпителий и альвеолярные макрофаги. Нетоксичен. Антитела обнаружены у рековалесцентов и вакцинированных ККВ.

Агглютиногены (АГГ) – фимбрии определяют серологическую специфичность коклюшных бактерий. По содержанию основных агглютиногенов штаммы подразделяют на серологические варианты (серовары): 1.0.0., 1.2.0., 1.0.3. и 1.2.3. Антитела к АГГ обнаружены в сыворотках рековалесцентов и вакцинированных ККВ.

Аденилатциклаза (АЦ) является фактором вирулентности, экзофермент, бифункциональный белок с молекулярной массой 200 кДа. Аденилатциклаза повышает уровень внутриклеточного аденозинмонофосфата в эукариотических клетках до токсических концентраций, вызывая глубокие изменения в клеточном метаболизме аденозин-монофосфата. У переболевших коклюшем и вакцинированных антитела против аденилатциклазы обнаруживаются в высоких титрах.

Термолабильный токсин (ТЛТ) относится к белковым внутриклеточным токсинам. По повреждающему действию он отнесен к типу цитотоксинов, к группе дермонекрозинов; при прогреве при 56 °С в течение 30 минут полностью обезвреживается. ТЛТ избирательно действует на гладкую мускулатуру сосудов, вызывая их сужение с последующей дегенерацией.

**Штаммы *Bordetella Pertusis*.** По морфологии штаммы коклюша – неподвижные микробы, грамтрицательные, овоидной формы палочки, располагающиеся в мазках отдельно или парами, без признака полиморфизма. На плотных средах колонии выпуклые, круглые, с ровными краями, блестящие, полупрозрачные, диаметром около 1 мм. Культуры должны агглютинироваться антибактериальной коклюшной сывороткой 1 фазы не ниже 3/4 её титра и соответствующими моноспецифическими сыворотками к основным агглютиногенам 1, 2 и 3 в их рабочем разведении. Вирулентные свойства определяют путем введения свежеприготовленной микробной суспензии мышам массой 14–16 г. При заражении интраназально величина LD50 должна быть в пределах 0,01–0,2 МЕМ (1 МЕМ – 1 млрд коклюшных микробов) и при внутримозговом – не выше 0,025 МЕМ. Токсичность определяют на кроликах и мышах Суспензия, из свежей 2-х суточной культуры, при введении кроликам внутрикожно в дозе 1 МЕМ должна вызывать некроз в диаметре не более 2 см. На мышах токсичность определяют по приросту массы мышей. Хранят штаммы в жидком азоте или лиофилизированном виде.

Штаммы, используемые для производства вакцин, должны быть идентифицированы на основании документа, в котором содержатся сведения об

их происхождении, характеристиках в момент выделения, а также подробные данные о результатах всех тестов, регулярно проводимых для подтверждения свойств этих штаммов характеристик. Штаммы необходимо выбирать таким образом, чтобы в готовой вакцине содержались агглютиногены 1, 2 и 3 типов. Для производства ацеллюлярного компонента используется ряд штаммов, например, в Японии используется штамм Tochama.

**Питательные среды.** Для производства коклюшных вакцин используются разнообразные питательные среды: жидкие и твердые, натуральные, полусинтетические и синтетические. Мы остановимся на *твердой питательной среде – казеиново-угольном агаре (КУА)*, используемом на территории стран СНГ.

Среда КУА состоит из кислотного гидролизата казеина, диализата дрожжей, агар-агара, активированного угля, растворимого крахмала и минеральных солей.

К казеину прибавляют концентрированную хлористоводородную кислоту и очищенную воду в соотношении 2 : 1 : 1. Смесь подвергают гидролизу при температуре 127 °С в течение 2 часов. Затем гидролизат разводят водой 1 : 1 и подвергают фильтрации. Фильтрат разводят водой до конечного объема, прибавляют активированный уголь из расчета 2–3 г на литр гидролизата и автоклавируют при 110 °С в течение 30 минут. Полученный осветленный гидролизат фильтруют. Степень расщепления белка в гидролизате должна быть не менее 97,0 %. Содержание аминного азота составляет 900–1030 мг %, общего азота – 910–1080 мг %, хлоридов 4,5–6,0 %. Диализат пекарских дрожжей получают путем ультрафильтрации суспензии дрожжей на аппаратах с порогом отсека 10 кДа или диализной пленке. Первый способ предпочтительней, так как в процессе ультрафильтрации непосредственно получают стерильный продукт.

**Методика изготовления среды заключается в следующем:** гидролизат казеина разводят водой до конечной концентрации 150–160 мг % аминного азота, доводят величину рН до 6,9–7,1 раствором 20 % NaOH, затем вносят растворы солей (дигидрофосфат калия, сульфат железа), диализат дрожжей и цистеин, доводят рН до 6,9–7,1. Определяют количество натрия хлорида и при необходимости доводят его концентрацию до 0,9 %. Затем прибавляют агар-агар (2,5–3,0 %), нагревают при 100 °С в течение 30 минут, отстаивают смесь и отделяют от осадка, устанавливают рН  $7,3 \pm 0,05$ , прибавляют акти-

вированный уголь, разливают в емкости для выращивания коклюшных бактерий и стерилизуют при температуре 110 °С в течение 30 минут.

Концентрация аминного азота в предлагаемой среде составляет 150–160 мг %, что позволяет обеспечить бактерии коклюша источником азота. Для улучшения ростовых свойств среды КУА используют аминокислоту цистеин и дрожжевой аутолизат, который содержит необходимые факторы роста. Агар-агар обеспечивает плотность среды, а активированный уголь выполняет функцию адсорбента.

**Культивирование штаммов *Bordetella pertusis*.** Выращивание проводят на двух видах питательных сред: твердых агаровых и жидких.

1. **Выращивание коклюшных бактерий на твердых агаровых средах.**

Для выращивания культуры на среде КУА используют стеклянные матрацы.

Сухую лиофилизированную культуру коклюшных бактерий высевают на среду КУА, выращивают при 35–36 °С в течение 2–3 суток. Затем пересевают на пробирки с аналогичной средой и выращивают при указанной температуре в течение 44–48 часов. Полученную культуру бактерий контролируют на бактериологическую чистоту и морфологию путем просмотра мазков, окрашенных по Граму. Культуру используют для подготовки посевного материала и сохранения штамма. Хранят культуру при 4–10 °С с пересевами через каждые 7–10 дней. Для производственных посевов культуру можно использовать не более 4–5 генераций (в течение 1 месяца).

Культуру для посевного материала и в массовом посеве выращивают на стеклянных матрацах в течение 44–48 часов с обязательной проверкой морфологии и чистоты. Смыв культуры осуществляют 0,9 % раствором натрия хлорида с температурой 36–37 °С. Для получения посевной (маточной) суспензии бактерий с 70–80 МЕМ/мл в каждый матрац прибавляют 60–70 мл раствора натрия хлорида. Суспензию с каждого матраца контролируют микроскопическим исследованием мазков, окрашенных по Граму. Затем проводят производственный посев на матрацы, добавляя в каждый 3–4 мл суспензии культуры. После равномерного распределения суспензии по поверхности среды матрацы помещают при температуре 34–36 °С на 24 часа засеянной поверхностью кверху. После этого матрацы переворачивают посевной поверхностью книзу и продолжают культивирование ещё 24 часа. Перед смывом культуры матрацы просматривают и отбирают микроскопически свобод-

ные от постороннего роста. Затем из каждого матраца делают мазки и проверяют морфологию и отсутствие посторонней микрофлоры. В матрацы, содержащие только типичные коклюшные микробы, прибавляют 0,9 % раствор натрия хлорида, охлажденный до 10 °С по 50–60 мл, и смывают микробную массу. Использование твердых питательных сред достаточно трудоемко, так как работа проводится с каждым матрацем как при посеве, так при дальнейших смывах. Кроме того, значительные трудозатраты приходится на микроскопию культуры коклюша из каждого матраца. Более предпочтительным, в отличие от использования твердых сред, является работа с жидкими средами.

#### *2. Выращивание коклюшных бактерий на жидких средах.*

Для выращивания коклюшных микробов используют модифицированную жидкую питательную среду Stainer & Scholte, содержащую 0,1 % (2,6-о-диметил) метациклодекстрин и казаминовую кислоту. Для выращивания культуры в больших объемах используют специальные ферментеры с электронным автоматическим управлением и регистрацией основных параметров, контролируемых при выращивании культур (рН, рО, температуры, количества микробов). Выращивание проводится в течение 48 часов при температуре 35–36 °С.

Культуру обязательно освобождают от питательной среды путем центрифугирования или сепарирования в асептическом режиме при 15 тыс. об/мин со скоростью 0,3 л/мин. Осаждение микробной массы соляной кислотой хотя и незначительно снижает протективную активность, но позволяет отделить вместе с микробной массой токсические субстанции.

**Получение коклюшной вакцины.** Полученную суспензию коклюшных микробов разводят изотоническим раствором хлорида натрия до концентрации 80–100 МЕМ/мл. В емкость с суспензией прибавляют раствор формалина до конечной концентрации формальдегида 0,1 %, тщательно перемешивают и выдерживают 20–24 часа при комнатной температуре. Затем суспензию перемешивают, прибавляют раствор мертиолята (тиомерсала) до конечной концентрации 0,01 % и выдерживают при температуре 2–10 °С в течение 3-х месяцев.

Следующим этапом изготовления вакцины является контроль коклюшной суспензии. Полученный препарат контролируют в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения по следующим тестам:

2. *Инактивация бактерий и токсинов.* Вакцина не должна содержать биологически активного термолабильного (дермонекротического) токсина. Следует показать, что метод приготовления вакцины гарантирует отсутствие в готовом продукте активного дермонекротического токсина. Используемый метод инактивации токсинов должен сводить к минимуму биологическую активность фактора, стимулирующего лимфоцитоз, сохраняя при этом иммуногенность препарата. Так как эндотоксин (липополисахарид) является составной частью клеточной оболочки коклюшных бактерий, его содержание лучше всего регулируется путем снижения количества бактерий, необходимых для достижения приемлемого уровня активности вакцины. Для подтверждения полной инактивации и чтобы убедиться, что микроорганизмы убиты, образец следует испытать путем посева на соответствующую питательную среду.

2. *Стерильность* – проводят на бактериальную и грибковую стерильность в соответствии с требованиями ДФУ изд. 1/2.

3. *Контроль чистоты культуры.* Проводят с помощью микроскопического исследования окрашенных мазков или путем посева на соответствующие культуральные среды.

4. *Количество остаточного свободного инактивирующего агента* (формальдегида) определяют, например, колориметрическим методом при взаимодействии формальдегида со смесью фуксина и серной кислоты. Содержание формальдегида в коклюшной вакцине, разведенной до концентрации готового препарата, не должно превышать 0,2 г/л. Количество мертиолята определяют с помощью любого из методов: дитизонового, полярографического, атомно-адсорбционного. Содержание мертиолята в коклюшной вакцине, разведенной до концентрации готового препарата, не должно превышать 0,01 %. Следует убедиться в том, что в той концентрации, в которой консервант присутствует в готовой вакцине, он не оказывает неблагоприятного действия на коклюшный иммуноген или на другие компоненты вакцины и не вызывает каких либо непредвиденных побочных реакций.

5. *Активность* (иммуногенность). Активность следует определять путем сравнения с активностью эталонной вакцины, откалиброванной по Международному стандарту коклюшной вакцины или по эквивалентной стандартной вакцине, утвержденной национальным органом контроля. Актив-

ность вакцины определяется с помощью протективного теста на мышах при внутримозговом введении заражающей дозы вирулентного штамма бактерий. Активность готовой вакцины в объеме, рекомендованном в качестве разовой дозы для человека, должна составлять не менее 4,0 МЕ.

**Получение ацеллюлярной коклюшной вакцины.** Для профилактики коклюша в течение полувека используют коклюшную клеточную вакцину. При достаточно высокой иммуногенности этой вакцины (обеспечение защиты у привитых детей составляет 70–90 %) обнаруживаются достаточно серьезные поствакцинальные осложнения, преимущественно неврологического характера. В связи с этим в ряде стран были начаты работы по созданию бесклеточной вакцины, содержащей ацеллюлярный коклюшный компонент. Причем в разных странах в состав вакцины вводили антигены коклюша различной структуры. Основными компонентами являлись: коклюшный токсин, филаментозный гемагглютинин, пертактин и агглютиногены. В 1981 году в Японии на 5000 детей была испытана вакцина (вакцина Sato Y.), включающая фимбриальный гемагглютинин, коклюшный токсин, детоксицированный формалином, дифтерийный и столбнячный анатоксины. При испытании препарата не обнаружено побочных эффектов и продемонстрирована большая эффективность по сравнению с корпускулярной (клеточной) вакциной.

На сегодняшний день не установлен оптимальный состав ацеллюлярного компонента вакцины. В то же время накопленный опыт применения бесклеточных вакцин показывает, что ответ при первичной иммунизации и ревакцинации равен или даже превосходит иммунный ответ на корпускулярную вакцину.

*Технологическую схему получения антигенов* можно представить следующим образом:

➤ изготовление жидкой питательной среды (технология Stainer и Scholte), модифицированной добавлением казामीновой кислоты и 1 мг/мл метил-β-циклодекстрина; рН среды 7,2–7,5, который устанавливают при помощи 50 % раствора H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Соли, входящие в среду, стерилизуют автоклавированием при 120 °С в течение 15 минут, а концентрат витаминов – стерилизующей фильтрацией;

➤ получение 2–3 генераций культуры коклюшных бактерий в колбах, находящихся в шейкере-инкубаторе, например, New Brunswick (модель 4300) при температуре 34–36 °С в течение 6, 12 и 28 часов для каждой генерации;

➤ культивирование коклюшных бактерий при температуре 34–36 °С в течение 48–60 часов при постоянном перемешивании (на данной стадии проводят определение бактериальной плотности при 650 нм, цветности суспензии, содержания коклюшного токсина и филаментозного гемагглютинина). При необходимости проводят добавление свежих порций среды или её отдельных компонентов. Возможно проведение аэрации в процессе культивирования. Инокулят, добавляемый в реактор, должен находиться в логарифмической стадии роста;

➤ отделение биомассы от культуральной жидкости путем суперцентрифугирования или ультрафильтрации (в культуральной жидкости проводят определение белкового азота, содержания коклюшного токсина и филаментозного гемагглютинина);

➤ концентрирование культуральной жидкости путем ультрафильтрации в 10–15 раз, например, на мембранах с порогом отсечения 20 кДа;

➤ фильтрация культуральной жидкости через фильтры с величиной пор не более 0,22 мкм;

➤ выделение филаментозного гемагглютинина (ФГА) и коклюшного токсина из профильтрованной культуральной жидкости;

➤ осаждение гемагглютининов сульфатом аммония;

➤ очистка коклюшного токсина хроматографией проводится на колонках с аффинным сорбентом (при этом ФГА не связывается с сорбентом, а остается в культуральной жидкости). Затем коклюшный токсин элюируют с колонки буферным раствором и подвергают диализу, например, трис-буфером (рН около 8,0), содержащим 0,6 М натрия хлорида. Полученный раствор повторно хроматографируют на аффинном сорбенте и после элюирования и очистки ультрафильтрацией определяют содержание коклюшного токсина, белкового азота, эндотоксинов, примесей ФГА;

➤ очистка ФГА проводится колоночной хроматографией на аффинных сорбентах. Связавшиеся фракции элюируют специальным буфером, десорбирующим ФГА. Процесс хроматографии повторяют еще раз. В растворе кон-

тролируют содержание ФГА, эндотоксин, белковый азот и коклюшный токсин. Необходимым условием очистки антигенов является удаление липополисахаридов, присутствие которых в антигене приводит к пирогенности препарата;

➤ детоксикацию очищенных антигенов проводят путем обработки формалином (конечная концентрация формальдегида 0,25 %) в присутствии L-лизина (1,5 М раствор) и N-ацетилтриптофана при 37–40 °С в течение 7–14 дней для ФГА и 14–18 дней для коклюшного токсина при pH 7,5–8,0. На этом этапе (после завершения детоксикации) рядом производителей проводится ультразвуковая обработка и удаление свободного формалина диализом или ультрафильтрацией. В качестве стабилизатора используют глюкозу, а в качестве консерванта – мертиолят. Возможно проведение детоксикации коклюшного токсина в этих же условиях глутаровым альдегидом. Проведение обработки формалином или глутаровым альдегидом в присутствии аминокислот сокращает длительность процесса детоксикации и стабилизирует продукт, предотвращая возможность реверсии анатоксина в токсин. В ряде случаев детоксикацию альдегидами проводят в течение 35–42 дней при указанных условиях.

➤ контроль выделенных антигенов: на натрий-додецил-сульфат-полиакриламидном геле электрофорез (SDS-PAGE), радиальная иммунодиффузия, высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC), содержание детоксикатора (формальдегида, глутарового альдегида и др.), стерильность, pH, определение содержания консерванта (например, мертиолята), определение уровня эндотоксинов LAL-тестом, определение реверсии токсичности после хранения пробы антигенов при 37 °С в течение 4 недель, определение токсичности с использованием гистаминчувствительного теста для оценки гистаминсенсibiliзирующей активности, иммуноблотинг, ELISA, оценка лейкоцитозстимулирующей активности, белкового азота и иммуногенности.

На рис. 5 приведена схема получения коклюшного компонента.



Рисунок 5 – Схема получения коклюшного компонента

Суспензии бактерий, приготовленных из обезвреженных культур коклюша, или антигены после проведения детоксикации должны обладать низкой токсичностью, которая определяется по следующим методам:

#### 1. Тест изменения массы мышей

Для оценки токсичности в данном тесте используют по 10 мышей, равномерно прибавляющих массу в течение 3–4 суток наблюдения. Ежесуточный прирост массы тела мышей должен быть от 0,5 до 1 г. Групповую массу тела мышей определяют непосредственно перед введением препарата. Каждой мышце вводят внутривбрюшинно испытуемую вакцину или антиген и референс-препарат в объеме 0,5 мл (1 дозу). Контрольным животным вводят по 0,5 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида для инъекций. За животными наблюдают в течение 7 суток, периодически определяя групповую массу животных. Препарат считается безвредным, если: а) через 72 часа групповая масса тела мышей не ниже их исходной массы; б) относительный прирост массы тела мышей, получивших испытуемый антиген, составляет не менее 60 % прироста массы тела контрольных мышей и не менее абсолютного и относительного прироста массы мышей, которым вводили референс-вакцину.

#### 2. Тест определения лейкоцитозстимулирующей активности

Лейкоцитозстимулирующий индекс (ЛСИ) – отношение количества лейкоцитов мышей в опыте к числу лейкоцитов животных, которым вводили референс-антигены. Вакцину считают слаботоксичной, если ЛСИ по отношению к референс-препарату составляет 0,5 и менее; средней токсичности, если ЛСИ находится в пределах от 0,5 до 1,0; с выраженной токсичностью, если ЛСИ более 1,0.

Для оценки лейкоцитозстимулирующей активности антигенов группе мышей (по 10 мышей в каждой группе, массой 14–16 г) вводят внутривбрюшинно 0,5 мл испытуемого препарата, референс препарата и 0,9 %-го раствора натрия хлорида для инъекций. Через 72 часа у опытных и контрольных животных берут кровь из хвостовой вены. Количество лейкоцитов подсчитывают в камере Горяева.

#### 3. Тест определения гистамин-сенсibiliзирующей активности

Определение гистамин-сенсibiliзирующей активности (ГСА) проводят на мышцах (самках) чувствительных к гистамину штамма. Определение проводят с референс-препаратом. На каждый препарат берут три группы мышей массой 14–16 грамм.

Препараты вводят мышам внутривбрюшинно по 0,5 мл в соответствующих разведениях. Контрольным животным внутривбрюшинно вводят 0,9 %-ый раствор натрия хлорида для инъекций в объеме 0,5 мл. Через 4–5 дней опытным и контрольным животным вводят внутривбрюшинно по 2 мг гистамина дигидрохлорида в 0,5 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида. Гибель животных учитывают через 2 и 24 часа. Животные, которым вводили раствор натрия хлорида, должны остаться живыми.

Альтернативным методом является определение ГСА путем введения 4-х недельным мышам внутривбрюшинно по 0,5 мл вакцины или антигенов, с последующим введением через 4 дня мышам 4 мг гистамина дигидрохлорида в 0,5 мл внутривбрюшинно. Измеряют температуру ректально у каждой мыши. Регламентируется повышение температуры у животных на величину, согласованную с Национальным контрольным органом.

Цельноклеточные коклюшные вакцины используются более 50 лет, а ацеллюлярные вакцины только около 20 лет. С развитием биотехнологии предпринимаются попытки для создания коклюшных рекомбинантных вакцин.

#### 1.4.4. Вспомогательные компоненты вакцин

**Адсорбент (гель гидроокиси алюминия).** Выделенные очищенные антигены самостоятельно не применяют из-за слабо выраженной иммунологической эффективности. В связи с этим важное значение приобретают депонирующие вещества и, в частности, минеральные сорбенты, которые обладают выраженным адьювантным действием и оказывают стимулирующее влияние на иммуногенез. Кроме того, они обеспечивают периодическое поступление антигена в организм за счет замедления процесса всасывания.

Являясь одним из компонентов вакцинных препаратов, *сорбент должен отвечать следующим требованиям*: быть безвредным, обладать максимальной избирательной сорбцией, иметь высокую сорбционную активность, длительно и прочно удерживать антиген в сорбированном состоянии, вызывать умеренную местную реакцию, быть стандартным по составу. Основным физико-химическим параметром, характеризующим качество вводимого в состав вакцин депонирующего вещества, является его адсорбционная способность, то есть способность концентрировать белковый антиген из объема



фаз на поверхности их раздела. При изготовлении сорбированных вакцин концентрация антигена в растворе, температура и природа адсорбата остаются, как правило, постоянными, в то время как сам адсорбент, а также степень дисперсности препарата, зависящие от трудно учитываемых условий получения гидроокиси алюминия, могут отличаться. Последнее может быть связано с соотношением между кристаллической и аморфной формой гидроокиси алюминия. Исследования, проведенные электронной микроскопией и седиментационным анализом, подтвердили наличие в гидроокиси алюминия полидисперсной системы, причем частицы более мелкого размера отличались высокой адсорбционной активностью. Частицы в геле отличались не только по величине, но и по форме.

Известно, что в качестве сорбента применяют гидроокись алюминия, фосфат алюминия и фосфат кальция. Однако *наиболее эффективным сорбентом*, наиболее часто используемым в составе вакцин, является *гидроокись алюминия* –  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Существует два метода получения препарата.

*Метод 1.* Через 50 %-ый раствор сульфата алюминия  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  барботируют газообразный аммиак. При достижении величины pH 6,0–6,5 подачу аммиака прекращают. Продукт отстаивают и производят декантацию надосадочной жидкости. Промывку путем декантации повторяют еще 10–12 раз до отрицательной реакции на сульфат-ионы. Удаление несвязавшихся реагентов можно проводить на аппаратах с ультрафильтрационными мембранами.

*Метод 2.* Проводят одновременное сведение растворов бикарбоната натрия ( $\text{NaHCO}_3$ ) и сульфата алюминия ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ) при постоянном перемешивании 60–80 об/мин. Продукт отстаивают и производят декантацию надосадочной жидкости. Промывку путем декантации повторяют ещё 6–8 раз до отрицательной реакции на сульфат-ионы. Удаление несвязавшихся реагентов можно проводить на аппаратах с ультрафильтрационными мембранами.

Полученную гидроокись алюминия подвергают термической стерилизации.

Исследования продемонстрировали, что гидроокись алюминия, полученная по первому способу, обладает более низкой сорбционной активностью, чем сорбент, полученный по второму способу, но в первом случае гидроокись более стабильна.

Полученные сорбенты проходят контроль по следующим тестам: содержание ионов алюминия, сульфат-ионов и ионов аммония, определение показателя дисперсности сорбента, стерильность, аномальная токсичность, pH.

В настоящее время рядом фирм налажен выпуск сорбентов, которые отвечают требованиям, предъявляемым к адьювантам для производства вакцин. Хорошо известна Датская фирма Superfos a/s, производящая гель гидроокиси алюминия ALHYDROGEL ALUMINIUM HYDROXIDE GEL. Сорбент выпускается в двух квалификациях «А» и «В», отличающихся только по содержанию в геле оксида алюминия: «А» – 2,0 %  $\text{Al}(\text{OH})_3$  и «В» – 3,0 %  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Обе марки содержат сульфат-ионов не более 0,1 %; нитратов в виде азота не более 0,005 %; pH от 6,0 до 7,0. Гидроокись алюминия стабильна в течение 3–4 лет, стерильна и апиrogenна. Сорбент при необходимости может подвергаться повторной стерилизации при 121 °C в течение 1 часа. Продукт отвечает требованиям Британской фармакопеи.

**Консервант (мертиолят).** Наверное, ни один компонент вакцин не вызывал такого сильного противодействия, как мертиолят. Мертиолят (тиомерсал, тимерозал) представляет собой ртутьорганическое соединение – орто-этилртуть тиосалицилат натрия ( $\text{C}_9\text{H}_9\text{HgNaO}_2\text{S}$ , м.м. – 404,8), оказывающее бактерицидное, фунгицидное и антисептическое действие. Он широко используется в качестве консерванта вакцинных препаратов. В составе вакцин мертиолят используется в течение 50 лет. Его присутствие в вакцинах определяется не только ролью консерванта, но и ролью детоксикатора бактерий, например, в клеточной коклюшной вакцине. Выпуск однодозных вакцин, совершенствование оборудования и условий производства при переходе на систему GMP позволит уже в ближайшее время отказаться от использования мертиолята в ряде случаев при изготовлении сорбированных вакцин. Имеющиеся в литературе единичные сообщения подтверждают, что мертиолят в дозе 3,3 мг/кг не вызывает цитогенетических аномалий в клетках костного мозга, селезенки и эмбриональной печени мышей, причем указанная доза приблизительно в 200 раз превосходила дозу, вводимую людям. В то же время, в работах, выполненных на различных культурах клеток позвоночных, включая клетки человека, была продемонстрирована высокая цитотоксичность мертиолята. Активно обсуждается вопрос о связи между наличием в вакцинах мертиолята и возникновением у вакцинированных детей аутизма.

При изучении влияния мертиолята на организм ребенка были проведены исследования по фармакокинетике этого соединения при вакцинации детей вакциной типа АКДС. Препарат вводили в соответствии с календарем прививок в 2 и 6 месяцев. Обнаружено, что содержание ртути в организме ребенка снижалось на 50 % в течение 4 дней после введения вакцины. В материалах совещания Глобального комитета советников ВОЗ по безопасности вакцин от 2–3 декабря 2004 года имеется информация о том, что мертиолят быстро выводится из организма и исчезает в пределах 5–6 дней. По мнению экспертов, такое кратковременное пребывание минимального количества мертиолята едва ли может оказать карциногенное действие и вызвать у ребенка аутизм или лейкемию. В экспериментах на животных мертиолят также не оказывал карциногенного действия. Эксперты пришли к выводу, что нет прямых доказательств связи вакцинации с возникновением аутизма. В то же время, по мнению ряда специалистов, мертиолят вызывает у мышей, склонных к аутоиммунным заболеваниям, такие же поведенческие проявления, как у человека при аутизме. При этом ВОЗ было отмечено, что в невропатологии аутизма (это одно из нейроповеденческих расстройств, которое привлекает наибольшее внимание населения) появление характерных изменений – увеличение веса и общего объема мозга, объема серого вещества коры и плотности нейронов в либической системе, уменьшение количества клеток Пуркинье в мозжечке и отсутствие глиоза – не было связано с влиянием какого-либо экзогенного токсического вещества. Существуют и противоположные мнения, суть которых сводится к следующему: мертиолят, обычно используемый в качестве консерванта, не только непосредственно оказывает токсическое действие, но и способен изменять свойства клеток, так как объем ртути, вводимый детям в ходе вакцинации согласно типовым календарям, приводит к развитию нейродегенеративных заболеваний у значительного числа детей. Проводились исследования токсичности мертиолята на перевиваемой культуре амниотического эпителия человека и на первичной трипсинизированной культуре фибробластов куриного эмбриона в концентрации  $10^4$ – $10^6$ . Установлена высокая токсичность мертиолята на культуре клеток. Это подтверждается гибелью клеток при разведении консерванта  $10^6$ . На сегодняшний день отсутствуют достоверные данные о взаимосвязи введения вакцин, содержащих мертиолят, с появлением детей, больных аутизмом. В то же время, количество детей, страдающих аутизмом, увеличилось за последние 10–15 лет в 7 раз. Для примера, в США к детям, больных аутизмом, относят детей с синдромом дефицита внимания и синдромом гиперактивности. Количество таких детей в США около 6 млн. Изучение зависимости вакцинации

детей и появления признаков аутизма – это вопрос времени, и он обязательно должен быть решен в ближайшем будущем. Необходимо также отметить, что одним из путей решения этого вопроса является исключение из состава вакцин консерванта – мертиолята.

Контроль мертиолята, используемого в составе вакцин, осуществляется по следующим показателям: растворимость, подлинность, ртутные соли, pH, растворимые в эфире вещества, массовая доля влаги, количественное определение (не менее 98 % и не более 101 %), аномальная токсичность и безвредность. Мертиолят подвергают систематическому переконтролю в сроки, согласованные с национальным органом контроля.

В вакцинах мертиолят используется в конечной концентрации 0,01 %. Для использования в вакцинах мертиолят проходит контроль на безвредность на морских свинках массой  $(320 \pm 20)$  грамм. Раствор мертиолята  $(0,01 \pm 0,002)$  % в 0,9 %-ом растворе натрия хлорида изотонического вводят двум морским свинкам подкожно по 5,0 мл, разделяя по 2,5 мл в оба бока. За животными наблюдают 15 суток. Мертиолят считают безвредным, если в течение указанного периода у морских свинок не наблюдались местные (инфильтрат, некроз) или общие (изменение поведенческих реакций, уменьшение массы тела) реакции.

#### ***1.4.5. Получение адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакцины (АКДС)***

В предыдущих разделах были подробно рассмотрены требования ко всем компонентам, входящим в состав вакцины АКДС. Теперь, имея прошедшие контроль столбнячный и дифтерийный очищенные концентрированные анатоксины, коклюшную суспензию или ацеллюлярный коклюшный антиген, гель гидроокиси алюминия, мы можем перейти к конструированию готовой вакцины АКДС. Необходимое количество каждого компонента для серии вакцины АКДС рассчитывают, исходя из количества международных единиц мутности (МЕМ) для коклюшной суспензии, антигенных единиц в анатоксинах и ацеллюлярном компоненте и количества  $Al_2O_3$  в мг в суспензии адсорбента. При добавлении консерванта мертиолята в состав вакцины необходимо учитывать его содержание в коклюшном компоненте.

В табл. 5 приведены контрольные показатели для всех компонентов вакцины АКДС.

Таблица 5 – Контрольные показатели компонентов вакцины АКДС

Наименование контрольного показателя	Компоненты вакцины АКДС					
	Столбнячный анатоксин (СА)	Дифтерийный анатоксин (ДА)	Коклюшный компонент (КК)	Al(OH) <sub>3</sub>	NaCl 0,9 % р-р	Мертиолят 1% р-р
Стерильность	Стерилен	Стерилен	Стерилен	Стерилен	Стерилен	Стерилен
Токсичность	Безвреден	Безвреден	Безвреден	Безвреден	Безвреден	Безвреден
Содержание формалина	CH <sub>2</sub> O<0,01 %	CH <sub>2</sub> O<0,01 %	CH <sub>2</sub> O<0,01 %	–	–	–
pH	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,4	7,25 ± 0,25	5,0 ± 7,0	6,5 ± 7,2
Количественное определение	> 1000 Lf/мг белкового азота	> 1500 Lf/мг белкового азота	Иммуногенен	3–4 мг/мл	0,87–0,93 %	0,99–1,01 %
Пирогенность	Апирогенен	Апирогенен	Апирогенен	Апирогенен	Апирогенен	Апирогенен
Реверсия токсичности	Отсутствует	Отсутствует	–	–	–	–

**Изготовление вакцины** проводят в реакторе, рабочий объем которого обычно не превышает 0,65–0,7 от общего объема. Работу отдельных узлов реактора необходимо контролировать. Должны регулироваться отдельные параметры: температура стерилизации, pH, скорость вращения мешалки др. Реактор должен быть обеспечен пробоотборниками и устройством, обеспечивающим возможность асептического добавления компонентов, патрубками и датчиками. Необходимо обеспечить возможность автоматического контроля и регулирования основных параметров конструирования вакцины. На эффективность сорбции анатоксинов на геле гидроокиси алюминия влияет ряд факторов: содержание анатоксина и степень очистки анатоксина, ионная сила, pH и температура проведения процесса, концентрация сорбента и его дисперсность. Каждый производитель сорбированных вакцин самостоятельно устанавливает параметры проведения процесса сорбции, исходя из физико-химических характеристик антигена и адьюванта.

Адсорбент, гель гидроокиси алюминия, переносят в реактор и перемешивают. Затем в реактор прибавляют рассчитанное количество анатоксинов, устанавливают pH в пределах 6,3–7,3 и оставляют в реакторе при температуре 15–20 °С на 20–24 часа при периодическом перемешивании, после чего отбирают пробу и проводят контроль вакцины на полноту сорбции анатоксинов. При полной сорбции в реактор прибавляют коклюшный компонент вакцины и перемешивают. В реактор в условиях асептики прибавляют стерильный раствор 1 %-го мертиолята и 0,9 %-ый раствор натрия хлорида изотонического до расчетного объема. Смесь перемешивают в течение 30–40 минут. Определяют и устанавливают величину pH в пределах 6,3–7,3 при помощи 1N хлористоводородной кислоты. При наличии достаточного количества реакторов препарат оставляют при температуре 2–8 °С на период контроля. При необходимости препарат из реактора переносят в стеклянные стерильные бутылки емкостью 16–20 литров и помещают при температуре 2–8 °С на период контроля.

Несомненный интерес вызывает возможность изготовления и хранения вакцины (на период контроля) в одноразовом оборудовании фирмы «Sartorius STEDIM Biotech» (Biostat CultiBag RM). Оно представляет собой емкости для сведения компонентов вакцин, их перемешивания, взятия образцов на контроль и хранения при температуре 2–8 °С. Системы «Stedim» представляют собой валидированные пластиковые контейнеры одноразового использования. Наличие перистальтического насоса, специальных соединений и фильтров позволяют проводить работы с биотехнологическими продуктами в асептических условиях. Скорость перемешивания может достигать до 780 л/час. Так, например, контейнеры Flexboy вместимостью 20 и 50 литров позволяют провести полное перемешивание содержимого в течение 3–5 минут в асептических условиях. Изучение нейтральности материалов, непосредственно контактирующих с жидкостью в контейнере, подтвердило их инертность для биотехнологических продуктов и возможность длительного хранения препаратов в этих условиях без изменения их характеристик. Контейнеры апирогенны, их изготовление проводится в условиях, соответствующих требованиям GMP. Использование системы «Stedim» позволяет проводить стерилизующую фильтрацию, например, анатоксинов, и принимать стерильный продукт непосредственно в контейнер, с последующим взятием образцов и хранением продукта. Учитывая, что вместимость таких контейнеров от 2 до

1000 литров, в них можно производить различные биотехнологические продукты: культивирование бактерий и вирусов, смешивание компонентов вакцин, хранение препаратов в течение всего периода контроля и разлив из них продукции в первичную упаковку.

**Контроль вакцины АКДС.** Это следующим этап изготовления. Полученный препарат контролируют в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения по следующим тестам:

1. *Описание.* Суспензия желтовато-белого цвета, которая при стоянии расслаивается на прозрачную надосадочную жидкость и аморфный осадок, который полностью разбивается при встряхивании.

2. *Стерильность.* Проводят на бактериальную и грибковую стерильность в соответствии с требованиями ДФУ изд. 1/2.

3. *Токсичность.*

3.1. Проводят на 5-ти морских свинках массой 250–350 г.

Каждой свинке подкожно вводят 3 мл вакцины (6 прививочных доз). Наблюдение за животными проводят в течение 30 дней. Препарат считают безвредным, если в период наблюдения все свинки остаются живыми без проявления дифтерийной и столбнячной интоксикации. Местная реакция допускается только в виде небольшого инфильтрата в месте введения вакцины (1–2 см). При обнаружении некрозов и абсцессов препарат не подлежит выпуску.

3.2. Проводят на группе из 10 мышей массой 14–16 грамм.

Групповую массу мышей определяют непосредственно перед введением вакцины. Каждой мышце вводят внутрибрюшинно вакцину в объеме 0,5 мл (1 доза). Контрольной группе мышей вводят внутрибрюшинно 0,5 мл раствора натрия хлорида изотонического 0,9 %-го для инъекций. За животными наблюдают 7 суток. Вакцина считается безвредной, если:

а) через 72 часа групповая масса тела подопытных животных не ниже массы их тела перед введением препарата;

б) через 7 суток относительный прирост массы тела мышей, которые получили вакцину, составляет не меньше 60 % прироста массы тела контрольных животных

4. *Иммуногенность всех трех компонентов.* Вакцина АКДС должна иметь иммуногенную активность и содержать в 1 мл препарата не менее 8 международных защитных единиц (МЗЕ) коклюшного компонента, не менее

60 международных иммунизирующих единиц (МИЕ) дифтерийного анатоксина и не менее 120 МИЕ столбнячного анатоксина.

4.1. *Определение иммуногенности коклюшного компонента*

Вакциной АКДС иммунизируют три группы мышей массой около 12 грамм (по 18–20 животных в каждой группе) разными дозами препарата. Одновременно аналогичные группы животных иммунизируют стандартной вакциной. Через 14 суток животным обеих групп вводят внутримозгово-вещно не менее 100 LD<sub>50</sub> живой культуры тест-штамма коклюша. За животными наблюдают в течение 14 суток, ежедневно регистрируя выживаемость животных. Расчет количества МЗЕ в исследуемом препарате проводят по методу Вильсона и Вустера с использованием таблиц Национального института здоровья США.

4.2. *Определение дифтерийного компонента*

Вакциной АКДС иммунизируют 3 группы морских свинок массой (300 ± 50) грамм по 10 животных в группе разными дозами препарата. Одновременно аналогичные группы животных иммунизируют разными дозами стандартного образца дифтерийного адсорбированного анатоксина. Через 30 суток животным вводят по (100 ± 50) LD<sub>50</sub> дифтерийного тест-токсина. За животными наблюдают в течение 7 суток, ежедневно регистрируя количество выживших животных. Расчет количества МИЕ в дозе препарата проводят по методике, утвержденной национальным органом контроля. В настоящее время ряд производителей вакцины АКДС (DPT) используют и другие методы контроля протективных свойств вакцин:

✓ реакция нейтрализации дифтерийного токсина известной активности противодифтерийными антителами: морских свинок иммунизируют вакциной и через 28 дней получают сыворотку, которую используют для реакции нейтрализации дифтерийным токсином. Полученную смесь вводят 2 морским свинкам. По их выживаемости и реакциям на введение оценивают протективные свойства антигенов вакцин;

✓ определение противодифтерийных антител методом ИФА: морских свинок иммунизируют вакциной, через 28 дней получают сыворотку, в которой определяют содержание специфических противодифтерийных антител.

4.3. *Определение столбнячного компонента*

Вакциной АКДС в разных дозах иммунизируют 5 групп белых мышей массой около 17 грамм по 16–20 животных в группе. Одновременно анало-

гичные группы белых мышей иммунизируют разными дозами стандартного образца адсорбированного столбнячного анатоксина. Через 28 суток животным вводят по  $(100 \pm 50) LD_{50}$  столбнячного тест-токсина. За животными наблюдают 6 суток, ежедневно регистрируя количество выживших животных. Расчет количества МИЕ в дозе проводят по методике, утвержденной национальным органом контроля. В настоящее время ряд производителей вакцины АКДС (DPT) используют и другие методы контроля протективных свойств вакцин:

✓ реакция нейтрализации противостолбнячными антителами столбнячного токсина известной активности: морских свинок иммунизируют вакциной и через 28 дней получают сыворотку, которую используют для реакции нейтрализации столбнячным токсином. Полученную смесь вводят 5 мышам. По их выживаемости и реакциям при введении оценивают протективные свойства антигенов вакцин;

✓ определение противостолбнячных антител методом ИФА: морских свинок иммунизируют вакциной, через 28 дней получают сыворотку, в которой определяют содержание специфических противостолбнячных антител.

5. *Определение полноты сорбции.* В 1 мл надосадочной жидкости вакцины АКДС может быть не более 1 Lf дифтерийного анатоксина (определяют реакцией флоккуляции со стандартной противодифтерийной сывороткой) и не более 0,1 ЕС столбнячного анатоксина (определяют в реакции связывания анатоксина со стандартной противостолбнячной сывороткой).

6. *pH* – определение проводят потенциометрически. Величина pH должна быть от 6,0 до 7,0.

7. *Количество остаточного свободного инактивирующего агента* (формальдегида) определяют, например, колориметрическим методом при взаимодействии формальдегида со смесью фуксина и серной кислоты. Содержание формальдегида в вакцине, разведенной до концентрации готового препарата, должно быть не более 0,01 %.

8. *Определение оксида алюминия.* В 1 мл препарата не более 1,25 мг алюминия (например, методом атомной адсорбции).

9. *Определение мертиолята.* Содержание мертиолята в препарате не менее 80 % и не более 120 % от указанного в составе.

В течение периода контроля вакцины в форме *in bulk* препарат находится на хранении при температуре 2–8 °С.

*Разлив и герметизация вакцины АКДС.* После проведения контроля и подтверждения соответствия установленным нормам препарат разливают в первичную упаковку (флаконы и ампулы). Требования к первичной упаковке для разлива и хранения вакцин изложены в Государственной фармакопее Украины (2001, 2004, 2008 гг.) и Европейской фармакопее (2007 г.).

Для разлива и герметизации сорбированных вакцин необходима технологическая линия, состоящая из синхронно работающего оборудования, соединенного в единую технологическую линию: моечные машины для обработки первичной упаковки (ампулы и флаконы); стерилизационные и сушильные тоннели; аппараты для наполнения и герметизации ампул (флаконов); аппарат для мойки и стерилизации резиновых пробок; аппараты для контроля на герметичность. Удобным в обслуживании и эффективным является оборудование концерн STERIS – системы мойки и дезинфекции, НАМО – эффективная мойка лабораторной посуды, частей технологического оборудования и контейнеров, используемых в асептическом производстве.

*Технология наполнения первичной упаковки* сводится к следующему:

▪ визуальный просмотр ампул (флаконов) с целью отбраковки некондиционной продукции (сколы, трещины, инородные включения в стекло);

▪ мойка ампул (флаконов) по схеме: ультразвуковая обработка в очищенной воде; очистка шприцеванием очищенной водой, продувка стерильным воздухом, шприцевание водой для инъекций; продувка стерильным воздухом. Воздух, очищенная вода и вода для инъекций подвергаются фильтрации через стерилизующие фильтры типа «Millipore». Вода используется с температурой 60–90 °С. После проведения обработки первичной упаковки обязательным является контроль на присутствие в ней механических включений;

▪ далее ампулы (флаконы) поступают в стерилизационный туннель, имеющий три технологических зоны: сушка стерильным воздухом, стерилизация при температуре  $(300 \pm 15)$  °С, охлаждение стерильным воздухом до температуры около 20 °С. После этой стадии осуществляют контроль на механические включения и стерильность первичной упаковки. За счет направленного потока горячего воздуха проходит не только стерилизация, но и депиrogenизация ампул и флаконов;

▪ наполнение и герметизация первичной упаковки путем запайки ампул в газокислородной среде или герметизация флаконов пробками, с последующим насаживанием алюминиевого колпачка. При наполнении флаконов и ампул предусмотрена программа, позволяющая герметизировать первичную упаковку в атмосфере азота или инертных газов.

Все узлы аппарата для наполнения подвергаются паровой или суховоздушной стерилизации. Процесс проходит в автоматическом режиме с полным документированием указанных этапов. Учитывая тот факт, что данный этап производства вакцин является завершающим, весь процесс проходит в соответствующих классах чистоты Д, С, В. Непосредственно наполнение, герметизация и подготовка систем соединения препарата с разливочным аппаратом происходит в классе чистоты А.

В связи с суспензионной структурой вакцин их разлив осуществляется при постоянном перемешивании препарата. Аппараты наполнения обеспечены системой регулировки объема при наполнении в первичную упаковку. Обязательным является постоянный контроль дозы разлитого препарата.

Обязательным условием изготовления и разлива всех инъекционных препаратов, в том числе и вакцин, является систематический контроль, подтверждающий класс помещений по наличию аэрозольных частиц и микробной контаминации.

Сегодня промышленность выпускает десятки видов оборудования высокого класса, позволяющего проводить необходимые измерения. Так, например, удобными в работе и высокоэффективными являются счетчики аэрозольных частиц: 2-х канальный ННРС-2 для измерения частиц с величиной 0,3 / 0,5 мкм или 6-ти канальный ННРС-6 для измерения частиц 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 2,0; 5,0 мкм. Для проверки препарата в первичной упаковке (ампулах или флаконах) используются системы, позволяющие выявлять механические включения в препарате, например, автоматическая система контроля нерастворимых механических включений в фармацевтических инъекционных препаратах KL-04 (RION, Япония), которая действует по принципу поглощения света и применяется для контроля инъекционных препаратов.

Сегодня фармацевтическая промышленность в достаточной степени обеспечена высокоэффективными линиями, соответствующими требованиям правил GMP. На мировом рынке данного оборудования заслуженное уваже-

ние вызывает продукция таких фирм как Cozzoli (США), Bosch (Германия), Штребель (Германия). Появляются аппараты-комбайны, программа которых достаточно гибко может перевести процесс с наполнения ампул на наполнение и герметизацию флаконов.

Ряд зарубежных производителей специализируется на оборудовании одного типа. Так, например, один из мировых лидеров в области фармацевтического оборудования FINN AQUA выпускает широко известные многоступенчатые дистилляторы для получения воды для инъекций пароконденсационным методом, отвечающие требованиям ряда международных фармакопей. Для контроля воды для инъекций в соответствии с действующими сегодня требованиями (ДФУ, EU Ph.) можно использовать анализатор общего органического углерода Aurora 1030 W 01 Analytical.

Кроме того, нельзя не отметить перспективность использования для разлива биологических препаратов изоляторной технологии, при которой полностью отсутствует контакт разливаемого препарата с внешней средой, включая и обслуживающий персонал. Далее, после наполнения и герметизации проводится контроль герметичности продукции, этикетировка и упаковка.

После разлива в ампулы или флаконы препарат подвергают контролю по тестам, приведенным в сертификате качества. Ряд производителей вводят в перечень регламентируемых показателей и другие тесты, например, подлинность (идентификация), осмолярность (от 291 до 337 мОсм/кг) и содержание эндотоксинов (не более 25,0 МЕ/мл). Так, в вакцине АКДС фирмы «INFANRIX» (GlaxoSmithKline Biological s.a., Бельгия), содержащей дифтерийный и столбнячный анатоксины, ацеллюлярный коклюшный компонент идентификацию проводят после десорбции с геля гидроокиси алюминия всех компонентов реакцией иммунопреципитации со специфическими антисыворотками к указанным антигенам (дифтерийный и столбнячный анатоксины) и с использованием метода ELISA для коклюшного антигена.

На рис. 6, согласно табл. 5, показана схема получения комбинированной вакцины АКДС.

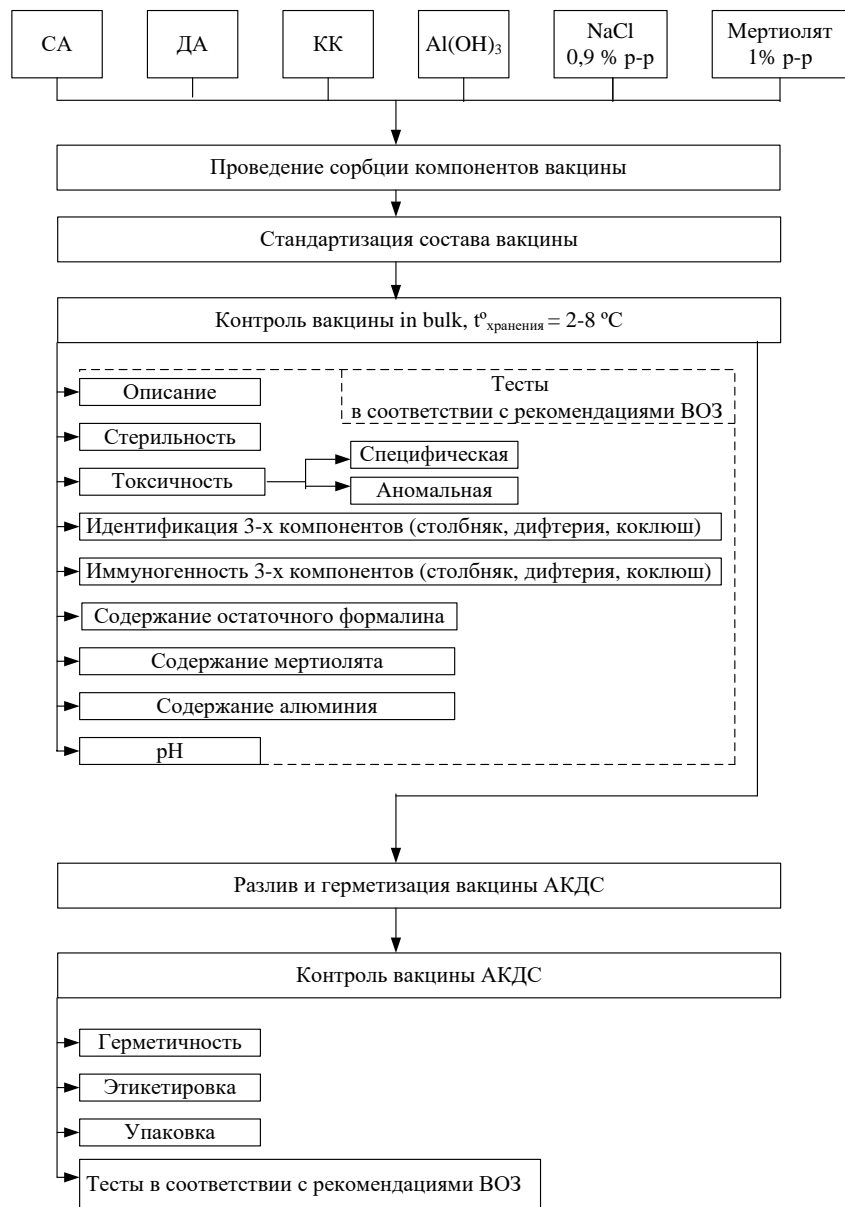


Рисунок 6 – Схема получения комбинированной вакцины АКДС

Рассматриваемые нами вакцины содержат анатоксины, полученные из токсинов, обработанных формалином. Химическая процедура получения анатоксинов имеет определенные недостатки, а именно, изменение защитных эпитопов, ведущее к снижению иммуногенности, и потенциальный возврат к биологически активному токсину. Сегодня получены генетически инактивированные токсины возбудителей столбняка, дифтерии, коклюша, сибирской язвы, синегнойной инфекции. Технология получения инактивированных токсинов сводится к следующему: делеция участка гена, кодирующего детоксичность; клонирование модифицированного гена; введение его в систему экспрессии; получение иммунного белка, лишённого токсичности. Для получения инактивированных токсинов создавалась мутация кодонов аминокислот, требуемых для биологической активности токсина (аденозиндифосфат (ADP) рибозилтрансфераза). Измененный ген заменил собой нативный ген в родительском организме, на основе которого затем был получен иммуногенный, но стабильно инактивированный токсин. Последующее клонирование и секвенирование одного из таких мутантных генов токсина выявило мутацию одной аминокислоты в ферментативно активном сайте (также ADP-рибозилтрансферазы). Генетически инактивированный дифтерийный токсин получен еще в конце XX века и известен под названием CRM-197. Продукт отличается от нативного токсина замещением C52 глицина глутаминовой кислотой. Для его полной детоксикации использовали 1 % формальдегид от количества, необходимого для инактивации нативного токсина. Полученный генетически инактивированный дифтерийный токсин CRM-197 рекомендован для использования в Hib-вакцине. В настоящее время АКДС-вакцина с генетически инактивированным коклюшным токсином используется в Италии. Основным преимуществом рекомбинантных токсинов является то, что они лишены потенциальной опасности реверсии.

#### 1.4.6. Туберкулез

В первые десятилетия XX века важнейшей попыткой создания живых вакцин была разработка вакцины против туберкулеза. Она известна как БЦЖ-бацилла Кальметта – Герена (BCG, Bacillus of Calmette – Guerin), по имени двух французских ученых, получивших ослабленный штамм туберкулезных бактерий. Вакцина была получена в течение 13 лет путем многократных серийных пассажей (231 последовательный пересев – in vitro) штамма

Micobacterium bovis. БЦЖ фактически была первой живой бактериальной вакциной, в широких масштабах примененной на человеке (её повсеместное внедрение было отсрочено трагическим происшествием в Германии, где партия вакцины оказалась зараженной). Опыт показал, что вакцины, приготовленные из этих ослабленных туберкулезных бацилл, совершенно безопасны, и с 1950 года в Великобритании и большинстве других стран начались широкие компании по иммунизации школьников. Сегодня иммунизация вакциной БЦЖ проводится у новорожденных на 3–7 день жизни внутривенно, ревакцинацию проводят детям в возрасте 7 и 14 лет (см. табл. 1). Ежегодно вакциной БЦЖ прививаются около 100 млн человек.

Вакцина БЦЖ представляет собой лиофилизированные живые микобактерии вакцинных штаммов, высушенные в стабилизаторе глутаминате натрия. В одной дозе 0,05 мг вакцины содержится  $1,5 \cdot 10^5$ – $6,0 \cdot 10^5$  живых микробных клеток. Всего зарегистрировано 16 субштаммов БЦЖ (известно более 30). Субштаммы различаются по морфологии клеток и колоний (от длинных палочек до кокковидных форм), остаточной вирулентности, иммуногенности, антигенному составу. Так, например, субштамм Токио172, полученный в Японии, характеризуется очень мелкими клетками, низкой остаточной вирулентностью, сниженной иммуногенностью и незначительной реактогенностью. Такие субштаммы принято называть «слабыми». «Сильные» субштаммы отличаются большей остаточной вирулентностью и высокой защитной способностью. В то же время эти штаммы более. Вакцины, изготовленные из «сильных» субштаммов, вызывают большой процент гнойных лимфаденитов при вакцинации.

Сегодня в Украине используют вакцину, произведенную в России, в которой применен субштамм БЦЖ (BCG – 1 Russia), содержащий 4 антигена, которые отсутствуют у большинства других субштаммов, занимающий при высокой иммуногенности среднее положение по остаточной вирулентности среди других субштаммов, то есть при высоких защитных свойствах вакцина обладает невысокой реактогенностью.

**Питательные среды.** Для культивирования микобактерий используют синтетические питательные среды, то есть среды с четко определенным химическим составом. Такие среды создаются на основе растворов неорганических солей, к которым добавляют необходимые источники углерода, азота, энергии. Наиболее широко используемая среда предложена французским

микробиологом Сотонам. В состав питательной среды входят: L-аспарагин от 4,0 до 4,54 г/л, лимонная кислота 2,0 г/л, калий фосфорнокислый двузамещенный 0,5 г/л, железо лимоннокислое аммиачное 0,05 г/л, магний сернокислый  $\times 7H_2O$ , стерилизация при 121 °С в течение 30 минут. Некоторые производители проводят стерилизующую фильтрацию через мембраны с размером пор 0,22 мкм.

Состав среды в значительной степени определяет качество конечного продукта – вакцины БЦЖ. Для подтверждения этого мы приведем пример выращивания микобактерий bovis бацилл Кальметта – Герена на средах с отличным составом. Микобактерии выращивали на двух составах сред: синтетической среде Сотона и модифицированной среде Сотона с добавлением растворимого крахмала (1 г/л) и бактериологического пептона (16,6 г/л). Затем выращенные микобактерии подвергали одинаковой обработке и стандартизации до одного содержания бактерий в 1 мл. Мышей иммунизировали полученными вакцинами БЦЖ из расчета 100 мкг на мыш. Через одинаковые сроки животных подвергали исследованию. Распределение микобактерий по тканям было одинаково. В то же время гуморальный ответ был значительно выше при использовании образцов вакцины, выращенных на модифицированной среде Сотона.

**Культивирование микобактерий и получение вакцины in bulk.** Выращивание микобактерий проводят на среде Сотона в специальных емкостях объемом 1–3 литра, позволяющих микобактериям расти в стационарном положении на поверхности питательной среды. Рост проводят при температуре 37–38 °С. Посев на жидкую среду производят пленкой культуры БЦЖ, выращенной на глицериновой среде с картофелем. Пленку помещают на поверхность жидкой среды Сотона осторожно, чтобы она не опустилась на дно. Посеянная таким образом культура достаточно быстро развивается и обычно к 7–9 дню образует тонкую пленку, поднимающуюся по стенкам емкости. Проводят еще два аналогичных посева. Культура микобактерий представляет собой пленку, находящуюся на поверхности питательной среды. Вакцина готовится из культуры не старше 16-дневного возраста. После окончания выращивания пленку переносят в асептических условиях в емкость, в которой находятся стерильные металлические шарики, промывают буфером от остатков питательной среды. Последнее является важным этапом, так как наличие в биомассе бактерий остатков глицерина снижает качество препарата и за-



трудняет процесс лиофильного высушивания. Емкость с пленкой помещают на шейкер, прибавляют стерильный 2,0 % раствор глутамината натрия и начинают встряхивание культуры микобактерий до получения гомогенной суспензии. *Производство вакцины БЦЖ*, таким образом, имеет ряд существенных недостатков, а именно: длительность технологического процесса, сложности в гомогенизации культуры микобактерий, разрушение бактериальных клеток микобактерий, что приводит к их гибели, а следовательно, и к снижению эффективности препарата. Кроме того, высоки трудозатраты и, как следствие, высокая цена вакцины БЦЖ. Последние годы для выращивания микобактерий предложены биореакторы небольшого объема, например, на 20 литров. Выращивание инокулята микобактерий проводят при  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  в течение 13 суток в стеклянных колбах, помещенных на роторный шейкер при 200 об/мин. Затем выращенную культуру переносят в реактор, представляющий собой цилиндрический сосуд из боросиликатного стекла. Реактор имеет диаметр 23 см, с пропеллерной мешалкой, находящейся на 15 см от дна. В реакторе находится питательная среда Сотона в объеме 12 литров, на поверхность которой со скоростью 15 л/час подается стерильный воздух. Мешалка работает со скоростью 840–1200 об/мин. При таких условиях рост микобактерий продолжается 164–170 часов при температуре  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ . Выращивание сопровождается контролем процесса культивирования: подсчет колоний на среде Левенштейна – Иенсена; определение содержания кислорода в среде; содержание азотистых соединений и глицерина; микроскопия культуры по Цилю – Нильсену. Полученные результаты демонстрируют значительно больший выход живых бактерий по сравнению со стационарным ростом; выращивание в реакторе позволяет уменьшить на 50 % содержание в среде Сотона L-аспаргина и на 26 % содержание глицерина; обнаружено также тормозящее действие на рост культуры бактерий Твина-80. Для лиофилизации было предложено значительное количество составов, которые должны были обеспечивать жизнеспособность микобактерий при сублимации, выполняя роль криопротекторов. В разные годы специалистами предлагались желатин и сахароза, лактоза, декстран и глюкоза и др. Однако сегодня наиболее эффективным признан глутаминат натрия в конечной концентрации 1,0–1,5 %. Для суспендирования конгломератов микобактерий используют либо механическое диспергирование, либо применение детергентов. При диспергировании оптимальна температура 4–10 °C.

Полученную и отмытую от питательной среды бактериальную массу суспендируют в 1,0–1,5 % растворе глутамината натрия и разливают шприцевым методом в ампулы по 10 доз (0,5 мг вакцины) или 20 доз (1,0 мг вакцины). Разлив вакцины должен производиться при постоянном перемешивании для получения гомогенной суспензии. В 1 мг вакцины может содержаться от 10 до 30 млн. жизнеспособных бактерий. Ампулы подвергают замораживанию при температуре минус 60–70 °C с последующей сублимацией. Время и режим высушивания устанавливают в зависимости от марок сублимационного оборудования, толщины слоя биомассы и других факторов. Полученный после лиофилизации препарат подвергают герметизации либо в вакууме, либо в атмосфере инертного газа. Хранение вакцины БЦЖ проводят при 2–8 °C. Сравнение протективных свойств препаратов, полученных в стационарных условиях и в биореакторах, показало их полную идентичность.

Процесс лиофилизации вакцин является определяющим при производстве живых вакцинных препаратов (вирусов и бактерий). *В основе лиофилизации лежит процесс сублимационного высушивания*, который состоит в том, что влага из замороженного состояния переходит в газообразное, минуя жидкую фазу.

*Преимуществом лиофилизации перед другими видами высушивания является максимальная сохранность биологического материала (выживаемость бактерий и вирусов); проведение процесса в условиях асептики; высушивание препарата в первичной упаковке (флаконы или ампулы) в точно дозированных количествах и герметизация этой упаковки в атмосфере вакуума или инертного газа.*

Процесс лиофилизации проходит в несколько технологических стадий:

1. *Предварительное замораживание* проводится при температуре ниже точки эвтектики самого низкотемпературного компонента высушиваемого препарата (*точкой эвтектики* называется температура, при которой вся жидкость переходит в твердую фазу – лед). При этом должна быть опытным путем подобрана скорость замораживания, при которой наблюдается минимальное травматическое воздействие на клетку образующихся кристаллов льда и электролитов. К отрицательному результату может приводить как более высокие температуры, так и более низкие (переохлаждение). Неполная заморозка препарата при начале вакуумной сушки приводит к снижению выживаемости микроорганизмов, вспениванию препарата, значительному

ухудшению растворимости при использовании. Это связано с тем, что внутри замороженной массы препарата остаются участки с незамороженной влагой. При этом присутствует механическое разрушение при кристаллизации, разрушение мембраны из-за резкого повышения концентрации соли, потери мембранного потенциала из-за разности концентраций внутри и вне клетки. На данном этапе необходимо изучение всех параметров предварительного замораживания: формы и объема первичной упаковки с учетом её основания, дозы разлитого препарата, его состава, как видов криопротекторов, так и содержания живых клеток в препарате. Последнее является существенным моментом, так как содержание живых клеток варьирует от серии к серии и требует специальных дополнительных исследований по подбору условий.

2. *Первичное высушивание.* На этом этапе температура препарата ниже 0 °С. Для живых вакцин эта температура в зависимости от состава препарата и криопротектора находится в пределах от минус 20 °С до минус 30 °С. В течение этого периода свободная вода в форме льда максимально удаляется из препарата, и его температура повышается до 0 °С. В камере сублимационной установки создают вакуум с целью обеспечения свободной диффузии паров жидкости от замороженной массы продукта к охлажденной поверхности конденсатора. При повышении вакуума интенсивность испарения возрастает. Длительность и параметры этого этапа определяется экспериментальным путем.

3. *Вторичное высушивание.* На этом этапе проходит удаление связанной воды. В конце этого периода температура препарата доходит до 25–40 °С и происходит удаление остаточного количества связанной воды (около 5–15 %), и остаточная влажность не должна превышать 3–5 %. Испарение влаги из материала при сушке связано с затратой определенной энергии, требуемой на разрыв молекулярных связей. Наличие энергии обеспечивается подводом тепла от нагревательных элементов, расположенных в полке сублиматора, на которой находится лиофилизируемый препарат. Находящаяся в полках силиконовая эмульсия обеспечивает постоянный и равномерный прогрев полок и препарата.

4. *Завершение процесса лиофилизации.* На этом этапе проводят укупорку и герметизацию флаконов или ампул. Флаконы, возможно, укупоривать непосредственно в камере сублиматора, либо в атмосфере инертного га-

за, либо в вакууме. При этом специальное устройство, находящееся в камере под давлением, укупоривает флаконы специальными пробками непосредственно в камере. В камеру сублиматора через стерилизующие фильтры возможна подача инертного газа.

Самостоятельным вопросом является *определение остаточного количества воды* в препаратах лиофилизированных вакцин. Вода в лиофилизированных вакцинах определяет сохранность иммунобиологических и физико-химических свойств препаратов в процессе хранения. Содержание остаточной воды проводят при помощи ряда сертифицированных методов:

- метод Бейкера при 60 °С в вакууме в течение установленного времени;
- метод Карла Фишера с использованием реактива Фишера амперометрическим титрованием;
- метод газовой хроматографии.

Содержание воды в препаратах регламентируется не более 2–3 %.

Необходимо остановиться на вопросе защитных веществ (криопротекторов), используемых в процессе сублимации для защиты мембран микроорганизмов от механических повреждений кристаллами льда. Сегодня для защиты вирусов и бактерий в процессе сублимации используются различные вещества, к которым предъявляются следующие требования: максимальное сохранение нативной структуры микроорганизмов; отсутствие антигенных, адъювантных, токсических и пирогенных свойств; совместимость с биологическим материалом; высокая растворимость после проведения процесса сублимирования. Преимущество отдано натуральным продуктам, легко растворимым в водных растворах, негигроскопичным, стабильным при хранении и экономически доступным. Сегодня наиболее часто для лиофилизации вакцинных препаратов используются гидролизованный желатин (температура замерзания «минус» (т.з.м.) 32 °С), сорбитол (т.з.м. 28 °С), глутаминат натрия (т.з.м. 58 °С), лактоза (т.з.м. 24 °С), сахароза (т.з.м. 33 °С) и ряд других. Наиболее часто используются комбинированные варианты криопротекторов.

Схема получения вакцины БЦЖ представлена на рис. 7.



Рисунок 7 – Схема получения вакцины БЦЖ

В настоящее время на мировом рынке оборудования для лиофилизации биологических препаратов, в частности, вакцин, присутствует значительное число фирм-производителей. Хорошо известны «Хох вакуум» серия «TG» (Германия); «Virtis» (США); «Эдвардс» (США); «LabCono», серия «FreeZone» (США); «Jouan» серия Heto, (Дания/Франция); «Clean Vac», «Niro-Atlas – Stord Denmark A/S» (Дания); «Партнер» (Москва) и другие.

Промышленные лиофильные сушилки выпускаются с объемом конденсатора от 10 до 500 литров. При изготовлении лиофилизаторов используется высококачественная сталь AISI 316 L. Температура конденсатора составляет от минус 60 °C до минус 85 °C. Например, при использовании оборудования «Clean Vac» для лиофилизации вакцин во флаконах диаметром 23 мм возможно лиофилизировать от 1000 до 25000 флаконов в зависимости от марки аппарата.

Сегодня можно сформулировать *основные требования для сублиматоров вирусных и бактериальных вакцин:*

1. Все необходимые данные о работе сублимационной сушилки должны быть выведены на двухсторонний дисплей, а информация о температуре и давлении отображается в виде информативных и наглядных графиков.
2. Аппараты должны соединяться с компьютером или самописцем через интерфейс.
3. Во всех системах охлаждения аппаратов желательно использование хладагентов, не содержащих фреонов.
4. Необходима возможность укупорки флаконов в камере в вакууме или атмосфере инертного газа.
5. Полное использование поверхности конденсатора, что должно обеспечить высокую производительность аппарата.
6. Возможность изменения конфигурации за счет сдвижения полок (увеличение или уменьшение между полочного расстояния).
7. Наличие в установке системы стерилизации камеры (термическая либо газовая обработка).

8. Желателен изолирующий кран между камерой и конденсатором, позволяющий определить окончание высушивания и независимо разделить камеру и конденсатор.

9. Температура полок регулируется жидким силиконом, что гарантирует точное регулирование и однородное распределение температуры.

10. Система датчиков всех производственных параметров.

11. Микропроцессорный контроль с цифровой индикацией параметров давления и температуры, а также возможность регуляции давления воздушного потока и автоматическое открытие переходного клапана по показателям температуры.

12. Аппараты должны быть оснащены системами стерилизации паром или химической стерилизации – системой SIP (sterilization in place) и системой CIP (cleaning in place) для обеспечения высокого качества очистки и стерилизации.

**Контроль готового препарата.** Каждый производитель БЦЖ-вакцины при контроле препарата руководствуется рекомендациями ВОЗ. В то же время, существуют отличия, как в объеме проводимого контроля, так и в используемых методах.

Для подтверждения этого положения, в табл. 6 приводятся требования к вакцине двух производителей, зарегистрированных в Украине:

✓ Национальный центра инфекционных и паразитических болезней, Болгария (1);

✓ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Россия (2).

Таблица 6 – Требования к вакцинам БЦЖ

Наименование показателей контроля	Производитель (1)	Производитель (2)
1	2	3
Описание	Пористая порошкообразная масса желто-белого цвета	Пористая порошкообразная масса, от белого до светло-розового цвета
Подлинность	При микроскопии мазков, окрашенных по Цилю-Нильсену, вакцина должна состоять из окрашенных в красный цвет тонких прямых или слегка изогнутых палочек длиной 1–4 мкм и шириной 0,3–0,5 мкм, кот. часто им. небольшие вздутия на концах, не образуют спор и капсул, кислотостойких и грамположительных. При посеве вакцины на среду Левенштейна-Йенсена через 28–30 сут. на поверхности должны образовываться характерного вида колонии кремового цвета со сморщен. поверхностью, тонкими неров. краями, размер. от 0,5 до 8,0 мм в диаметре.	При микроскопии мазков, окрашенных по Цилю-Нильсену, вакцина должна состоять из окрашенных в красный цвет тонких прямых или слегка изогнутых палочек длиной 1–4 мкм и шириной 0,3–0,5 мкм, которые часто имеют вздутия на концах. При посеве вакцины на среду Левенштейна-Йенсена через 28-30 суток на поверхности должны образовываться характерного вида колонии кремового цвета со сморщенной поверхностью, тонкими неровными краями, размером от 0,5 до 8,0 мм в диаметре.
Стерильность	Стерильно	Стерильно
Аномальная токсичность	Нетоксичен при введении мышам 0,25 мг препарата (5 человек. доз) в 0,5 мл – подкожно.	Нетоксичен при введении мышам 0,25 мг препарата (5 человек. доз) в 0,5 мл – подкожно.
Прозрачность	При добавлении в ампулу с вакциной 2 мл растворителя и 2–3 разового встряхивания препарат должен иметь вид мутной суспензии желтоватого цвета.	При добав. в ампулу с вакциной 2 мл растворителя и 2–3 разового встряхивания препарат должен полностью растворяться за 1 мин и иметь вид мутной суспензии желтоватого цвета.

Продолжение таблицы 6

1	2	3
Однородность	Индекс дисперсности не менее 0,85	Индекс дисперсности не менее 1,5
Пирогенность	Апирогенный	–
pH	5,0–7,0	–
Общее содержание бактерий	Не меньше (0,4 + 0,05) при длине волны 490 нм.	Не меньше (0,32–0,38) при длине волны 490 нм.
Специфическая активность	1,5–6,5 млн. жизнеспособных бактерий в (1,0 + 0,01) мг вакцины	От 10 до 30 млн. жизнеспособных бактерий в 1 мг вакцины
Термостабильность	Стабильность не менее 20 %	Стабильность не менее 25 %
Потеря в массе при высушивании	Не более 2,0 %	Не более 2,0 %
Специфическая безвредность	Препарат должен быть безвредным	Препарат должен быть безвредным

Для объективной оценки качества вакцины **БЦЖ** целесообразно привести специфичные методы контроля препарата, используемые только для контроля данной вакцины:

1. *Специфическая безвредность.*

1.1. Отсутствие вирулентных микобактерий.

Контроль проводят на двух морских свинках одного пола массой 250–300 г. Каждому животному вводят 5 мг вакцины в 1 мл растворителя подкожно во внутреннюю поверхность правого бедра. Наблюдения за животными проводят на протяжении не менее 12 недель. Животные должны оставаться здоровыми, а масса их тела должна увеличиваться. После окончания срока наблюдения животных усыпляют эфирным наркозом. При проведении аутопсии в лимфоузлах и внутренних органах животных не должно быть макроскопических признаков прогрессирующей туберкулезной инфекции. Животных, погибших до конца срока наблюдения, также вскрывают и исследуют, контроль повторяют. Если у животных обнаруживают признаки прогрессирующей туберкулезной инфекции, серию бракуют, выпуск последующих серий прекращают, а все запасы вакцин хранят до выявления причин появления вирулентности.

1.2. Кожная реактогенность.

Поствакцинальную местную реакцию проверяют на четырех морских свинках одного пола, массой 250–300 г. В заранее депиллированную боковую поверхность тела животных вводят внутрикожно три разведения вакцины, которые содержат 0,1; 0,01 и 0,001 мг БЦЖ в 0,1 мл раствора натрия хлорида изотонического 0,9 % для инъекций, а в другую – такие же разведения национального или рабочего референс-препарата вакцины БЦЖ, которая аттестована государственным органом контроля. Размеры местных прививочных реакций регистрируют еженедельно на протяжении 4-х недель. Измеряют средние размеры реакции на каждый препарат. Отличия между средними реакциями на аналогичные дозы исследуемой серии и референс-препарата не должны превышать 1 мм ( $p > 0,95$ ).

2. *Термостабильность.*

Образец вакцины выдерживают в термостате при температуре  $37 \pm 0,5$  °C в течение 28 дней. Процентное уменьшение культуральных клеток образца определяется путем сравнения количества культуральных клеток испытуемого образца и образца, который хранился при температуре 2–8 °C (эталонный препарат).

Количество живых микробных клеток после термостатирования должно быть не меньшим, чем 20 % от количества живых микробных клеток в эталонном препарате.

3. *Специфическая активность* – количество жизнеспособных бактерий.

Определение проводят путем разведения препарата: 1:40000; 1:80000; 1:160000. Указанные разведения высевают на скошенную среду Левенштейна – Йенсена по 0,1 мл и культивируют при температуре  $(38 \pm 1)$  °C в течение четырех недель. Затем осуществляют подсчет живых микобактерий по известным формулам.

**Целесообразность использования вакцины БЦЖ.** Использование вакцины БЦЖ наиболее эффективно в раннем детском возрасте, так как снижает риск тяжелой формы туберкулеза у детей. Применение вакцины у подростков и взрослого населения с целью предотвращения легочного туберкулеза малоэффективно, так как не создает долгосрочного иммунитета. Ежегодно от туберкулеза в мире погибает до 2 млн человек. Эффективность классической вакцины БЦЖ постоянно обсуждается специалистами, так как только в 5 %

смертельных исходов удается избежать с помощью вакцинации. Это заставляет специалистов вести исследования по созданию высокоэффективных вакцин для профилактики туберкулеза. Исследования проводятся по нескольким направлениям. Ведущие производители вакцин фирма «Sanofi Aventis» и Государственный институт вакцин в Дании объединились в 2008 году для создания вакцины, в которой антигены будут представлены рекомбинантными белковыми субъединицами бактерий БЦЖ. Недавние научные открытия, такие, как полное картирование генетической последовательности нескольких видов микобактерий, включая лабораторные штаммы, увеличивает вероятность создания новых эффективных противотуберкулезных вакцин. Сегодня в мировых исследовательских лабораториях разрабатывается около 200 вакцин типа БЦЖ, находящихся на разных стадиях лабораторных испытаний: цельно-клеточные (аттенуированные и векторные), субъединичные, ДНК-вакцины, пептидные.

Аттенуированные вакцины получают преимущественно из *M. Tuberculosis*, которые в результате мутации становятся более безопасными и более иммуногенными по сравнению со штаммами микобактерий и даже вакциной БЦЖ.

Рекомбинантные вакцины БЦЖ основаны на изменении определенных участков генома бактерий. Например, одна из вакцин представляет собой живой рекомбинантный штамм БЦЖ, образующий большое количество белка с молекулярной массой 30 кДа, проходит в настоящее время клинические испытания. В Германии исследователями из института инфекционной биологии им. М. Планка создана новая рекомбинантная вакцина с использованием генно-инженерной технологии. Ими получен генно-инженерный штамм БЦЖ, способный производить белок листериолизин (Hly), выделяемый листериями (*L. Monocytogenes*). Листериолизин способствует образованию отверстий в фагосомальной мембране и проникает в фагосому, где находится *M. Tuberculosis*. Кроме того, из БЦЖ был удален ген уреазы C, который в норме нейтрализует кислотность фагосомы, тем самым для листериолизина были созданы оптимальные условия окружающей среды. В культуральном фильтрате *M. Tuberculosis* обнаруживается ранний секреторный антиген ESAT-6 с молекулярной массой 6 кДа. Данный белок кодируется RD1 *M. Tuberculosis*, утраченной в процессе длительного культивирования в вакцинном штамме БЦЖ. Результаты доклинических исследований протективных

свойств антигена ESAT-6 в виде пептидных и ДНК вакцин, а также в составе бактериальных векторов на основе БЦЖ и *S. Typhimurium* показали, что вследствие недостаточной иммуногенности белка ESAT-6 формирование защитного эффекта иммунизации определяется способом его введения и дозировки в организм.

Субъединичные вакцины состоят из очищенного белка и адъювантов. Кроме антигена ESAT-6 в субъединичных вакцинах предложено использовать и другие очищенные белки 85B и 85A. Обнадёживающие результаты получены при создании гриппозных векторов, экспрессирующих антиген ESAT-6. Получение аттенуированных рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующий ранний секреторный микобактериальный антиген ESAT-6 в модельных экспериментах по заражению мышей туберкулезной инфекцией (2-х кратная интраназальная иммунизация), продемонстрировало лучший защитный эффект по сравнению с классической БЦЖ-вакциной.

*К преимуществам гриппозных векторов при получении противотуберкулезных вакцин можно отнести:* 1) отсутствие ДНК стадии в репликативном цикле вируса, исключающей хромосомную интеграцию вирусного генома; 2) формирование выраженного клеточного и гуморального ответа на системном уровне и во входных воротах инфекции; 3) существование множества антигенных подтипов вируса гриппа, что дает возможность проводить повторные иммунизации для достижения максимального профилактического или лечебного эффекта; 4) доказанная безопасность живых гриппозных вакцин.

Многообещающими являются результаты совместных исследований двух мировых лидеров в производстве вакцин Crucell и Aeras, создавших вакцину для профилактики туберкулеза AdVac (r), прошедшую несколько этапов клинических испытаний. В качестве вектора используют аденовирус типа 5 или 35, в который включен генетический материал микобактерий туберкулеза. Установлено, что иммунная реакция CD8 Т-клеток значительно выше, чем при испытании других вакцин против туберкулеза.

Новым направлением, возникшим в последние годы, является использование аэрозольных вакцин. Вакцины получают путем обработки живых вакцин в спрей-сушке (spray-drying) кратковременным действием высокой температуры. При этом используют ряд компонентов защищающих микобактерии, например, глицерин, различные соли, аминокислоты. Выживает около

50 % бактерий. В то же время аэрозольные вакцины на животных продемонстрировали большую эффективность, чем традиционные вакцины. Кроме того, ряд исследователей считает аэрозольный путь введения для микобактерий более традиционным. Морских свинок прививали аэрозольной и инъекционной вакцинами. Затем заражали микобактериями туберкулеза. При использовании аэрозольной вакцины, полученной методом спрей-высушивания, обнаружено менее 1 % пораженных легких и селезенки, в то время как при исследовании животных иммунизированных инъекционным путем выявлено 5 % поражения легочной ткани и 10 % поражения селезенки микобактериями.

Одним из направлений повышения иммуногенности вакцины БЦЖ является введение в вакцину иммуностимуляторов. Так, введение животным вакцины БЦЖ совместно с поликатионными полипептидами, например, с поли-L-аргинином (содержащих 60 аргининовых остатков – PR60), приводило к повышению иммуногенности вакцины и более высокому протективному эффекту у мышей. Аналогичный эффект вызывало совместное введение мышам вакцины БЦЖ и PPD RT 49, представляющего собой дериват туберкулина, выделенного из культуральной жидкости растущих микобактерий на среде Сотона.

Предложены вакцины против туберкулеза, в форме искусственных микобактериальных частиц, представляющих собой комплекс величиной 10–25 нм. В центре «ядра» полинуклеотидного комплекса находится двухспиральная РНК дрожжей штамма *Saccharomyces cerevisiae* M437 Y 116, связанная с активированным полисахаридом и белками микобактерий, выделенными из культуры БЦЖ. Мышей иммунизировали данным комплексом внутримышечно трехкратно с интервалом 2 недели. По это же схеме мышам иммунизировали традиционной вакциной БЦЖ. По сравнению с вакциной БЦЖ комплекс приводил к увеличению синтеза антител против антигенов микобактерий. Авторы предлагают использование созданной ими конструкции для вакцинации против туберкулезной инфекции.

Российскими учеными предложена вакцина на основе гликопептида, выделенного из микобактерий туберкулеза (БЦЖ) с помощью детергента тритона X-100, конъюгированного с адьювантом полиоксидонием. Изучение данного препарата продемонстрировало отсутствие алергизирующего, анафилактического, канцерогенного и тератогенного действия. Протективные свойства вакцины изучали путем введения препарата (100 мкг антигена и

1 мг полиоксидония). Через 3 недели животных заражали вирулентным штаммом M. Human H. 37 Rv в дозе  $2-5 \cdot 10^5$  бактерий. Препарат продемонстрировал высокие протективные свойства.

Таким образом, вакцина БЦЖ, используемая сегодня для профилактики туберкулеза, проявляет алергизирующие свойства, остаточную вирулентность и, самое важное, недостаточную эффективность для борьбы с заболеваемостью туберкулезом. Как видно из приведенных данных, ведутся многочисленные исследования по получению препаратов из микобактерий, обладающих протективными свойствами. Предлагаемые субъединичные вакцины содержали белковые, гликопротеидные, полисахаридные. Использовали ДНК вакцины и модифицированные вакцины БЦЖ, у которых в качестве «эндогенных» адьювантов, усиливающих эффективность вакцинации, были использованы гены, которые кодируют молекулы цитокинов, рекомбинантные вакцины. В качестве адьювантов использовали сапонины, масляные композиции, липосомы и липидные фракции микобактерий.

Приведенные данные дают обоснованную уверенность в создании противотуберкулезной вакцины уже в ближайшие годы, так как уже сегодня проводятся клинические испытания пяти вакцин – кандидатов.

#### *1.4.7. Гемофильная b-инфекция*

Ряд грамотрицательных и грамположительных бактерий образуют капсульную структуру, содержащую полисахариды. Способность бактерий к образованию капсул в значительной степени определяет взаимодействие между бактериальными клетками и организмом хозяина при развитии инфекционного процесса. Капсульные антигены играют важную роль в вирулентности и иммуногенности бактерий. Имеется зависимость между наличием у бактерий капсулы и их токсичностью. Установлено, что гемолитическая активность также свойственна преимущественно капсульным формам бактерий. Капсульные антигены способны подавлять фагоцитоз бактерий и создавать условия для размножения возбудителей инфекции в организме хозяина. Капсульные полисахариды несут в себе основную серологическую антигенность бактериальных видов и успешно взаимодействуют с антителами к данным бактериям. Такие полисахариды представляют собой эффективные вакцинные антигены. В качестве примера использования полисахаридных вакцин можно

привести препарат, содержащий очищенные капсульные полисахариды *Streptococcus pneumoniae* (Pneumo 23 – PPV 23). Вакцина поливалентна и содержит полисахариды из 23 серотипов бактерий. Вакцина PPV 23 (Sanofi Pasteur) эффективна против 90 % нечувствительных к пенициллину пневмококков и 96 % пневмококков, вызывающих заболевания. В некоторых случаях для конкретного патогенного организма имеется единственный серотип полисахарида, например, *Haemophilus influenzae* типа b (Hib) против инвазивного менингита *H. Influenzae* типа b. В этом случае можно создать моновалентную вакцину. Однако в большинстве случаев имеют место многочисленные серотипы капсульных полисахаридов (около 90 для *Streptococcus pneumoniae*), и такие вакцины должны быть мультивалентными, чтобы обладать достаточно высоким уровнем общей эффективности. Эти вакцины первого поколения были просто очищенными полисахаридами и обладали низкими протективными свойствами.

Гемофильная инфекция (возбудитель – Hib) является основной причиной гнойного менингита у детей до двух лет жизни, который часто приводит к серьезным неврологическим осложнениям и летальным исходам. Кроме менингита, *Haemophilus influenzae* b вызывает перикардиты, эндокардиты, перитониты и другие гнойно-септические заболевания. Заражение происходит воздушно-капельным путем. По данным ВОЗ, ежегодно от данных инфекций умирает около 500000 детей во всех странах мира.

Первая лицензированная вакцина *Haemophilus influenzae* b (Hib) содержала полирибосилрибатолфосфат (PRP), полисахарид капсулы микроорганизма. Однако полисахаридная вакцина была недостаточно иммуногенна для детей младше 2 лет. В связи с этим она была разрешена к использованию только для детей старше 18 месяцев. Изучение в Финляндии (1977 г.) подтвердило значительное снижение Hib-заболеваний и эффективность PRP-вакцины в 90 % случаев. В то же время изучение вакцины в США показало её менее надежную эффективность. В результате этих исследований и существенной потребности иметь вакцину для малолетних детей начались разработки по созданию конъюгированных вакцин. Такие конъюгированные вакцины, в которых Hib-полисахарид связан с белком, обладают рядом преимуществ: индуцируют высокие титры антител; более иммуногенны для малолетних детей; демонстрируют высокий иммунный ответ при ревакцинации.

В 1989 году было разрешено к использованию у детей младше 18 месяцев четыре конъюгированных вакцины:

- PRP-D – содержала полисахарид, конъюгированный с дифтерийным анатоксином;
- HbOC – содержала полисахарид, конъюгированный с нетоксичным мутантным дифтерийным токсином, известным как CRV 197;
- PRP-OMR – содержала полисахарид, конъюгированный с белком наружной мембраны *Neisseria meningitidis*;
- PRP-T – содержала полисахарид, конъюгированный со столбнячным анатоксином.

Доза каждой вакцины составляет 0,5 мл.

Как видно из табл. 7, вакцины содержат различное количество полисахарида и конъюгированного белка, причем соотношение полисахарида к белку значительно отличаются.

Таблица 7 – Состав вакцины *Haemophilus influenzae* b (Hib)

№	Название вакцины	Количество полисахарида в 1 дозе, мкг	Название протеина	Количество протеина в 1 дозе, мкг	Соотношение полисахарид – протеин
1	PRP-D	25	Анатоксин дифтерийный	18	1,38
2	HbOC	10	Анатоксин дифтерийный	25	0,4
3	PRP-OMR	7,5	<i>Neisseria meningitidis</i>	125	0,06
4	PRP-T	10	Анатоксин столбнячный	20	0,5

Изучение иммуногенных свойств четырех вакцин в процессе трех иммунизаций продемонстрировало существенные отличия в продукции антител, что отобразено в табл. 8.



Таблица 8 – Иммунный ответ на конъюгированные вакцины

Состав вакцин	Количество привитых детей	Титр антител, мкг/мл			После 3-х прививок
		1-е введение	2-е введение	3-е введение	
PRP-D	62	0,07	0,08	0,28	29 %
НЬОС	61	0,07	0,13	3,08	75 %
PRP-OMR	64	0,11	0,84	1,14	55 %
PRP-T	65	0,1	0,3	3,64	83 %

Структура капсульного полисахарида, играющего важную роль в вирулентности бактерии *Haemophilus influenzae*, установлена как 3-B-D-рибофунарозил (1-1)-D-рибитол-5-фосфат.

Технологическая схема получения вакцины против *Haemophilus influenzae* b (НЬb) сводится к следующему:

1. *Подготовка штамма бактерий Haemophilus influenzae, приготовление питательных сред.* Штаммы *Haemophilus influenzae* по морфологии неподвижные микробы, грамтрицательные, в форме палочки (размер 0,5 x 1,0 мкм), располагающиеся в мазках отдельно или парами, без признака полиморфизма. Не образует спор. Подразделяется на виды: образующий капсулы и не образующий. Аэроб. На плотных средах колонии выпуклые, круглые, с ровными краями, полупрозрачные, диаметром около 0,5–0,8 мм для 24 часовой культуры и 1,0–1,5 мм для 48 часовой. Оптимум культивирования бактерий при pH 7,2–7,4 и температуре (37 ± 0,5) °C. Выращивают на модифицированной среде Mueller – Hinton с добавлением гемина (или другие порфирины) и никотинамид-аденин-динуклеотида. Капсулосодержащие бактерии гетерогенны по полисахаридному компоненту и представлены 6-тью типами: a, b, c, d, e, f.

Для выращивания штамма бактерий *Haemophilus influenzae*, например, 20752, используют *полусинтетические жидкие питательные среды*, содержащие (г/л): NaCl – 5,8; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 1; MgCl<sub>2</sub> – 0,2; CaCl<sub>2</sub> – 0,022; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 2,7; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 3,5; глюкоза – 5; тиамин – 0,004; пантотенат кальция – 0,004; KCl – 0,09; NH<sub>4</sub>Cl – 1,25; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,6. Возможно использование в составе среды экстракта пекарских дрожжей с белковыми компонентами не бо-

лее 30 кДа в количестве 10 г/л. Обязательными компонентами среды являются: гемин – 0,005–0,01 г/л (C<sub>4</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub>FeCl) и никотинамидадениннуклеотид – 0,002–0,004 г/л (выполняет функцию переносчика атомов водорода и участвует в образовании АТФ в аэробном метаболизме), которые являются факторами роста. Особая роль в питательной среде принадлежит гемину. Последнее связано с тем, что НЬb не способна синтезировать гемм, который необходим бактерии для синтеза цитохромов, а поступление гемма опосредованно обеспечивает как патогенность бактерий, так и полноценность антигенного состава. У гемофильных бактерий существует несколько комплексов для извлечения гемма из окружающих белков. В комплекс входит белок, закрепленный на наружной мембране (57 кДа) и два мембранных белка: порин (32 кДа) и белок с молекулярной массой 29 кДа. В качестве источника аминокислот и нуклеотидов применяют ферментативные гидролизаты тканей или крови. Однако большинство исследователей возражает против применения животных продуктов. Так как глутаминовая кислота, аргинин и аспаргиновая кислота крайне важны для роста бактерий, предложено добавлять их в состав питательной среды (причем не столько их количество, как их соотношение определяет биосинтез клеткой капсульного полисахарида), pH среды устанавливают 7,0–7,4. Оптимальным вариантом является стерилизующая фильтрация питательной среды через мембраны с размером пор 0,22 мкм. Допускается стерилизация солей при 1 атм в течение 30 минут.

2. *Культивирование штамма.* Культивирование бактерий проводят в реакторе при температуре 35–37 °C при постоянном перемешивании (200 об/мин) не более 16–17 часов. Рядом авторов предложено в процессе культивирования постепенно увеличивать скорость перемешивания с 200 об/мин до 700 об/мин. Культивирование желательно проводить при поддержании в процессе логарифмической фазы постоянной величины pH – 6,8–7,2, проводя коррекцию раствором хлористоводородной кислоты. Последнее вызвано фактом увеличения величины pH через 5–7 часов после начала культивирования. Необходимо оптимизировать нарастание биомассы, так как при возрастании количества бактериальных клеток уменьшается количество синтезируемого капсульного полисахарида. Возможно использование до 5 % CO<sub>2</sub>. Необходимо внимательно контролировать наличие лизиса бактерий, приводящего к загрязнению культуральной среды. Прекращение процесса культивирования лучше проводить охлаждением биореактора до

температуры не выше 15 °С. Выход полисахарида находится в пределах от 30 мг до 50 мг с одного литра питательной среды. Ряд авторов предлагают подачу кислорода со скоростью 5 л в минуту, при этом выход полисахарида может достигать 300 мг на литр питательной среды. Интерес представляют данные о возможности использования в составе среды соевого пептона, полученного путем ферментативного гидролиза папаином, экстракта дрожжей и увеличенного количества гемина (30 мг/л) и никотинамидадениннуклеотида (15 мг/л). В этом случае выход полисахарида может составить около 980 мг на один литр. Одним из методов выделения полисахарида является добавление в реактор формалина до конечной концентрации 1 % и выдерживание смеси при 37 °С в течение 16–24 часов при перемешивании. Предлагается также добавление формалина до конечной концентрации 0,1–0,3 % и выдерживание при температуре 2–8 °С в течение 12–16 часов. За этот период отделяется связанный с клетками капсульный полисахарид. Затем смесь пускают на центрифугу при температуре 2–6 °С и отделяют (при 5000 об/мин в течение 30 минут) бактериальные клетки от среды, содержащей полисахарид. Крайне важным на этом этапе является получение супернатанта без признаков лизиса бактериальных клеток. В противном случае очистка полисахарида усложняется. За количеством микробных клеток наблюдают, измеряя оптическую плотность при 590 нм. Снижение оптической плотности в процессе культивирования свидетельствует о начавшемся лизисе клеток бактерий. Специфический антиген – полирибосил-рибитол-фосфат Hib (PRP) в культуре определяют методом латекс-агглютинации с помощью коммерческого диагностикума «Pastorex» (Sanofi. Bio-Rad, Франция). Молекулярная масса полисахарида составляет 700–800 кДа.

3. *Выделение и очистка полисахарида.* Полученный супернатант, содержащий капсульный полисахарид, подвергают диафильтрации на мембране с порогом отделения 100 кДа против фосфатного буфера. Концентрирование раствора проводят в 10–20 раз при температуре 2–8 °С. Выделение полисахаридов проводят спиртовым осаждением с использованием детергентов. Все осаждения спиртом проводят при температуре 4–8 °С. Полученный концентрированный раствор капсульных полисахаридов обрабатывают 2–3 объемами этанола. Выпавший осадок неочищенных полисахаридов отделяют центрифугированием при температуре 4–8 °С, осадок растворяют в воде для инъекций и раствор очищают диафильтрацией. К полученному раствору

прибавляют этанол, и образовавшийся осадок отделяют центрифугированием. Осадок полисахаридов обрабатывают повторно этанолом до конечной концентрации спирта 60–74 %. В процессе очистки используют катионный детергент Цетавион (гексадецилтриметиламмония бромид) в концентрации до 1,0 % и анионный детергент натрия дезоксихолат в концентрации до 1,0 %. Депенеримизацию полисахарида можно проводить несколькими методами: ультразвуковой обработкой, кислотным или щелочным гидролизом. Максимальный выход можно получить при щелочном гидролизе в 0,4 М бикарбонат-карбонатном буфере (рН 10,5) при комнатной температуре или при 2–8 °С, что является предпочтительней. Раствор полисахарида охлаждается, например, до температуры 4 °С и смешивается с равным объемом 0,4 М раствора бикарбонат-карбонатного буфера, охлажденного до 4 °С. Смесь выдерживается при указанной температуре в течение 90 минут при интенсивном перемешивании (400 об/мин).

#### 4. *Контроль выделенного полисахарида:*

- идентификация полисахарида иммунологическими методами, с использованием специфических антител и ИИ или 13С ЯМР спектроскопия;
- молекулярно-массовое распределение путем проведения гель-фильтрации, молекулярная масса около 300 кДа;
- определение состава полисахарида – содержание рибозы не менее чем 32 % от сухого веса;
- содержание полисахарида методом определения пентозы, используя D-рибозу в качестве стандарта или альтернативным методом анионно-обменной хроматографии с амперометрической детекцией (HPLC-PAD);
- определение фосфора по методу Chen: теоретически фосфора должно быть около 8,4 %, в спецификациях указывают от 6,8 до 9,0 % в пересчете на сухое вещество;
- содержание белка не более 1,0 % (определение методом Lowry) в пересчете на сухое вещество;
- содержание нуклеиновых кислот не более 1,0 % (определение УФ-спектроскопией) в пересчете на сухое вещество;
- эндотоксины – не более чем 10 МЕ на 1 мкг полисахарида или альтернативный метод – пирогенность (1 мкг полисахарида на 1 кг массы животного).

#### 5. *Контроль белкового компонента:*

- фракционный состав методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом;

- определение токсичности;
- аминокислотный анализ;
- аминокислотная последовательность;
- пептидное картирование;
- масс-спектрокопия;
- круговой дихроизм;
- флуоресцентная спектрокопия.

Требования к степени очистки белков:

1) анатоксины дифтерийный и столбнячный должны содержать не менее 1500 LF/мг белковый азот (LF – Limit of flocculation). Необходимо также проводить контроль аминокислот, таких, как лизин, часто добавляемых в процессе детоксикации для предотвращения реверсии;

2) CRM 197 – нетоксичный мутант дифтерийного токсина, изолированный из культуры *Corynebacterium diphtheriat* C7/B197, должен содержать белка более 90 % (определение методом HPLC);

3) белок из *Neisseria meningitides* должен содержать после очистки не более 8,0 % полисахаридов в пересчете на сухое вещество, быть апирогенным при дозе 0,25 мкг на 1 кг массы животного.

6. *Получение конъюгата полисахарида с белком.*

6.1. Модификация молекулы полисахарида.

К охлажденному до 4 °С полисахариду в 0,005 фосфатном буфере с рН 7,2 и концентрацией 5 мг/мл прибавляют 1 М NaOH до рН 10,5. К этому раствору добавляют 0,21 ммоль раствор бромциана (CNBr), растворенного в N,N-диметилформамиде. Раствор выдерживают при рН 10,5 в течение 6 минут, а затем рН доводят до 7,2, используя 1 М HCl. К раствору добавляют 2,1 ммоль раствор диаминобутана в дистиллированной воде и инкубируют в течение 45 минут при комнатной температуре (рН – 7,2). После инкубации смесь диализуют против дистиллированной воды. Диализат концентрируют и очищают от реагентов ультрафильтрацией. Концентрат высушивают в вакууме, получая модифицированный полисахарид.

6.2. Получение преципитата модифицированного полисахарида.

Модифицированный полисахарид (1 часть) растворяют в 0,1 М этилморфолиновом буфере с рН 8,5 и смешивают с 2,7 частями (0,26 ммоль

N-гидроксисукцинимидного эфира S-ацетилтиогликолевой кислоты, растворенной в N,N-диметилацетамиде (SATA). Можно для этой реакции использовать глутаровый альдегид. Так, например, спейсер, содержащий олигосахарид Hib, был непосредственно конъюгирован с производным столбнячного анатоксина с помощью глутарового альдегида. После 1 часа инкубации при комнатной температуре реакцию останавливают добавлением уксусной кислоты. Полученный преципитат SATA-модифицированного полисахарида сушат в вакууме. Растворяют сухой преципитат в воде, а затем очищают ультрафильтрацией.

6.3. Получение комплекса бромацетила столбнячного анатоксина.

Смешивают 0,04 М раствор N-сукцинимидил бромацетата (1 часть), растворенного в N,N-диметилацетамиде с раствором столбнячного анатоксина (1,7 части) в 0,1 М фосфатном буфере с рН 8,0. После 1,5 часа проведения реакции при комнатной температуре смесь подвергают ультрафильтрации, и концентрат разводят в 0,1 М фосфатном буфере, содержащем 5 ммоль ЭДТА с рН 7,5.

6.4. Конъюгирование полисахарида и столбнячного анатоксина.

Добавляют раствор бромацетилата столбнячного анатоксина к SATA-модифицированному полисахариду. В зависимости от необходимого соотношения «белок : полисахарид» прибавляют рассчитанное количество компонентов. Так, например, при соотношении 0,25 : 1 («полисахарид : белок») на 1 часть преципитата полисахарида добавляют 1,7 частей бромацетилата анатоксина в 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,5, содержащего 5 мМ ЭДТА, и инкубируют с 2М раствором гидроксиламина, также растворенного в 0,1 М фосфатном буфере с рН 7,5, содержащего 5 мМ ЭДТА. Через 43 часа инкубации при комнатной температуре блокируют остатки бромацетильных групп добавлением 2-аминоэтанола в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 5 мМ ЭДТА. Затем смесь выдерживают в течение 6 часов.

6.5. Очистка конъюгата полисахарид-белкового комплекса.

Полученный раствор подвергают ультрафильтрации, уравнивают фосфатным буфером и приступают к фракционированию конъюгата гель-проникающей хроматографией – ВЭЖХ. Очистку можно проводить на Sepharose CL-4B с элюированием фосфатным буфером (0,1 М, рН 7,0) с ЭДТА (0,005 М). Фракции, содержащие конъюгированный полисахарид-белковый комплекс, объединяют и используют для получения Hib-вакцины.

Следует отметить, что каждая из указанных реакций протекает только в строго определенных условиях, в частности, при заданных величинах pH, ионной силы, концентрации каждого из реагентов, температуры, времени.

7. *Контроль конъюгированного комплекса «полисахарид – белок»:*

- определение остаточных реагентов, используемых в процессе синтеза;
- остаточные реакционные функциональные группировки;
- определение количества PRP;
- определение количества конъюгата и не связавшегося полисахарида;
- определение количества белка в конъюгате;
- определение соотношения «полисахарид : белок»;
- определение молекулярно-массового распределения;
- контроль стерильности;
- контроль специфической токсичности белков в конъюгате, например, токсическое действие столбнячного или дифтерийного анатоксинов.

8. *Получение готового препарата НВ-вакцины.*

Очищенный полисахарид-белковый комплекс стандартизуют в соответствии со спецификацией вакцины, добавляют криопротектор, например, сахарозу или лактозу, и разливают во флаконы, замораживают и подвергают лиофилизации. Высушенный препарат герметизируют и подвергают контролю.

9. *Контроль готового препарата:*

- подлинность – определяется иммунологическими тестами с использованием специфических антител к очищенному полисахариду;
- контроль стерильности;
- определение содержания PRP (10–25 мкг/дозу);
- определение свободного PRP (не более 20 %);
- определение остаточной влаги (не более 3,0 %);
- контроль пирогенности (1 мкг/кг) или содержания эндотоксинов (не более 10 МЕ на 1 мкг полисахарида);
- pH (от 6,5 до 7,2);
- определение токсичности;
- определение иммуногенности на животных (сероконверсия не менее 50 %).

На рис. 8 приведена схема получения НВ-вакцины.

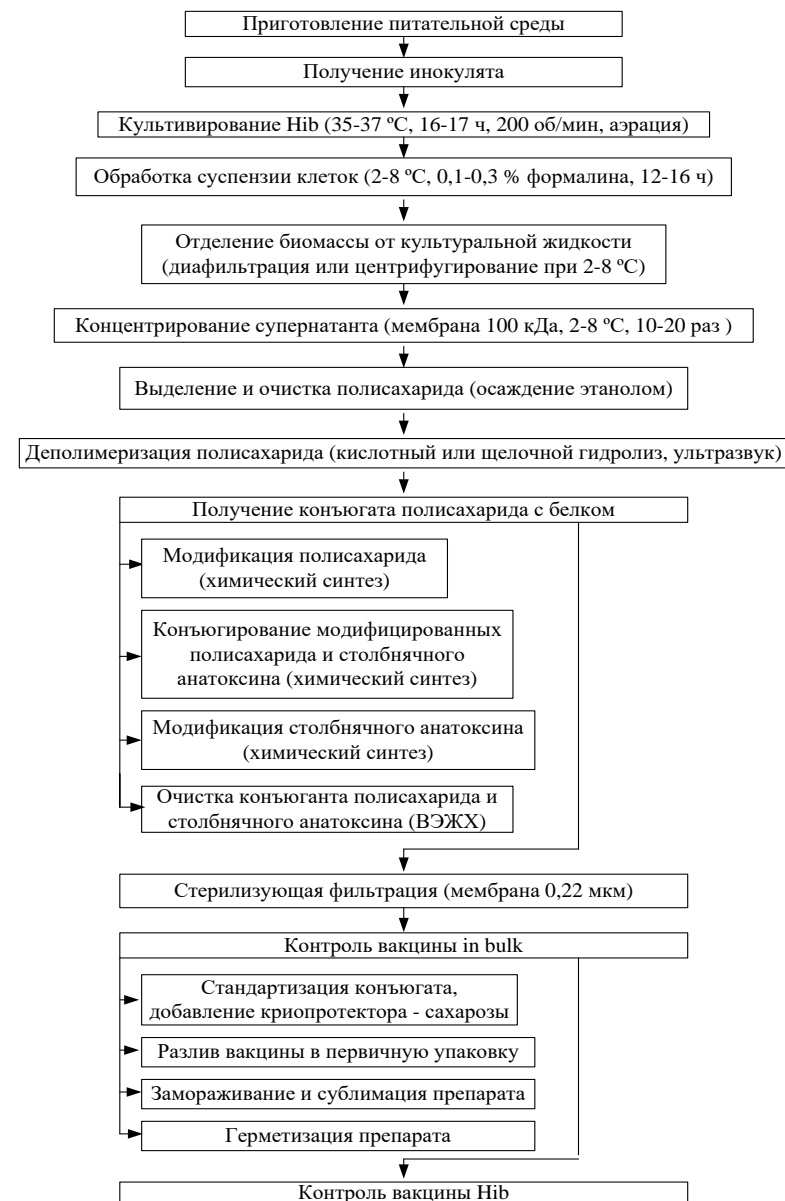


Рисунок 8 – Схема получения НВ-вакцины

В табл. 9 приведены данные по контролю НВ-вакцины конъюгированной лиофилизированной, произведенной разными фирмами.

Таблица 9 – Характеристика НВ-вакцины, производства Bharat Biotech и Sanofi Pasteur

Наименование показателя	Bharat Biotech, Индия	Sanofi Pasteur, Франция
Описание	Лиофильно высушенная масса белого цвета	Лиофильно высушенная масса белого цвета
Растворимость	Легко растворяется в солевом растворе, прозрачен, без видимых частиц	Легко растворяется в солевом растворе, прозрачен, без видимых частиц
Идентификация:		
PRP	Положительная реакция с агглютинирующей анти-сывороткой	Положительная реакция с агглютинирующей анти-сывороткой
Столбнячный антиген	–	Положительная
pH – (6,5–7,2)	6,9	6,91
Содержание воды (< 3 %)	2,9	1,36
Содержание PRP (не менее 9 мкг на дозу)	10,4	9,64
Содержание свободного PRP не более 20 %	2,1	5,3
Аномальная токсичность	Соответствует	Соответствует
Стерильность	Стерилен	Стерилен
Пирогенность	Соответствует	Соответствует
Специфическая активность	В тесте сероконверсии 50 % животных	–
Содержание фосфора	–	0,73 мкг/дозу
Осмолярность	–	39,59 мкг/дозу

Вакцина НВ рекомендована для активной иммунизации детей в возрасте старше 2 месяцев для профилактики опасных заболеваний, вызываемых *Neisseria meningitidis* типа b: пневмонии, эпиглоттита, менингита, артрита, остеомиелита и других заболеваний. При этом менингит составляет 52 % от всех форм данной инфекции. Осложнением у переболевших инфекцией

может быть глухота и умственная отсталость. Применение НВ-вакцины позволяет в десятки раз снизить заболеваемость этой инфекцией. Однако необходимо учитывать, что вакцина не защищает от заболеваний, возбудителем которых являются другие типы *N. meningitidis*. Препарат достаточно хорошо переносится детьми, общие симптомы, собранные и зарегистрированные в течение первых 48 часов после проведения вакцинации, были легкими и проходили сами по себе. Анализ экономической эффективности вакцинации против гемолитической инфекции типа b показывает, что стоимость лечения одного случая НВ-менингита составляет 1296 долларов, а стоимость последующего лечения 15820 долларов. В то же время цена одной дозы вакцины составляет 5 долларов, эффективность защиты 95–99 %. ВОЗ ставит задачу перед Европейским Союзом довести заболеваемость этой инфекцией в Европе до 1 случая на 100000 человек. Более чем 10-летний опыт применения НВ-вакцины в десятках стран мира показал её безопасность и высокую эффективность для предотвращения инфекции.

### 1.5. Вирусные вакцины для профилактики инфекционных заболеваний

*Отличительная черта вирусов* – отсутствие оболочки и неспособность к независимому метаболизму. Вирусы неспособны к репликации вне клеток хозяина. Обычно инфекция сопровождается повреждением тканей, вызванных как самим вирусом, так и иммунным ответом на него. Вирусы жизнеспособны только в организме хозяина и обычно быстро адаптируются, снижая свою вирулентность. Но вирусы, которые хорошо адаптируются в организме животного, могут быть высоковирулентными для человека, например, вирус бешенства.

Размножение вирусов в клетке-хозяине можно представить следующим образом: сначала происходит адсорбция вируса на поверхности клеток за счет соединения вируса с рецепторами клетки; затем проникновение вируса в клетку путем слияния с мембраной; освобождение вируса от белковой оболочки – нуклеиновая кислота транспортируется к ядерной оболочке клетки-хозяина и проникает в ядро; в ядре происходит транскрипция специфических последовательностей нуклеиновой кислоты вируса (ДНК или РНК) с образованием мРНК; трансляция мРНК; репликация вирусной ДНК или РНК и

транскрипция дочерней и родительской нуклеиновой кислоты; образование структурных и других вирусных белков; самосборка вирусных белков вокруг генома вируса; выход вирионов из клетки.

Вирусы проникают в клетку после их соединения со специфическими рецепторами на её поверхности (CR-2 рецептор комплемента для вируса Эпштейна – Барра, ацетилхолиновый рецептор нейронов для вируса бешенства, CD-4-молекула на Т-клетках для вируса иммунодефицита человека).

Известно, что цитотоксические Т-лимфоциты обучены распознавать молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I и реагировать на взаимодействие вирусного антигена и молекулы МНС класса I. Поскольку практически любой тип клеток может быть инфицирован вирусом, молекулы класса I, в отличие от молекул класса II, экспрессированы на большинстве клеток.

В отличие от антигенов бактерий, все вирусные антигены имеют белковую природу (гликопротеины, нуклеопротеины, фосфопротеины). Протективными свойствами обладают белки, обеспечивающие слияние вируса с клеткой, и белки, расположенные в более глубоких слоях вируса. Напряженность противовирусного иммунитета зависит от уровня циркулирующих антител и образования цитотоксических лимфоцитов. Цитотоксические лимфоциты вызывают лизис инфицированных вирусом клеток после их активации комплексом вирусного антигена с продуктами МНС класса I. Уже не вызывает сомнений, что это чужеродный пептид, который связывается МНС и распознается Т-клеточными рецепторами. Первое доказательство того, что МНС вовлечен в представление антигена Т-клеткам, продемонстрировано феноменом рестрикции (ограничения) по МНС. Оказалось, что Т-лимфоцит, специфичный к антигену и МНС, распознает одновременно обе молекулы. Позже было установлено, что цитотоксическая Т-клетка реагирует на ядерные антигены вируса, не проявляющиеся на поверхности вируса.

Антитела, образующиеся при вирусных инфекциях, действуют непосредственно на вирус или на клетки, инфицированные вирусом. В связи с этим можно выделить две основные формы участия антител в развитии противовирусного иммунитета.

*Первая форма* – это нейтрализация вируса антителами. Нейтрализация препятствует рецепции вируса на клетке и проникновению его в клетку. Эффект нейтрализации усиливается в присутствии комплемента, а также анти-

идиотипических антител, которые появляются на поздних сроках инфекции и связывают иммуноглобулиновые эпитопы комплекса, состоящего из вирусных частиц и антител. Комплекс, состоящий из вирусных частиц и антител, связывается с поверхностью макрофага за счет его Fc-рецепторов. Интериализация комплекса в фагоцитарной вакуоле ведет обычно к гибели возбудителя. Вируснейтрализующие антитела действуют непосредственно на вирус только тогда, когда вирус, разрушив одну клетку, переходит на другую. Некоторые вирусы, например, герпеса или цитомегаловирус, переходят из клетки в клетку по цитоплазматическому мостику и избегают «нападения» циркулирующих антител. В этом случае и в случае интегрированной формы вирусной инфекции, когда вирусный геном интегрируется в ДНК чувствительных клетках, основную роль в становлении иммунитета играют клеточные механизмы, связанные, прежде всего, с действием специфических цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-эффекторов ПЧЗТ и макрофагов.

*Вторая форма* – иммунный лизис инфицированных клеток. Проходит по двум направлениям:

- ✓ комплемент зависимость цитотоксичность возникает при действии антител на антигены, экспрессированные на поверхности инфицированной клетки, с последующей активацией системы комплемента;
- ✓ взаимодействие инфицированной клетки с антителами класса G оказывается недостаточным для гибели клеток-мишеней.

Цитотоксичность возникает, если клетки-мишени дополнительно контактируют с клетками, несущими рецепторы к Fc-фрагментам IgG. Такими клетками являются О-лимфоциты (ни Т-, ни В-клетки), полиморфно-ядерные лейкоциты и макрофаги, которые не обладают специфичностью по отношению к вирусному антигену. Основную массу противовирусных антител составляют иммуноглобулины G. Специфические Т-киллеры появляются на ранних сроках, нередко предшествуя образованию антител. Для цитотоксического действия Т-лимфоцитов на инфицированные клетки необходим непосредственный контакт клеток, после чего происходит изменение мембранной проницаемости клетки-мишени, её осмотическое набухание, разрыв мембраны и выход содержимого цитоплазмы в окружающую среду.

Мы рассмотрели принципиальные вопросы развития вируса в клетках хозяина и противовирусного иммунитета и переходим к описанию вирусных вакцин.

Как было показано ранее, вирусные вакцины представлены как препараты, содержащие живые вирусы (живые вакцины) и инактивированные (инактивированные вакцины).

*Живые вакцины* могут стимулировать защиту человека на всю жизнь с минимальной реактогенностью при использовании одной или двух доз. Такие вакцины состоят из вирусов, которые реплицируются в организме хозяина таким же образом, как и природный вирус – вакцина может стимулировать иммунную реакцию, аналогичную вызываемой природной инфекцией. Живая вакцина представлена аттенуированным вирусом, что исключает возможность заболевания иммунизированного человека данной вакциной. Основным требованием к данной вакцине является степень аттенуирования: живая вакцина должна быть аттенуирована в такой степени, чтобы отсутствовала патогенность, и была достаточно инфекционной для создания защитного иммунитета. Живые вакцины обычно вызывают как гуморальный иммунитет (появление специфических противовирусных антител), так и клеточный (например, цитотоксические Т-лимфоциты). Аттенуированные штаммы вирусов получают путем инактивации гена, отвечающего за образование фактора вирулентности, или за счет мутаций в генах, неспецифически снижающих вирулентность. Применение классической стратегии для вирусов стало возможным в 50-х годах XX века, когда появилась возможность выращивания вирусов в культурах клеток. Технология данного процесса сводится к следующему: из инфицированного материала человека выделяют циркулирующий дикий вирус и начинают проводить пассажи вируса через различные лабораторные культуры клеток. После прохождения большого числа пассажей вируса добиваются ослабления его патогенности. К примерам таких вакцин можно отнести вирус кори, вирус эпидемического паротита, вирус краснухи и вирус полиомиелита.

*Инактивированные вирусные вакцины* используются уже в течение десятилетий и обычно хорошо переносятся. Поскольку вирусы при выращивании *in vitro*, как правило, выходят в клеточную культуральную среду, то вирусы собирают, отделяя их от культуральной среды. Крупный размер частиц вирусов в сравнении с другими макромолекулами среды позволяет легко отделить частицы с использованием простых технологий очистки, построенных на разделении частиц по размерам. К примерам таких вакцин относятся вирус полиомиелита, вирус гриппа, вирус бешенства и вирус японского энце-

фалита. В ряде случаев при инфицировании клеток вирусом используют лизис клеток с последующей очисткой вирусных частиц. В качестве примера можно привести вакцину против гепатита А. Инактивация вируса проводится чаще всего добавлением формалина. Инактивированные вирусные вакцины обладают высокой иммуногенностью. Для большинства инактивированных вакцин оказалось невозможным полностью воссоздать конформацию эпитопов, например, рекомбинантных полипептидов, обладающих высокой протективной активностью. Таким образом, классические инактивированные вирусные вакцины, обладающие безвредностью и достаточной эффективностью, и сегодня остаются востребованными вакцинологией.

Первым применением технологии рекомбинантной ДНК при производстве вакцин было создание вакцины против гепатита В. Ген S, кодирующий HBsAg, экспрессировали в пекарских дрожжах *S. Cerevisiae*, что приводило к образованию вирусоподобных частиц HBsAg размером 22 нм внутри клеток. Вакцина, получаемая из дрожжей, используется сегодня во всем мире в больших количествах. Кроме того, HBsAg экспрессировали в трансгенных листьях табака и клубнях картофеля. Выделенный и очищенный из трансгенных растений HBsAg обладал иммуногенностью. Чаще всего крупные частицы более иммуногенны, чем отдельные полипептиды. Более того, как и в случае с вирусоподобной частицей HBsAg, частицы обычно стимулируют выработку антител на конформационные эпитопы частицы, в то время как изолированные поверхностные полипептиды частицы могут не стимулировать продуцирование таких антител. Примером получения вакцины, содержащей вирусоподобные частицы, может служить вакцина «Gardasil», представляющая собой вирусоподобные частицы высокой степени очистки главного рекомбинантного капсидного полипептида (капсида L1) белка вируса папилломы человека (HPV) четырех типов 6, 11, 16, 18. В этой вакцине, как и в других вакцинах, в качестве адьюванта используются соединения алюминия (алюминия гидроксифосфата сульфат). Использование этой вакцины стимулирует выработку антител, которые связываются с вирионами. Вакцина «Gardasil» производства «Merck Sharp & Dohme Idea Inc» (Швейцария) успешно применяется для предупреждения заболеваний, вызванных вирусом папилломы (рака шейки матки и влагалища, генитальных кондилом, предраковых состояний и др.). Рекомбинантные вирусоподобные частицы рота-

вирусов и парвовирусов также экспрессировались в виде потенциальных вакцин.

Самостоятельным вопросом получения вирусных вакцин является подбор культуры клеток для выращивания вируса.

Перевиваемые линии клеток являются перспективным субстратом для производства профилактических вирусных вакцин. Возможность использования системы посевных, хорошо аттестованных, проверенных на отсутствие спонтанных вирусных клеток, применение реакторного культивирования на микроносителях в псевдосуспензии делают этот субстрат весьма перспективным. Так, например, при получении вакцины на культуре клеток вакцины в пятидесятилитровом реакторе можно получить 100000 доз вакцины, в то время как для получения такого же количества доз на эмбрионах кур необходимо 10000 эмбрионов. Кроме этого, такая технология гарантирует безопасность от вирусов птиц – ретровирусов. Эта технология менее трудоемка, экономична и меньшей степени подвержена контаминации. Существует ряд клеточных линий, рекомендованных для производства вакцин: MDCK (перевиваемые клетки почек собаки), VERO (перевиваемые клетки почки африканской зеленой мартышки), Нер-2 (перевиваемые эпителиоидные клетки человека, дериват HeLa), BHR-21 (перевиваемые клетки почек сирийского хомячка), MDBK (перевиваемые клетки почек крупного рогатого скота), MRC-5 (диплоидные клетки человека) и другие.

Для лучшего понимания принципов конструирования противовирусных вакцин мы приводим краткую характеристику наиболее значимых для человека вирусов.

**Семейство Picornaviridae.** Небольшие РНК вирусы с частицами размером 20–30 нм. Капсид состоит из 60 белковых субъединиц. Молекулярная масса составляет 8–9 мегадальтон. Вирионная РНК обладает инфекционными свойствами и является информационной для синтеза белков. На основании плотности частиц, нуклеотидного состава РНК и стабильности вирусов при разных величинах pH семейство разделено на 4 рода: Enterovirus, Rhinovirus, Cardiovirus, Aphthovirus.

*Под Enterovirus (энтеровирусы).* Типовой вид – полиовирус человека 1. Плавающая плотность в хлористом цезии составляет 1,32–1,35 г/см<sup>3</sup>, константа седиментации 150–165 S. Вирусы стабильны при pH 3,0–10,0; инактивируются при температуре 45–55 °С. Отмечена тенденция размножаться в культуре

клеток, происходящих от естественных хозяев или близких ему видов. В состав рода входят вирусы полиомиелита 1, 2 и 3 типа. Иммунная система способна различать их только на стадии проникновения (через кишечник) и после лизиса клеток. Чувствительны к антителам. В большинстве случаев энтеровирусная инфекция у человека ограничивается желудочно-кишечным трактом и часто протекает без клинических симптомов. Полиомиелит так же вызывается вирусом из рода энтеровирусов и влечет за собой паралич вследствие поражения передних рогов спинного мозга.

*Под Rhinovirus (риновирусы).* Типовой вид – риновирус человека (вирус обычной простуды). Вирусы нестабильны при pH ниже 5,0. Плавающая плотность в хлористом цезии составляет 1,38–1,41 г/см<sup>3</sup>. Вызывают заболевания верхних дыхательных путей. Многочисленные антигенно различающиеся типы делают иммунитет неэффективным, а вакцинацию проблематичной.

**Семейство Togaviridae.** Сферические вирионы диаметром 40–70 нм. Изометрический капсид покрыт плотно прилегающей липопротеиновой оболочкой, содержащей липиды клетки-хозяина и вирусоспецифические белки. Оболочка имеет поверхностные выпячивания. Термостабильны, устойчивы в зоне pH 6,0–8,0. Геном представлен однонитчатой линейной РНК с молекулярной массой около 4 мегадальтон, которая может функционировать как информационная РНК. В состав семейства входят роды Alphavirus, Flavivirus, Rubivirus, Pestivirus.

*Под Rubivirus (рубивирус).* Типовой вид – вирус краснухи («германская корь»). Размер 60 нм, форма сферическая, оболочка имеет единичные выпячивания длиной 6 нм с утолщенным концом, плавающая плотность в хлористом цезии 1,19 г/см<sup>3</sup>, коэффициент седиментации (350 ± 50) S. В составе вирионов обнаружена нейраминидаза. Вирус обладает гемагглютинирующими свойствами. Главную опасность представляет способность вируса поражать плод в первые 4 месяца беременности. Характеризуется сыпью, генерализованной лимфаденопатией. Редкими осложнениями является энцефалит и тромбоцитопения. Живые ослабленные вакцины дают выраженный иммунитет.

**Семейство Paramyxoviridae.** Сферические, покрытые оболочкой вирионы диаметром 150 нм и более, с характерными поверхностными выступами длиной 8 нм. Геном не сегментирован, линейная однонитчатая РНК имеет молекулярную массу 5–8 мегадальтон. Реплицируются в цитоплазме.



*Под Paramyxovirus (парамиксовирусы).* Типовой вид – вирус эпидемического паротита. Молекулярная масса вирионов 500–700 мегадальтон, коэффициент седиментации 1000 S, плавучая плотность в хлористом цезии 1,19 г/см<sup>3</sup>. Все известные штаммы вируса относятся к одному антигенному типу, что способствует созданию вакцины по длительному сохранению иммунитета. Вирионы содержат гемагглютинин и нейраминидазу. Вирус эпидемического паротита поражает яички и может вызвать аутоиммунные повреждения. К миксовирусам относятся вирусы гриппа. Вирус гриппа представляет собой классический пример присоединения специфическим рецептором (гемагглютинин) и антигенного разнообразия. Адаптивный иммунитет к гриппу относительно неэффективен. Живая вакцина против эпидемического паротита приводит к выраженному иммунитету.

*Под Morbillivirus (коривирус).* Типовой вид – вирус кори. Вирионы включают гемагглютинин, но не содержат нейраминидазы. Все члены рода имеют общий антиген, не стабильны при pH ниже 4,5. Реплицируются в цитоплазме с образованием цитоплазматических и внутриядерных включений. Вирусы характеризуются широким тропизмом к лимфоретикулярной ткани и эпителию алиментарного и респираторного трактов. Размножаясь, вирус проникает в регионарные лимфатические узлы и кровь. На наружной поверхности вируса находится Н-белок, при помощи которого вирус кори прикрепляется к поверхности клетки, и Т-белок, способствующий проникновению вируса в клетку за счет слияния вирусной и клеточной мембран. Вирусы вызывают заболевания с сыпью, респираторными и кишечными симптомами. Вирус кори, инфицируя лимфоциты, неспецифически подавляет клеточный иммунный ответ. Живые ослабленные коревые вакцины дают выраженный защитный эффект.

**Семейство Herpesviridae.** Размер вирионов 120–150 нм. Покрываются липидсодержащей оболочкой. Капсид (100–110 нм) имеет 162 капсомера. Геном представлен линейной двунической ДНК, которая имеет молекулярную массу 80–160 мегадальтон. Размножение вируса начинается в ядре клетки и завершается приобретением гликопротеинолипидной оболочки при прохождении нуклеокапсида через ядерную мембрану в эндоплазматический ретикулум. Вирусы семейства Herpesviridae имеют большое значение в инфекционной патологии человека. Вирусы герпеса 1-го и 2-го типов, вирус зостер вызывают у человека различные по проявлению инфекции: от поверхност-

ных поражений эпителия до заболевания типа лимфоматоза. Вирус герпеса человека 2-го типа поражает главным образом гениталии и может передаваться половым путем. Вирус Эпштейна – Барра является возбудителем инфекционного мононуклеоза и может вызывать опухоль (лимфома Беркитта). Цитомегаловирусы человека вызывают пороки развития и становятся наиболее важным возбудителем оппортунистической инфекции при иммуносупрессии.

**Семейство Rhabdoviridae, под Lyssavirus.** Типовой вид – вирус уличного бешенства. Большой РНК вирус. Пулевидные вирионы 70 x 170 нм. Геном представлен одной молекулой однонитчатой РНК с молекулярной массой от 3,5 до 4,5 мегадальтон. Нуклеокапсид свернут в трубку в виде спирали и представляет собой полую трубку с внешним диаметром около 50 нм. Распространяясь по периферическим нервам, поражает ЦНС. Обычно инфекция передается вследствие укуса животными или ослонении поврежденной кожи (собаки, лисы, кошки, летучие мыши и др.). Для сохранения жизни требуется немедленная пассивная иммунизация за счет введения антирабической сыворотки или специфического антирабического иммуноглобулина.

**Вирусы гепатита.** По крайней мере, 3 типа вирусов могут вызвать гепатит: А (инфекционный гепатит; РНК-вирус), В (сывороточный гепатит; ДНК-вирус) и С (ранее известный как ни А, ни В; РНК-вирус). Хроническая инфекция, вызванная вирусом гепатита В, является причиной развития цирроза печени, а также первичного рака печени благодаря встраиванию ДНК вируса в геном клеток и последующей их злокачественной трансформации. Вирус гепатита В содержит три антигена: HBsAg, HBcAg, HBeAg. Вакцинация против гепатита В достаточно эффективна, и появляющиеся антитела нейтрализуют вирус. Вирус гепатита А стабилен к высоким температурам и сохраняет активность при 60 °С в течение 12 часов. Вирус гепатита А (РНК-содержащий) передается от больного или вирусоносителя водным, пищевым или бытовым способом (поражение печени – болезнь Боткина).

### 1.5.1. Корь, краснуха, эпидемический паротит

Коревая инфекция, распространяющаяся воздушно-капельным путем, известна с глубокой древности. До появления эффективных вакцин фактически большинство детей инфицировались этим вирусом в очень раннем воз-

расте. Для кори характерны сыпь, кашель и высокая температура, в ряде случаев корь может заканчиваться летальным исходом. Корь – весьма неприятное заболевание по двум причинам. Во-первых, вирус кори подавляет иммунитет, что приводит к различным оппортунистическим инфекциям. Во-вторых, природная инфекция кори также включает в себя группу относительно редких, но серьезных долгосрочных осложнений, в том числе энцефалит.

Краснуха, известная также как коревая краснуха (или «германская корь»), в норме является нетяжелым заболеванием младенцев и детей, проходящим без лечения, характеризующееся лихорадкой, сыпью и артралгией или артритом временного характера. Инфекция краснухи у беременных женщин легко передается плоду и может вызвать истощение плода и тяжелые врожденные дефекты. Главную опасность представляет способность вируса поражать плод в первые 4 месяца беременности. Этот врожденный синдром краснухи является основным фактором, способствующим разработке и применению вакцин против краснухи.

Вирус эпидемического паротита вызывает паротит. Последствиями этого заболевания являются менингит и орхит. Менее распространенными последствиями являются тяжелые формы менингита и глухота. До появления вакцин паротит был основной причиной глухоты. Как это бывает со многими «детскими» вирусными заболеваниями, та же самая инфекция у не переболевших ранее взрослых может быть более серьезной и привести к стерильности у мужчин или маститу у женщин. Паротит является также частой причиной миокардита у детей.

Во всех странах мира корь, краснуха и эпидемический паротит занимают значительное место в структуре инфекционной патологии человека и остаются реальной угрозой жизни и здоровью людей. Единственным радикальным мероприятием в борьбе с этими инфекциями является активная иммунизация населения с помощью живых вакцин.

Активная иммунизация против кори имеет более чем 200-летнюю историю. Начиная с XVII века, делались попытки предохранить детей от кори, прививая им вирулентный материал от больного корью. Впервые эта попытка была сделана Номе (1759 г.), который показал, что у восприимчивого ребенка может быть легкая форма кори при нанесении на скарифицированные участки кожи крови, полученной из насечек кожи больного корью. Разработ-

ка технологии получения противокоревых вакцин шла по двум направлениям: получение инактивированных вакцин и создание авирулентных штаммов для получения живых вакцин.

В 1961 году советскими учеными В. Д. Соловьевым и Л. С. Лозовским предложена цельноклеточная инактивированная коревая вакцина. Привитые указанной вакциной дети болели в более легкой форме, но вакцина в целом не предупреждала корь у детей.

В 1962 году Warren, Rarelitz предложили инактивированную очищенную вакцину. Для изготовления этой вакцины штамм Эдмонстон и вирусосодержащую жидкость инактивировали формалином, затем концентрировали на гидроокиси или фосфате алюминия в 5–10 раз. Вакцина защищала от заболевания и снижала реактогенность живой коревой вакцины, если детей прививали за 1 месяц до введения живой вакцины. Однако через 3–4 года была установлена потеря коревых антител у привитых.

В 1964 году Norrby предложил инактивированную расщепленную вакцину на основе гемагглютининов, выделенных из штамма Эдмонстон путем обработки вирусосодержащего материала твином-80 и диэтиловым эфиром, с последующей очисткой, диализом и концентрацией. Такая вакцина имела антигенную активность в 3–4 раза более высокую, чем вакцина, инактивированная формалином и адсорбированная на алюминия фосфате. Использование этой вакцины показало, что уже через год у привитых отмечалось резкое снижение титров антител.

В результате исследований было установлено, что дети, привитые инактивированными вакцинами, через короткие промежутки времени теряли иммунитет. Кроме того, было выяснено, что у детей, привитых этими вакцинами, обнаруживаются необычные реакции при естественном заражении корью или введении живых вакцин. У детей отмечалась сыпь, эритема, инфильтрат в месте введения. Имелись случаи атипичной кори с сыпью и пневмониями, высокой температуры, плевральными экссудатами. Было высказано предположение, что причиной этого может быть реакция, вызванная взаимодействием сывороточных коревых антител с антигеном вируса, протекающая по типу феномена Артюса. В дальнейшем было принято решение о прекращении использования инактивированных вакцин.

**Штаммы кори для живых вакцин.** Методы получения вакцинных штаммов для приготовления живых вакцин против вирусных инфекций сводятся к адаптации вирусов к новому хозяину, то есть к новым, необычным условиям репродукции. Метод адаптации вируса кори к различным животным с целью получения аттенуированных штаммов не дал желаемых результатов: штаммы были высокорепродуктивны или утрачивали иммуногенные свойства. Наиболее пригодным для получения вакцинных штаммов вируса кори оказался метод серийных пассажей в различных клеточных культурах. Был получен ряд вакцинных штаммов кори, используемых различными производителями. В России используется штамм Л-16 (Ленинград-16). Вирус был выделен в 1960 году в Ленинграде от больного корью ребенка. Этот штамм пассировался в первичной культуре ткани почек новорожденных морских свинок (21 пассаж), после чего был дополнительно аттенуирован в культуре клеток фибробластов эмбриона японских перепелов (3 пассажа). Впоследствии из вакцинного штамма Л-16 были получены разные варианты штамма путем адаптации к другим первичным клеточным культурам: к культуре клеток почек собаки, зеленых мартышек, диплоидных клеток человека, к культуре клеток эмбрионов японских перепелов. В других странах наиболее часто встречается штамм Эдмонстон (прошел 6 пассажей на куриных эмбрионах, 24 пассажа на почках человека, 28 пассажей на амнионе человека), который явился родоначальником ряда живых коревых вакцин: Эдмонстон А и Эдмонстон В (прошли дополнительные 12 и 13 пассажей на куриных эмбрионах), Шварц (85 пассажей на куриных эмбрионах), Бекенгем (79 пассажей на куриных эмбрионах), Милованович (94 пассажа на куриных эмбрионах), Эдмонстон – Загреб (15 пассажей на почках собаки и 19 на диплоидных клетках человека) и Моратен (40 пассажей на куриных эмбрионах). Температура культивирования этих штаммов также различна: от 30 °С до 37 °С.

Проведенный анализ последовательности остатков нуклеиновых кислот в генах основного вирусного антигена штамма Эдмонстон и его производных (Бекенгем, Шварц, Эдмонстон – Загреб, Белград, Моратен, Эндерс) указывает на крайне незначительные различия между штаммами, несмотря на различные методы пассирования вируса, применявшиеся для получения этих штаммов. Четыре другие вакцины, независимо разработанные в Японии (САН-70), Китае (Changchun-47, Shanghai-191) и России (Ленинград-16), об-

ладают большими различиями, что можно было ожидать, учитывая географическое разнообразие исходных изолятов.

**Корь (MEASLES)** – штамм должен показывать отсутствие нейротропности на обезьянах и быть иммуногенным и безвредным для человека. Вирус лиофилизированный хранится при  $t = -20$  °С, а не лиофилизированный – при температуре не выше минус 60 °С.

**Тест на нейровирулентность.** Каждый рабочий и посевной вирус проверяется по этому тесту. Десять обезьян, проверенных на отсутствие антител к вирусу кори, заражаются соответствующим вирусом. Животным вводят по 0,5 мл вирусной суспензии в зону таламуса. На 17–21-й день обезьяны должны быть обследованы на наличие симптомов паралича и других неврологических проявлений. Затем на 21-й день у обезьян берут кровь на определение антител к вирусу кори; проводят анестезию и забой животных с последующей аутопсией; осуществляют гистопатологические исследования для изучения изменений в центральной нервной системе.

**Штаммы краснухи для живых вакцин.** Вирус краснухи был впервые изолирован учеными США в 1962 году и аттенуирован в клетках африканской зеленой мартышки (AGMK) в 1966 году. Штамм получил название HPV-77.

Для производства вакцин широко используются 3 штамма вируса краснухи:

- HPV-77, первоначально полученный от типичной краснухи подростка;
- Cendehill, выделенный из мочи больного краснухой ребенка;
- RA-27/3, полученный из тканей – эксплантатов плода при медицинском аборте вследствие заражения матери вирусом краснухи.

Эти вирусы были аттенуированы путем серийных пассажей в культурах клеток, и в настоящее время для их размножения используются клетки утиных эмбрионов (штамм HPV-77 DE5), клетки почек кролика (штамм Cendehill) и диплоидные клетки человека (штамм RA-27/3). RA-27/3 производится в клетках WI-38. Он был одной из первых аттенуированной человеческой вакциной, производимой в клетках человека. Многочисленные сравнительные клинические испытания показали, что в целом RA-27/3 превосходил вакцины Cendehill и HPV-77 по показателям репродуктивности и иммуногенности при низких дозах. Вследствие этого RA-27/3 используется в боль-

шинстве стран, за исключением Японии, где используются японские штаммы. RA-27/3 также обладает преимуществом сравнительно с вакциной HPV-77 DE5 из-за простоты изготовления. Кроме того, в Японии активно используются штаммы Takahashi, Matsuura, TO-336, выращиваемые на фибробластах кролика или в клетках первичной культуры фибробластов эмбрионов японской перепелки. В Японии отдавалось предпочтение разработке местных изолятов, а не американским или европейским штаммам, так как существовало мнение, что вирусы краснухи, циркулирующие в Японии, менее тератогенны. Работа со штаммом RA-27/3 с точки зрения технологичности также предпочтительней.

Сегодня специалисты владеют информацией о полной последовательности штамма RA-27/3 и сравнительной последовательности генов E1 японских и западных вакцин, а также изолятов дикого типа. Краснуха относительно гомогенна на нуклеотидном уровне, с вариациями от штамма к штамму приблизительно в 2 %. Атенуация достигалась пассированием в клетках человека (RA-27/3), клетках почек кролика (Cendehill), AGMK плюс клетки утиного эмбриона (HPV-77 DE5) и в различных сочетаниях AGMK, клетках почек коров, свиней, куриных эмбрионах. По мнению Alan R. Shaw, имеющиеся на сегодня технологии секвенирования, схемы создания инфекционных клонов и сайт-специфический мутагенез могут, в принципе, использоваться для создания вакцинных штаммов, которые логически должны воплощать минимальный генотип, требуемый для аттенуации, начиная с изолята дикого типа. Однако в этом случае сложно было бы обосновать необходимость конечного тестирования на людях, поэтому нам следует удовлетвориться тем, что мы имеем.

*Краснуха (RUBELLA)* – штамм должен показывать отсутствие нейротропности на обезьянах и быть иммуногенным и безвредным для человека. Вирус лиофилизированный хранится при температуре минус 20 °С, а не лиофилизированный – не выше 60 °С.

*Тест на нейровирулентность.* Каждый рабочий и посевной вирус проверяется по этому тесту. Десять обезьян, проверенных на отсутствие антител к вирусу краснухи заражаются соответствующим вирусом. Животным вводят по 0,5 мл вирусной суспензии в зону таламуса. На 17–21-й день обезьяны

должны быть обследованы на наличие симптомов паралича и других неврологических проявлений. Затем на 21 день у обезьян берут кровь на определение антител к вирусу краснухи, проводят анестезию и забой животных с последующей аутопсией; осуществляют гистопатологические исследования для изучения изменений в центральной нервной системе.

***Штаммы эпидемического паротита для живых вакцин.*** Для производства вакцин широко используется ряд штаммов вируса эпидемического паротита:

- Jeryl Lynn, полученный на клетках куриных эмбрионов (1967 г.). Культура для этого штамма была отобрана в 1963 году из горла 5-летней девочки. Этот вирус был пассирован 12, 17 и 27 раз на куриных яйцах с развивающимся эмбрионом. Вирус после 17 пассажей проявлял необходимую иммуногенность и отсутствие патогенности. Важным для понимания вопросов аттенуирования вирусов являются следующие данные: 12 пассажей приводили к инфицированию паротитом, а вирус, прошедший 27 пассажей, не обладал нужной иммуногенностью;

- Ленинград-3 был получен на клетках первичной культуры фибробластов эмбрионов японской перепелки (1974 г.), обладал высокой иммуногенностью и эффективностью;

- L-Zagreb был получен на первичной культуре куриных эмбрионов (1976 г.);

- Rubini – штамм был изолирован из мочи мальчика, страдающего паротитом, и пассирован на диплоидных клетках человека (1985 г.). По данным ряда исследователей, вакцины, в состав которых входит штамм Rubini, обладают недостаточной эффективностью, что может быть связано с его чрезмерной аттенуацией. Эти вирусы были аттенуированы путем серийных пассажей в культурах клеток.

Кроме того, в Японии активно используются 5 независимых штаммов: Urabe (1979 г.), Hoshino and Torii Miyahara, NK-M46, выращиваемых в клетках первичной культуры фибробластов эмбрионов японской перепелки или на клетках куриных эмбрионов. В конце 1980-х гг. и в начале 1990-х отчеты о применении в Канаде и Великобритании штамма Urabe информировали о связанном с вакциной асептическом менингите. Это, в конечном счете, при-

вело к отзыву с рынка вакцин, содержащих Urabe, в Европе и Канаде, хотя эти вакцины остаются в продаже в других частях света.

*Эпидемический паротит (MUMPS).* Штамм должен демонстрировать отсутствие нейропатогенности на обезьянах и быть иммуногенным и безвредным для человека. Вирус лиофилизированный хранится при температуре минус 20 °С, а не лиофилизированный – не выше 60 °С.

*Тест на вирулентность.* Каждый рабочий и посевной вирус проверяется по тесту на нейровирулентность. Десять обезьян, проверенных на отсутствие антител к вирусу эпидемического паротита, заражаются соответствующим вирусом. Животным вводят по 0,5 мл вирусной суспензии в зону таламуса. На 17–21-й день обезьяны должны быть обследованы на наличие симптомов паралича и других неврологических проявлений. Затем на 21-й день у обезьян берут кровь на определение антител к вирусу эпидемического паротита; проводят анестезию и забой животных с последующей аутопсией; осуществляют гистопатологические исследования для изучения изменений в центральной нервной системе (не должно быть обнаружено изменений в нейронах гиппокампа, коре лобной, теменной, двигательной и затылочной долей мозга, в среднем мозге и т.д.).

Штаммы, используемые для производства вакцин, должны быть идентифицированы на основании документа, в котором содержатся сведения об их происхождении, характеристиках в момент выделения, а также подробные данные о результатах всех тестов, регулярно проводимых для подтверждения свойственных этим штаммам характеристик.

**Культуры клеток для производства живых вирусных вакцин.** Культура клеток для производства каждой из вакцин должна быть разрешена национальным органом контроля.

Для производства вирусных вакцин используют различные клеточные культуры:

➤ эмбрионов птиц, полученных из яиц, свободных от специфических патогенов и благополучных хозяйств. Эти хозяйства должны проходить постоянный контроль на наличие инфекционных агентов, характерных для птиц (микобактерий, вируса болезни Ньюкасла, птичьих вирусов – энцефаломиелита, инфекционного лоринготрахеита, аденовируса, лейкоза, гриппа;

микоплазм, сальмонелл и других инфекционных агентов). На них получают вакцины против кори и эпидемического паротита;

➤ человеческих диплоидных клеток (проходит контроль на наличие ретровирусов, нуклеиновых кислот вирусов гепатита В и С, вируса иммунодефицита человека, клетки должны быть свободны от туморогенных агентов, обязательным является контроль хромосомной характеристики, контроль на животных разных видов: мышах, морских свинках, кроликах). На них получают вакцины против кори, краснухи и эпидемического паротита;

➤ почек собак шестинедельного возраста (проходит контроль на наличие вирусов бешенства и гепатита, листериоза, лептоспироза, сальмонеллеза, бруцеллеза, туберкулеза, микоплазмоз, токсоплазмоз и других инфекционных агентов). На них получают вакцину против кори.

➤ почек кроликов (проходит контроль на наличие кокцидоза, миксоматоза, микобактерий, лептоспироза, токсоплазмоза и других инфекционных агентов). На них получают вакцину против краснухи.

*Согласно требованиям ВОЗ, к культуре клеток предъявляют следующие требования:* клетки должны происходить из нормальных тканей, причем предпочтение отдается тканям плода в силу меньшей вероятности их контаминации; во время культивирования клетки не должны значительно отклоняться от нормального кариотипа и в процессе роста не должны обнаруживать никаких морфологических аномалий; клетки должны быть свободны от выявляемых контаминантов.

Так, например, в России для получения паротитной вакцины культивирование штамма эпидемического паротита Л-3 проводят в первичной культуре фибробластов эмбрионов японских перепелов. В это же культуре проводится культивирование штамма вируса кори Л-16 для получения коревой вакцины. При получении комбинированных вакцин против краснухи, кори и эпидемического паротита для вакцины MMR используется культура клеток куриных эмбрионов для выращивания вируса кори – Schwarz и вируса эпидемического паротита штамма Enders (производное от штамма Jeryl Lynn), для выращивания вируса краснухи Wistar RA-27/3 используется культура диплоидных клеток человека WI-38. В то же время при получении вакцины Priorix (Бельгия) используется культура ткани эмбриона цыпленка для выра-

щивания вируса кори – штамма Schwarz и вируса эпидемического паротита RIT 4385; для выращивания вируса краснухи штамм Wistar RA-27/3 используется культура диплоидных клеток человека MRC-5. Для получения коревой вакцины российскими учеными предложено использовать культуру клеток диплоидного штамма Л-68, полученную из легкого 11-дневного эмбриона человека. Культура отличается стабильными морфологическими и кариологическими свойствами, не содержит микоплазм, посторонних вирусов, микобактерий, не туморогенна и, что крайне важно, восприимчива к вирусу кори. Контроль на туморогенность является обязательным и крайне необходимым, так как в процессе многократного культивирования некоторые из клеток могут становиться раковыми. Так, например, при проверке клеток Vero на туморогенность у безволосых мышей и на клеточной культуре мышечной ткани человека обнаружен значительный туморогенный потенциал с увеличением числа пассажей. На 232 пассаже и далее клетки вызвали образование узелков у всех исследуемых мышей. Установлена норма 100 пкг гетерогенной ДНК на дозу вакцины. Полная безопасность требует абсолютного отсутствия ДНК в препаратах вакцин, что, в свою очередь, диктует постоянное совершенствование технологических процессов фильтрации и очистки в процессе получения вакцинных препаратов.

**Питательные среды.** Питательные среды для приготовления вирусных вакцин включают четыре составные части: воду, неорганические соли, сывороточные белки и низкомолекулярные синтетические вещества.

**Вода.** При получении воды для производства вакцин (воды для инъекций) могут быть реализованы методы обработки воды: деионизация, обратный осмос, микрофильтрация, адсорбция органических примесей, фильтрация на углеродном фильтре, ультрафиолетовая обработка (окисление). Контроль полученной воды осуществляют в соответствии с требованиями национальных фармакопей.

**Неорганические соли** создают необходимое осмотическое давление (например, натрий хлористый); буферную емкость среды. В течение ряда лет были предложены солевые растворы Хэнкса и Эрла. Наиболее часто эти растворы выпускаются промышленностью в виде 10-кратных концентратов без бикарбоната натрия. Эти растворы пригодны после разведения водой для инъекций, термической стерилизации с последующим добавлением стериль-

ных растворов глюкозы и бикарбоната натрия. Фосфаты и бикарбонат натрия в среде поддерживают величину pH 7,2–7,5, что крайне необходимо, учитывая возможность подкисления питательной среды растущими культурами клеток. Важным является определенное содержание CO<sub>2</sub> в воздухе (обычно около 5 %) для поддержания совместно с бикарбонатом оптимальной величины pH.

**Низкомолекулярные синтетические вещества** – это необходимые аминокислоты, глюкоза и другие сахара, витамины и другие вещества. Значительный вклад в разработку вирусологических питательных сред внес Н. Eagle, который проводил исследования по потребности культивируемых клеток в солях, аминокислотах, углеводах и на основании полученной информации конструировал питательные среды.

**Сыворотка** является обязательным компонентом при производстве вирусных вакцин, обеспечивающая вирусы факторами роста. Сыворотка должна быть стерильной (свободной от бактерий, грибов и микоплазм). Обязательным является контроль на присутствие вирусов лейкоза крупного рогатого скота и отсутствие энцефалопатии. Кроме того, сыворотка должна быть свободна от ингибиторов, культивируемых вирусов (кори, краснухи и эпидемического паротита). Запрещено использовать сыворотку человека. Для производства вирусных вакцин наиболее часто используют fetalную телячью сыворотку. Именно по вопросу использования данной сыворотки существуют многочисленные возражения. Установлено, что fetalная телячья сыворотка может быть контаминирована вирусными агентами. Самым известным является пестивирус, называемый вирусом бычьей диареи. Поэтому на присутствие данного вируса должна быть обследована каждая партия сыворотки. Было обнаружено, что 13 % вакцин против стрептококка, полиовируса и вакцины MMR были положительны на РНК-пестивирус. Также установлено, что сывороточные антитела против вируса бычьей диареи (BVD) были обнаружены у 30 % людей, ранее не имевших контакта с инфицированными животными. Необходимо также отметить, что на сегодня не существует свидетельств о возможном заражении этим вирусом. В то же время Бенджамин МакРирден, указывая на малый размер вируса, считает, что нельзя быть на 100 % уверенным в его удалении фильтрацией.

В табл. 10 приведены наиболее часто используемые среды.

Таблица 10 – Питательные среды, наиболее широко используемые для культур клеток

Наименование среды	Особенности состава среды и использования
Среда 199	Широко используемая многокомпонентная среда – используется для получения вакцин против полиомиелита, кори, эпидемического паротита. В состав среды входят аминокислоты: L-аланин, L-аргинин, L-цистеин, L-глутамин, L- цистеин, L-глутаминовая кислота, L-глицин, L-лизин, L- триптофан и др.; витамины: биотин, холин-хлорид, фолиевая кислота, кальций пантетонат, рибофлавин и др.; неорганические соли: CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O, Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> x 9H <sub>2</sub> O, MgSO <sub>4</sub> , KCl, NaCl, NaHCO <sub>3</sub> и др.; твин 80, урацил, феноловый красный и др. При культивировании клеток добавляют сывороточные компоненты от 2 до 10 %.
Основная среда Игла, ВМЕ	Среда содержит уменьшенное количество аминокислот и витаминов. Предназначена для культивирования разных типов клеток. Среда не содержит глицин и серин.
Минимальная среда Игла, MEM	По сравнению с ВМЕ в 5 раз увеличено содержание аргинина, в 4 раза – гистидина, двукратный набор остальных аминокислот, кроме глутамина. Удален биотин. Используется для культивирования большинства перевиваемых линий с повышенными требованиями к питательной среде. Позволяет поддерживать культуры длительное время без дополнительной подкормки. Используется для культивирования клеток при производстве вирусных вакцин, например, против краснухи.
Минимальная среда Игла в модификации Дюлбекко, DMEM	По сравнению с ВМЕ в 5 раз увеличено содержание аргинина. По сравнению с ВМЕ вдвое повышено содержание глутамина, добавлены глицин и серин, количество остальных витаминов и аминокислот увеличено в 4 раза.
Среда RPMI 1640	Синтетическая среда при обогащении сывороткой является приемлемой для культивирования культур клеток.
Среда Лейбовица L 15	Глюкоза заменена галактозой. В систему буфера не добавлен натрия бикарбонат.
Минимальная среда Игла для суспензионных культур, MEMS	В отличие от MEM, содержание MgSO <sub>4</sub> увеличено в 10 раз, отсутствует CaCl <sub>2</sub> , повышено содержание NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .

Трипсин не должен содержать микоплазм, бактерий и грибов. Проводится контроль трипсина на отсутствие вирусной контаминации.

**Выращивание клеточных культур при производстве вирусных вакцинных препаратов.** В настоящее время при производстве промышленных вирусных вакцин используются различные способы репродукции вирусов, которые расположим в хронологическом порядке их использования.

1. *Стационарный способ* (формирование монослоя клеточных культур на стеклянных матрасах емкостью 1,0–2,0 литра, заполненных питательной средой на 10–15 % и помещенных в термостат при соответствующей температуре).

2. *Роллерный способ* (формирование монослоя клеточных культур происходит по всей цилиндрической поверхности бутылей, заполненных 10 % питательной среды (от объема) и помещенных на специальные стеллажи с возможностью вращения бутылей со скоростью 10–12 об/мин). Оборудование для производства роллерным способом выпускает ряд фирм. Одним из лидеров является «New Brunswick Scientific» (США), с моделями шейкерных платформ «Innova». Так, модель 5050/5051 представляет собой универсальную платформу из нержавеющей стали, с регулируемыми полками (3–4), с диапазоном температуры от 4 °С до 60 °С, скорость вращения регулируется от 5 до 400 об/мин, объем среды от от 1,0 л до 20 л, с регулировкой парциального давления кислорода. Близким к роллерному является метод выращивания монослойных клеточных культур в аппаратах Гироген (Хеман АГ). Аппарат Гироген-600 состоит из большого количества стеклянных трубок (длина 2000 мм, диаметр внутренний 19 мм, внешний диаметр 22 мм, с полезной площадью 34 м<sup>2</sup>), помещенных в цилиндр (длина 2040 мм, диаметр 530 мм). Питательная среда вносится в ферментер отдельно или вместе с клеточной суспензией. При этом клетки растут как на внутренней, так и на внешней поверхности стекла, pH среды поддерживается в пределах 7,2–7,4 с помощью подачи газовой смеси из воздуха и углекислого газа. В данном аппарате объем среды составляет 100 л, а объем вируса – 60 л, что обеспечивает высокий выход продукта и снижение себестоимости продукции.

3. *Суспензионный способ* (клетки перевиваемых линий культивируются во взвешенном состоянии, не прикрепляясь к стенкам культуральной

емкости). Суспензионные культуры готовят из монослойных клеточных культур, которые смывают со стекла раствором Версена в присутствии 0,25 % раствора трипсина. Клетки отделяют центрифугированием, суспендируют в свежей среде и приготовленную суспензию помещают в культуральные сосуды или биореакторы, где выращивают при постоянном и достаточно интенсивном перемешивании – 300–350 об/мин.

Фирма «CD Medical» (США) разработала систему для выращивания клеток животных с использованием полых волокон, в которых растущие клетки отделены полупроницаемой мембраной полых волокон от питательной среды. Через капилляры поступает питательная среда, а в противоположном направлении выделяются продукты метаболизма. По сравнению с флаконами на аппаратах данной конструкции можно повысить плотность культуры в 50 раз с одновременным расходом питательной среды.

Фирма «Akzo GMBH» (Германия) разработала аналогичный биореактор с использованием мембранных микрокапилляров. Растущие клетки адгезированы на твердом субстрате, находящемся в экстракапиллярном пространстве, а поверхность капилляров остается свободной для массопереноса. Носителем является тканевый материал, в котором полые волокна являются также субстратом для адгезии клеток. Продукты метаболизма клеток диффундируют через стенки капилляров, а продукты с высокой молекулярной массой остаются в питательной среде и могут быть удалены вымыванием под давлением лактозы, холина, метанола, пероксидов и других продуктов культивирования.

4. *Способ с использованием микроносителей.* Этот способ предполагает использование микроносителей – мелких твердых частиц, на которых клетки растут в форме монослоя. Использование микроносителей дает клеткам, обладающим адгезивными свойствами, все преимущества крупномасштабных суспензионных культур. Использование микроносителей приводит к высокой плотности клеток на единицу объема и увеличивает площадь поверхности. Мы остановимся на трех видах микроносителей производства «Pharmacia» (Швеция).

Cytodex 1 и 2 – микроноситель, представляющий собой прозрачные бусы из поперечно сшитого декстрана. Микропористые бусы прозрачны, на

сферической поверхности находятся положительно заряженные группы. Диаметр носителя около 200 мкм, плотность 1,04 г/мл. Плотность микроносителей должна быть близка к плотности питательной среды, что обеспечивает лучшее суспендирование. Структура бус позволяет обеспечить питание клеток со всех сторон и облегчает наблюдение за процессом культивирования, заражением культуры вирусом и сбором клеток. Cytodex предварительно помещают для набухания в фосфатный буфер с pH 7,5–8,0 при осторожном перемешивании (30–50 об/мин), а затем стерилизуют при температуре 121 °C в течение 20 минут. Используется для производства вирусных вакцин и рекомбинантных белков как в биореакторах, так и в традиционных стационарных монослоях и роллерных культурах клеток.

Cytodex 3 – микроноситель, представляющий собой бусы с желатиновым покрытием.

Cytopore 1 и 2 – микроноситель, представляющий собой частицы гидрофильной обменной целлюлозы (DEAE) с диаметром 230 мкм и плотностью 1,03 г/мл, с диаметром пор 30 мкм. Стерилизация происходит при температуре 121 °C в течение 20 минут. Используется для получения культуры клеток разного вида при производстве гибридов, рекомбинантных белков, а также при выращивании некоторых видов бактерий.

Cytoline 1 и 2 – микроноситель, матрикс которого получен из полиэтилена и кремнезема. Cytoline 1 имеет плотность 1,3 г/мл, Cytoline 2 имеет плотность 1,03 г/мл, размер пор варьирует от 10 до 400 мкм, величина частиц от 2 до 2,5 мм. Используются для выращивания культур различных клеток, гибридов и бактерий в биореакторах.

Хорошо зарекомендовали себя и другие микроносители: DEAE-декстран Superbeads (США), Microdex (Канада), Dormacell (Германия), полиакриламид-Biocarries (США), полистирол-Cytopheres (США), Biosilon (Дания), стекло с пластиковым покрытием – Bioglas (США), Vetreglas (США), DEAE-целлюлоза DE 52/53 (США).

*К микроносителям предъявляют ряд требований:* они должны быть нетоксичны как для клеток, так и для вирусов; матрица во время культивирования должна быть стабильна при столкновении частиц друг с другом;



микроносители должны выдерживать термическую обработку; в идеале, должны повторно использоваться.

Учитывая, что в этой главе рассматриваются вирусные вакцины, остановимся только на бусах микроносителя Cytodex. При таком виде культивирования клеток в биореакторе на микроносителе количество клеток увеличивается в 10–15 раз в течение 5 суток. Суспензия культуры и бус подвергают центрифугированию, среду удаляют и к культуре клеток прибавляют 0,25 % раствор трипсина, суспензию перемешивают при температуре 37 °С с целью отделения культуры клеток от бус. При использовании микроносителей легко осуществлять мониторинг и контроль различных параметров: рН, концентрации питательных веществ, содержания кислорода, углекислого газа и т.п. Отделение продуктов от микроносителей также достаточно просто.

В настоящее время *основные требования, сформулированные к биореакторам для выращивания культуры клеток и вирусов*, можно представить так:

- реакторы должны быть снабжены системами автоматического контроля и регулирования основных параметров культивирования с использованием микропроцессорных систем, преобразователем сигналов от измерительных электродов, газоанализаторами для измерения: O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, рН, температуры, рСО<sub>2</sub>, рО<sub>2</sub>;
- реактор должен быть обеспечен опциями, позволяющими осуществлять подачу суспензии клеток, суспензии микроносителей и вирусов;
- реактор должен быть снабжен системой для отбора проб в процессе культивирования;
- реактор должен быть обеспечен фильтрами 0,2 мкм для подачи питательной среды, растворов бикарбоната натрия, сахаров и др.;
- реактор должен быть обеспечен фильтрами для подачи пара, воздуха, азота, углекислого газа и др.;
- должна быть система охлаждения реактора и поддержания оптимальной температуры культивирования;
- должны быть сенсоры растворенного кислорода;
- должна быть система перемешивания с регулировкой количества оборотов;

- должен быть определитель уровня пенообразования и система пеногашения;

- должна быть система санитарной обработки и система стерилизации реактора (SIP) – Sterizable-in-place;

- реактор может быть снабжен биохимическим анализатором для определения компонентов в процессе культивирования клеток: глюкозы, глютамина, сахарозы, лактозы, холина, метанола, перекиси водорода, галактозы и др.;

- конструктивные особенности должны гарантировать асептическое производство в течение всего времени культивирования;

- при производстве вакцин важным является определение уровня питательных веществ и накопление токсических метаболитов.

Биореакторы выпускаются рядом фирм с объемом от 20 до 1000 литров. В последнее время были созданы для культивирования клеток и более крупные образцы биореакторов с максимальным объемом 8000 литров.

Завершающей технологической стадией производства вирусных живых вакцин является процесс лиофилизации, который рассмотрен в предыдущей главе, описывающей бактериальные вакцины.

**Технология получения живых вирусных вакцин.** Получение культуры клеток проводят в биореакторах, обычно используя три генерации клеток. Для производства вакцин используют культуру клеток, наиболее пригодную для каждого вируса: кори, эпидемического паротита и краснухи.

При изготовлении вирусных вакцин применяют систему посевных серий вируса. Посевной вирус должен полностью отвечать требованиям к производственному штамму.

В случае выращивания культуры клеток в биореакторе культивирование происходит на микроносителях (2,0–6,0 г/л) при температуре, оптимальной для каждого вида клеток (обычно 35–37 °С), в присутствии глюкозы и величины рН 7,2–7,4, например, в среде 199. Когда величина рН начинает снижаться, её корректируют добавлением стерильного раствора натрия бикарбоната. Выращивание проводится в течение 2–7 дней в зависимости от вида культуры клеток и требований производителя вакцины. При выращивании клеток проводится рециркуляция среды со скоростью 1–5 литров в ми-

нута. Затем клетки промывают буферным раствором с pH 7,2–7,4, например, фосфатным буфером, и обрабатывают 0,05–0,25 % раствором трипсина в 0,53 мМ ЭДТА в течение 10–30 минут. Затем осуществляется проведение ещё нескольких пассажей культуры клеток, количество которых зависит от используемой культуры, вида вакцины и технологической схемы производителя вакцины. Условия проведения последующих пассажей аналогичны. Возможно дополнительное добавление микроносителей. Суммарная длительность культивирования клеточных культур может составлять 2–3 недели.

Все пассажи культуры клеток сопровождаются тестированием до и после начала культивирования по следующим показателям: стерильность, содержание клеток, микроскопия клеток, pH.

Культивирование вируса проводят в биореакторе при добавлении к выросшим клеткам последнего пассажа штаммов вируса и микроносителей. В день инокуляции посевной серией вируса каждую клеточную культуру необходимо исследовать на дегенерацию, вызванную инфекционным агентом. Если при этом исследовании в клеточной культуре выявляется присутствие любого постороннего агента, всю группу данных культур запрещено использовать для производства вакцины. Культивирование проводят в течение 3–4 дней при температуре 33,5–35,0 °С. При выращивании вируса проводят контроль величины pH и определение стерильности. По завершению выращивания проводится определение стерильности, посторонних агентов, титра вирусов.

Отделение вируса от дебриса клеток путем стерилизующей фильтрации через мембраны с размером пор 1,2; 0,8; 0,45 и 0,22 мкм. Если для роста клеточных культур используется сыворотка животных, то перед сбором вируса необходимо заменить эту среду на культуральную жидкость, не содержащую сыворотку. Перед заменой среды на культуральную жидкость следует промыть клеточный монослой либо культуральной средой, либо фосфатным буферным раствором с pH 7,2–7,4. Концентрация альбумина сыворотки животных в конечном препарате не должна превышать 50 нг на одну дозу вакцины. В некоторых странах проводятся контрольные испытания на присутствие остаточных количеств сыворотки животных в готовом препарате.

Полученный фильтрат вируса подвергают при необходимости ультрафильтрации с целью очистки и концентрации. Ультрафильтрацию проводят на мембранах с порогом отсека 100 кДа или 300 кДа, при этом проводится не только концентрация вируса, но и очистка от балластных веществ, включая удаление сывороточных компонентов. Сбор содержащей вирус жидкости должен проводиться с помощью метода, одобренного национальным органом контроля. Могут осуществляться многократные сборы вируса, и при этом разовые сборы до объединения в общий пул хранятся при температуре 4 °С. При производстве вирусных вакцин может использоваться удобный и надежный метод для изоляции и очистки клеток вирусов – центрифугирование клеточных суспензий в градиенте плотности, с использованием для этого ряда специальных компонентов, например, Percoll (Redi Grad) или сахарозы в концентрации от 10 до 60 %. При этом можно разделять клетки в седиментационном градиенте по плотности или по размерам на центрифуге типа Beckman с угловым ротором 50,2 Ti при 45–50 тыс. об/мин (нормальное зональное центрифугирование). Вирус обычно собирают из зон 35–40 % сахарозы и концентрируют, например, на центрифуге типа Beckman на роторе SW-28 при 25 тыс. об/мин. Все стадии центрифугирования проводятся при температуре 4 °С.

К полученному концентрату вируса добавляют криопротекторы, определенные для каждой вирусной вакцины, дозировано разливают в первичную упаковку и подвергают замораживанию с последующей лиофилизацией.

Получение вирусных вакцин возможно, используя не только биореакторы, но и стеклянные емкости типа матрацев вместимостью от 1 до 5 литров. Рассмотрим этот вариант на примере получения коревой вакцины.

Для приготовления клеточных культур используют эмбрионы японских перепелов 9–10 дневного возраста. Накануне или в день трипсинизации ткани яйца просматривают с помощью овоскопа в затемненном помещении и отбирают пригодные для производства коревой вакцины (на основании отсутствия внешних повреждений, наличия подвижности эмбриона и хорошо развитой сосудистой системы). Трипсинизацию ткани проводят по общепринятой методике.

Объем клеточной взвеси, используя ростовую среду 199, доводят до требуемого стандарта. Взвесь разливают в емкости для выращивания из расчета около 800000 клеток в 1 мл и вносят посевной вирус в дозе не менее 100000 ТЦД 50 на емкость (например, матрас). Матрасы инкубируют в роллерных условиях при 22–25 об/час и температуре (35 ± 0,5) °С. Через 2–5 дней клеточный слой тщательно отмывают средой 199, чтобы сыворотка животных содержалась не более 50 нг альбумина на одну дозу вакцины, и вносят поддерживающую среду. На 7–8 сутки после заражения вирусом и затем каждые 2–3 суток вирусосодержащую жидкость сливают во флаконы (индивидуальные вирусные сборы). В матрасы добавляют свежую среду в количестве, равном объему снятой вирусосодержащей жидкости. Сбор вирусосодержащей жидкости и замену её свежей средой проводят 3–5 раз до тех пор, пока на поверхности стекла сохраняется 50 % клеток.

Все стерильные индивидуальные вирусные сборы с биологической активностью вируса не ниже 103,5 ТЦД 50 осветляют либо фильтрацией через систему фильтров с различным размером пор, либо центрифугированием с последующей фильтрацией. Надсадочную жидкость из флаконов объединяют в бутыль. К жидкому полуфабрикату добавляют стабилизатор (5 % сорбита и 5 % желатина) и берут пробу для контроля. Содержание антибиотиков не должно превышать 25 мкг на одну дозу. В вакцинах в зависимости от производителя содержатся неомицина сульфат или гентамицина сульфат в указанной концентрации. Жидкий полуфабрикат хранят до разлива при температуре 4 °С не более 25 суток, а при минус 40 °С – не более года. Препарат разливают в ампулы, флаконы или шприцы по 0,1–0,5 мл. Разливают препарат в охлажденном состоянии. Замораживание ампул происходит при температуре минус 40–50 °С. Герметизация ампул после лиофилизации проводится в вакууме.

На рис. 9 приведена схема получения живых вирусных вакцин (корь, краснуха, эпидемический паротит).



Рисунок 9 – Схема получения живых вирусных вакцин (корь, краснуха, эпидемический паротит)

**Контроль готовой вакцины.** Готовая вакцина должна быть стерильной, свободной от микоплазм, микобактерий туберкулеза, посторонних вирусов, должна быть специфически безвредной, содержать в одной прививочной дозе не менее 1000 ТЦД 50, остаточная влажность не должна превышать 2 %, при массовом применении вызывать сероконверсию не менее чем у 90 % привитых детей, и не более 4 % сильных реакций. Вакцины против эпидемического паротита и краснухи получают по такой же схеме, используя соответствующий штамм вируса и культуру клеток.

Одним из методов для определения содержания вирусов в живых вакцинах является *метод бляшкообразующих единиц* – Plaque-forming-units (PFU). Принцип метода заключается в следующем: в культуру клеток, например, клеток Vero, добавляют вирусный препарат и инкубируют в течение определенного времени (около 3 часов) в 5 % атмосфере углекислого газа при температуре, оптимальной для исследуемого вируса. Затем добавляют 1 мл среды с 0,8 % карбоксиметилцеллюлозы и планшеты инкубируют 7–10 дней. Клетки промывают буфером, окрашивают 0,5 % раствором кристаллического фиолетового в 20 % этаноле и окрашивают в течение 20 минут при комнатной температуре. Планшеты промывают водой и подсушивают. Окрашивание монослоя позволяет оценить инфекционность вируса. Живые клетки накапливают краситель, погибшие теряют способность окрашиваться. Поэтому участки клеточного слоя, поврежденные вирусом, выглядят светлыми пятнами на фоне окрашенных клеток. Зависимость между числом образовавшихся бляшек и числом инфекционных вирусных частиц строго линейная, и, следовательно, одна бляшка соответствует одной инфекционной единице. Конечный результат титрования выражается количеством бляшкообразующих единиц (PFU).

Актуальным является определение в живых вакцинах остаточного количества бычьего сывороточного альбумина. При культивировании клеток в состав питательных сред добавляют сывороточные компоненты, основное количество которых удаляется в процессе получения вакцины. В коревой, краснушной и паротитной вакцинах, в соответствии с рекомендациями ВОЗ, содержание бычьего сывороточного альбумина не должно превышать 50 нг в одной дозе препарата. Для определения альбумина предложено несколько методов: иммуоферментный анализ, ракетный иммуоэлектрофорез, одиночная радиальная иммунодиффузия. Выбор метода определяется произво-

дителем вакцины и должен быть подтвержден валидационными исследованиями (специфичность, линейность, предел обнаружения и т.д.). Результаты контроля вакцин против кори, краснухи и эпидемического паротита приведены в табл. 11.

Таблица 11 – Требования к контролю качества вакцин против кори, краснухи и паротита

Наименование показателей	ВАКЦИНЫ			
	Корь	Краснуха	Паротит	Комбинированная
Идентификация	Нейтрализация вируса специфическим антителом в культуре клеток	Нейтрализация вируса специфическим антителом в культуре клеток	Нейтрализация вируса специфическим антителом в культуре клеток	Нейтрализация вируса специфическим антителом в культуре клеток
Стерильность	Отсутствие бактерий, грибов и микоплазм	Отсутствие бактерий, грибов и микоплазм	Отсутствие бактерий, грибов и микоплазм	Отсутствие бактерий, грибов и микоплазм
Содержание вирусов в одной дозе (CCID50) каждого вируса	Не менее $1 \times 10^3$	Не менее $1 \times 10^3$	Не менее $1 \times 10^{3,7}$	Не менее указанных в моновакцине
Термостабильность	Снижение титра не более чем $1 \log_{10}$	Снижение титра не более чем $1 \log_{10}$	Снижение титра не более чем $1 \log_{10}$	Снижение титра не более чем $1 \log_{10}$ для каж-го
Специфическая безвредность на мышах и морских свинках	Безвредна	Безвредна	Безвредна	Безвредна
Остаточная влажность, %	Не более 2,0	Не более 2,0	Не более 2,0	Не более 2,0
Остаточный сывороточный альбумин	Не более 50 нг на дозу	Не более 50 нг на дозу	Не более 50 нг на дозу	Не более 50 нг на дозу
Содержание неомицина сульфата (мг) на дозу	25	25	25	25
Растворимость, мин	не более 3	не более 3	не более 3	не более 3

В Украине в настоящее время используются следующие вакцины.

*Приорикс* – комбинированная вакцина для профилактики кори, краснухи и эпидемического паротита (SmithKline Diological s.a., Бельгия). Лиофилизированная вакцина представляет собой препарат из живых аттенуированных вирусов кори (Schwarz measles), эпидемического паротита (RIT 4385, который является производным штамма Jeryl Lynn) и краснухи (Wistar RA 27/3), полученных путем размножения вирусов в культуре ткани эмбриона цыпленка (вирусы паротита и кори) или в диплоидных клетках человека MRC-5 (вирус краснухи).

*Тримовакс* – комбинированная вакцина для профилактики кори, краснухи и эпидемического паротита (Sanofi Pasteur S.A., Франция).

Применяются также *моновакцины* производства НПО «Микроген» (Россия), Serum Institute (Индия) и др.

Все вакцины являются лиофилизированными препаратами. В комплект препарата входит растворитель – вода для инъекций. В препараты входят вспомогательные вещества, состав которых определяет производитель, обеспечивая безвредность, эффективность и стабильность как в процессе изготовления (включая лиофилизацию), так и в течение всего срока годности живых вакцин. Наиболее часто в препараты вводят: аминокислоты, лактозу, сахарозу сорбит, манитол, натрий хлористый, гидролизированный желатин.

Заболееваемость корью среди привитых живой коревой вакциной и возросшее в последние годы число детей с первичными и вторичными иммунодефицитными состояниями свидетельствует о необходимости создания новых эффективных вакцинных препаратов, лишенных недостатков живых вирусных вакцин. Однако, несмотря на интенсивные исследования, проводимые в ведущих лабораториях мира, изучение и обоснование состава иммуногенного комплекса как основы инактивированной коревой вакцины, не привели к положительным результатам, и такая вакцина на сегодняшний день не создана. Основная проблема при создании инактивированной вакцины – слабая антигенная активность поверхностных антигенов кори. Интерес представляют данные, полученные при включении в бислойную мембрану, полученную из холестерина и фосфатидилэтаноламина, поверхностных антигенов вируса кори (Н и F) и структурных белков вируса (М, NP, Р). Применение таких липосом, нагруженных различными антигенами в смеси адьювантом

Qwil A, позволило в десятки раз увеличить иммунный ответ по сравнению с исходным коревым антигеном.

Несомненный интерес представляют разработки по созданию *аэрозольных вирусных вакцин*. В 2002 году в США была создана корпорация «Aktiv-dry», в задачи которой входит разработка нового поколения вирусных вакцин – создание сухих вакцин в виде порошков, которые можно использовать аэрозольно, исключив инъекционный путь введения. В работе принимают участие специалисты из США, Канады, Франции и Индии. Преимущества такого способа очевидны. Разработки были начаты на модели коревой вакцины. В качестве протекторов в вакцину вводили трегалозу или сахарозу (или и то, и другое), антиоксиданты, поверхностно активные вещества и компоненты буферных растворов. Вакцину вводили ингаляторно и аэрозольно. При ингаляции сухого порошка иммунный ответ был получен меньшего уровня, чем при введении аэрозольно. Аэрозольный путь введения продемонстрировал результаты, аналогичные инъекционному введению. На обезьянах было показана идентичность результата, полученного при изучении иммуногенности и безвредности при использовании инъекционного и аэрозольного пути введения. Коревая вакцина была использована в качестве модели и может быть адаптирована для других детских вирусных вакцин.

При написании этого материала не предполагалось оценивать клиническую эффективность и, тем более, побочные действия данных вирусных вакцин. Эту «неблагодарную» работу решено было оставить клиницистам и врачам-эпидемиологам. Однако события, произошедшие в Украине весной 2008 года при иммунизации детей и подростков вакциной против кори – краснухи производства Индии, внесли определенные коррективы.

В конце 1960-х и в 1970-е годы считалось, что живые вакцины кори, паротита и краснухи являются иммуногенами однократного введения, способными вызвать иммунитет, сохраняющийся на всю жизнь. Исследования напряженности иммунитета показали, что антитела сохранялись на долгий срок. В отсутствие природного стимулирования, уровни антител склонны со временем снижаться. В дополнение к этому, имеется небольшое число лиц, которые по каким-либо причинам неспособны к сероконверсии после введения одной дозы вакцины. Более того, не все дети, которые должны вакцинироваться на втором году жизни, проходят вакцинацию. Это привело к рекомендации о введении второй дозы вакцин против кори, краснухи и эпиде-

мического паротита во многих частях мира на протяжении 1980-х гг., и проверка данных по встречаемости этих трех заболеваний указывает на положительное влияние этого решения.

Хотя введение второй дозы вакцины является принятой стратегией, остается вопрос: когда лучше всего вводить вторую дозу? В США одна группа специалистов рекомендовала вводить вторую дозу перед поступлением в школу (4–5 лет), а другая группа рекомендовала введение второй дозы в возрасте 10–12 лет. Оба эти мнения поддерживаются сильными и обоснованными аргументами. Более раннее введение лучше в смысле удобства (4–5 летних детей легче привлечь к проведению прививок) и более низкой частоты реакции. Частота жалоб на последствия вакцинации у пациентов старшего возраста выше примерно на 50 %, в основном это жалобы на боль в суставах, которая, скорее всего, связана с компонентом краснухи. Это полностью соответствует известному профилю реактогенности вакцины против краснухи и намного более тяжелым последствиям такого заболевания, как краснуха, перенесенного не в раннем детском возрасте. Введение второй дозы перед поступлением в школу также снижает накопление лиц, восприимчивых к заболеванию, и этот довод привел к тому, что, например, Австралия перешла от политики поздней повторной вакцинации к режиму введения перед поступлением в школу. Более поздняя вакцинация лучше с той точки зрения, что она позволяет усилить иммунитет или предоставить его ранее не вакцинированным лицам путем введения этих вакцин, в частности, против краснухи, по мере приближения людей к детородному возрасту, и снизить вероятность врожденного синдрома краснухи. Также было показано, что этот метод хорошо работает с серологической точки зрения. Третий подход, обсуждавшийся в Великобритании, состоит в том, что вторая доза вакцины не должна автоматически вводиться всем детям, а должна вводиться только тем, кто обладает идентифицируемой серонегативностью или не был вакцинирован ранее. Аналогичного мнения придерживаются и российские эпидемиологи. Изучив напряженность иммунитета у детей, поступающих в школу (6–7 лет), было обнаружено, что только 10 % (4,6 % серонегативных и 5,4 % с минимальными титрами) нуждались в ревакцинации. По их мнению, это ставит под сомнение целесообразность массовой ревакцинации против кори. Одновременно ими предложено перенести ревакцинацию на более ранние сроки (2–3 года). В целом, общее мнение склоняется в сторону более раннего вве-

дения второй дозы вследствие удобства этого подхода, а также возрастающего понимания того, что снижение иммунитета является меньшей проблемой, чем редкие случаи неправильного срабатывания первой дозы вакцины и более распространенные случаи отсутствия вакцинации. В США рекомендовано снизить возраст первичной иммунизации с 18 месяцев до 12–15 месяцев, чтобы приспособить ее к остальному режиму вакцинации. Необходимо отметить, что в Украине первичная иммунизация проводится у детей в возрасте 12 месяцев (см. табл. 1). Отставив в сторону вопрос о времени, наиболее важным параметром, как и для любой вакцины, является охват населения. Серологические исследования и вспышки кори в начале 90-х гг. и 2003–2005 гг. показывают, что энергичное внедрение политики вакцинации с целью обеспечения охвата и выработки популяционного иммунитета является ключевым в контроле заболевания.

Вакцины против трех вирусных инфекций имеют, по крайней мере, два общих свойства, обуславливающих появление предостережений и противопоказаний в инструкции по применению. Во-первых, компоненты вакцины против кори и паротита производятся в определенной системе яиц с развивающимся эмбрионом. Например, вирусы кори и паротита выращиваются в культуре клеток, отобранных из яиц с развивающимся эмбрионом, в то время как другие могут выращиваться непосредственно в яйцах. Многочисленные исследования показали, что можно безопасно проводить вакцинацию лиц с аллергией на яйца, хотя в редких случаях может возникнуть реакция. На основании этих данных различные группы, разрабатывающие принципы вакцинации, рекомендовали более не считать аллергию на яйца противопоказанием к вакцинации против кори, краснухи и эпидемического паротита, хотя, как и для любой вакцины, должны иметься средства лечения какой-либо анафилактической реакции. Вторым противопоказанием, распространенным в случае живых вирусных вакцин, является вакцинация лиц с ослабленным иммунитетом. Особое беспокойство вызывают ВИЧ-положительные лица. После рассмотрения имеющихся данных и оценки соотношения параметров риска и преимуществ в случае тяжелой кори у ВИЧ-положительных лиц, сейчас рекомендует проведение вакцинации MMR у ВИЧ-положительных лиц, у которых болезнь протекает бессимптомно, в обычном порядке, а также рассмотрение этого варианта для больных с наличием симптомов ВИЧ. Третьим пунктом, требующим рассмотрения, является вакцинация детей с нетя-

желыми заболеваниями (насморк, кашель и т.д.). Ранее рекомендовали отложить вакцинацию до полного выздоровления ребенка. В последнее время, на основании собранных данных, ВОЗ изменила эти рекомендации и позволяет проводить вакцинацию детей с нетяжелыми заболеваниями. В инструкции по применению используемых сегодня в Украине вирусных вакцин к противопоказаниям относятся острые инфекционные заболевания, прогрессирующие заболевания (острые или хронические), врожденные или приобретенные иммунодефициты, подтвержденные аллергические реакции на белок куриных яиц.

Мы остановимся еще на одном вопросе, широко дискутируемом сегодня: существует ли взаимосвязь между вакцинацией вирусными вакцинами кори, краснухи, эпидемическим паротитом и аутизмом? Обсуждение безопасности и риска побочных эффектов ведется с 1998 года, когда в феврале в журнале «Lancet» появилась статья доктора А. Wakefield с соавторами, которые предположили наличие связи между вакцинацией и аутизмом, вызванной сбоем иммунной системы ребенка при введении трех вакцинных вирусов. Ими была изучена кишечная патология у 12 детей после введения вакцин. У 11 детей была обнаружена гиперплазия, которая сопровождалась аутизмом у 9 детей, психическими расстройствами у 1 ребенка и у 2 детей энцефалопатическими осложнениями. Уже в марте 1998 года международная группа экспертов пришла к выводу об отсутствии данных о наличии связи между вакцинацией, кишечными расстройствами и аутизмом. В апреле этого же года финские ученые на 3 млн вакцинированных выявили только 31 ребенка с признаками диареи или рвоты. Ни одного случая аутизма у 31 человека не выявлено.

Большой вклад в вопрос об аутизме при вакцинации внесли эпидемиологи Японии. В 1993 году в Японии была полностью отменена вакцинация против кори, краснухи и эпидемического паротита, которая была возобновлена только спустя 10 лет. Анализ детей с диагнозом аутизм показал, что в 1988 году (вакцинация проводилась) на 10000 детей выявлено 48 человек с диагнозом аутизм, а в 1996 году (вакцинация уже не проводилась) на 10000 детей выявлено 117 человек с диагнозом аутизм, что, по мнению исследователей, свидетельствует об отсутствии причастности вакцинации к появлению аутизма у детей.

В 2003 году ВОЗ поручила независимым исследователям провести обзор литературных данных о связи аутизма и вакцины корь – краснуха – паротит. Исследователи изучали данные о влиянии природных и вакцинных штаммов кори на развитие воспалительных процессов в пищеварительном тракте и, как отдельный вопрос, связь воспаления кишечника и аутизма. Достоверных данных, подтверждающих эту связь, не обнаружено.

В 2006 году был опубликован международный доклад о вакцине MMR, в котором воедино была собрана информация с большинства стран мира, и вывод был сделан однозначный: болезнь Крона и аутизм не являются побочным действием вакцинации. В этом же году доктору А. Wakefield было предъявлено обвинение в серьезных профессиональных ошибках и безответственности, так как его публикации привели к снижению охвата детей при вакцинации. Последнее привело к тому, что в Лондоне в 2003 году было 4204 случаев заболевания корью, а в 2005 году было уже 56390 больных.

Об отсутствии связи между вакцинацией и аутизмом говорят специалисты Бостонского медицинского университета, которые обследовали 305 детей, больных аутизмом. Увеличение выявляемых больных аутизмом они связывают с улучшением диагностики этого заболевания. Кроме того, исследователи не могут исключить влияние факторов окружающей среды.

По заключению Американской академии педиатрии и Федерального суда США, на сегодняшний день не существует определенных научных доказательств, что любая моновакцина или комбинированная вакцина могут вызвать аутизм.

Минздрав Украины совместно с ВОЗ планировал проведение среди населения Украины массовой дополнительной вакцинации против кори и краснухи населения возрастной группы от 15 до 29 лет. Основанием для этого стала вспышка кори в 2005–2006 годах, когда заболело 46 тысяч человек. В Украину была завезена вакцина, изготовленная в Индии, «Serum Institute». Планы были нарушены одним летальным случаем в городе Краматорске и госпитализацией около 100 человек. Срыв вакцинации произошел, по нашему мнению, из-за ряда факторов: несвоевременной, а зачастую противоречивой информацией об этих событиях, низким уровнем информированности медицинского персонала и населения, низкой степенью организации проведения вакцинации со стороны Минздрава и т.д. Выступающие представители Минздрава Украины были неубедительны, и их информация в ряде случаев

значительно различалась. Прошедшие события поставили под угрозу не только вакцинацию против кори-краснухи, но и значительно укрепили мнение у населения о нецелесообразности проведения вакцинации в целом. Мнения были различны: от полного отрицания вакцинации до мнения о необходимости проведения контроля противовирусных антител у человека и только при их отсутствии проводить вакцинацию. Очень обидно, что в Украине «погоду» в необходимости вакцинации населения определяют не специалисты-эпидемиологи и педиатры, а средства массовой информации. Необходимо поднимать вопросы о качестве и контроле используемых вакцин, условиях их хранения и транспортировки, правильности проведения самой манипуляции и осмотра врачами детей перед вакцинацией, что делается не всегда и в неполном объеме. Обязательной является информированность родителей. В этом случае противодействие в вопросе проведения вакцинации детей будет сведено к минимуму.

### 1.5.2. Полиомиелит

В мире более 10 млн детей и взрослых страдают параличами вследствие перенесенного полиомиелита. В 1988 году Всемирная ассамблея здравоохранения поставила перед ВОЗ задачу ликвидации полиомиелита на планете с полным прекращением циркуляции дикого вируса полиомиелита. За последние годы количество случаев полиомиелита сократилось более чем в 10 раз. Существуют территории, свободные от циркуляции дикого вируса, который является основным источником полиомиелита, завозимого из регионов, неблагополучных по полиомиелиту. Программа, разработанная ВОЗ по ликвидации полиомиелита, предусматривает создание системы регистрации острых вялых параличей, контроля за циркуляцией вируса полиомиелита и сертификации территорий на отсутствие полиомиелита. В соответствии с планами ВОЗ, датой глобальной эрадикации полиомиелита был установлен 2005 год. В странах регионов, освободившихся от полиомиелита, периодически регистрируются заносные случаи полиомиелита, вызванные «дикими» полиовирусами (Канада, Грузия, Болгария и другие). Полиомиелит вызывается вирусом из рода энтеровирусов, который имеет три серотипа: 1, 2 и 3. Наименьшая генетическая стабильность присуща вирусу третьего типа. Полиовирусы устойчивы к кислой среде и сохраняют жизнеспособность при

температуре 0–8 °С в течение многих месяцев. Из вируса выделены два самостоятельных антигена – Д и С, хотя антигенная структура вируса является более сложной. Человек является единственным резервуаром для полиовируса, который распространяется фекально-оральным или орально-оральным способом. Возможен аспирационный механизм заражения с воздушно-капельным и воздушно-пылевым путем передачи. Дикий вирус фиксируется на эпителиальных клетках глотки и кишечника, проникает в клетки и размножается в них. Вирус поступает в шейные и мезентериальные лимфатические узлы, а оттуда через лимфатический грудной проток – в кровь. В течение 1–1,5 месяцев вирус полиомиелита выделяется с фекалиями и выделениями носоглотки. В центральную нервную систему вирус проникает вдоль нервных волокон и разрушает двигательные нейроны, что приводит к развитию вялых параличей.

Первой вакциной против полиомиелита был препарат, инактивированный с помощью формалина, предложенный Jonas Salk в 1955 г. Это была в определенной степени эффективная вакцина, но вскоре стало ясно, что для достижения оптимального снижения распространения полиомиелита необходима более иммуногенная вакцина. В 1950-х гг. было предпринято несколько попыток к созданию живой аттенуированной вакцины. Одна из них, описанная Сох, состояла в пассировании полиовируса в мозгу хомяков-сосунков и последующей адаптации в желточном мешке куриного яйца с развивающимся эмбрионом.

Стратегией, которая позволила добиться успеха, было пассирование вируса в культуре клеток тканей приматов и селекция вариантов вируса с ослабленными нейротропными свойствами, которая была впервые получена Sabin, Koprowski и Melnick.

В настоящее время для профилактики полиомиелита применяется два типа вакцин: живая полиомиелитная вакцина для орального применения (ОПВ) и инактивированная полиомиелитная вакцина (ИПВ). Мы рассмотрим основные технологические принципы получения указанных препаратов.

Титр вируса (количество инфекционных единиц в 1 мл препарата) определяется с помощью методов предельных разведений подсчета локальных повреждений (бляшек). На монослой культуры клеток наносятся разведения препарата, содержащего живые вирусы. Зараженный монослой инкубируют при определенных условиях, при которых потомство вируса, образо-



вавшееся в первоначально зараженных клетках, не может свободно распространяться по клеточному слою, однако дочерние вирусные частицы способны инфицировать клетки, расположенные в непосредственной близости от первоначально зараженной клетки. Чтобы ограничить распространение вируса по клеточному слою, обычно используют агаровое покрытие. Окрашивание монослоя нейтральным красным позволяет оценить инфекционность вируса. Живые клетки накапливают краситель, погибшие теряют способность окрашиваться. Поэтому участки клеточного слоя, поврежденные вирусом, выглядят светлыми пятнами на фоне окрашенных клеток. Зависимость между числом образовавшихся бляшек и числом инфекционных вирусных частиц строго линейная, и, следовательно, одна бляшка соответствует одной инфекционной единице. Конечный результат титрования выражается количеством бляшкообразующих единиц (БОЭ). Возможно определение активности вируса путем заражения чувствительных для данного вируса животных или клеточных культур. Развивается инфекционный процесс, который проявляется в летальном исходе у животных или в разрушении культуры клеток. Используют следующие критерии оценки:

- ИД<sub>50</sub> (50 % инфицирующая доза) – доза вируса, способная заразить 50 % животных;
- ЛД<sub>50</sub> – доза летальная для 50 % животных;
- ЭИД<sub>50</sub> – доза, инфицирующая 50 % эмбрионов;
- ЦПД<sub>50</sub> – доза, вызывающая цитопатический эффект у 50 % зараженных культур.

**Живая полиомиелитная вакцина для орального применения.** Вакцина представляет собой трехвалентный препарат из аттенуированных штаммов Sabin вируса полиомиелита типов 1, 2, 3, полученных на первичной культуре клеток почек африканских зеленых марьшшек или диплоидной культуре клеток человека. Вакцину выпускают в жидком виде 2 мл (10 доз). В одной прививочной дозе (0,2 мл или 4 капли) содержится инфекционных единиц: тип 1 – не менее 1 млн; тип 2 – не менее 0,1 млн; тип 3 – не менее 0,3 млн. Вакцина должна приживляться на слизистой оболочке кишечника и вызывать местный и общий вакцинальный процесс, приводящий к стойкости специфического иммунитета.

Самостоятельным вопросом получения живых вирусных вакцин является процесс аттенуации штаммов. Штаммы, использованные в вакцине

Sabin, отбирались на основе сниженного роста нейронов обезьян: макак и шимпанзе. За последние 20 лет молекулярно-биологические методы позволили выявить основу аттенуации. Ключевой частью информации, представляющей собой отправную точку, является редкая, но устойчивая реверсия вакцинных штаммов и появление паралитического полиомиелита, ассоциированного с вакциной. Это явление дало возможность определить, какой генетический состав коррелирует с безопасностью и какие изменения определяют нейровирулентность. Геном вируса полиомиелита составляет примерно 7,5 тыс. оснований и кодирует 12 белков. Геном транслируется с образованием одного длинного полипротеина, который затем разрезается кодируемой вирусом сайт-специфической протеазой. На 5' конце, или левом конце, как обычно изображают геном, имеется длинная нетранслируемая последовательность примерно в 750 нуклеотидов. Эта последовательность формирует последующие вторичные структуры, которые взаимодействуют с белками, необходимыми для трансляции и репликации. При сравнении нуклеотидных последовательностей вакцинных штаммов, их предшественников дикого типа и многочисленных изолированных вирусов, полученных в случаях возникновения ассоциированного полиомиелита, можно определить мутации, общие для вирусов, проявивших вирулентность в организме человека. Таким образом, можно отметить, что для реверсии к нейровирулентности необходима единственная мутация в 5'-нетранслируемой последовательности в положениях 480 (тип 1), 481 (тип 2) и 472 (тип 3). Вакцинный штамм типа 3 наиболее часто из трех существующих возвращается к исходному состоянию. Вакцина типа 2 возвращается к исходному состоянию реже, и для нее был описан аналогичный набор минимальных мутаций. Вирусной вакцине типа 1 свойственна большая стабильность, чем типам 2 и 3, поскольку она возвращается к исходному состоянию и вызывает ассоциированный полиомиелит крайне редко.

**Технология изготовления живой полиомиелитной вакцины.** Вакцинные штаммы вируса полиомиелита являются полностью безвредными для человека аттенуированными штаммами вируса полиомиелита трех иммунологических типов: типа 1 – LSc 2ab, типа 2 – P 712 Ch 2 ab, типа 3 – Leon 12 alb. Эти штаммы были выделены автором технологии вакцины Sabin. Штаммы контролируют по следующим тестам: уровень остаточной вирулентности, оцениваемой с помощью лабораторных тестов на обезьянах и генетических

маркеров, gct 40; D-антигенному признаку; имеют титр не менее  $10^7$  БОЕ/мл; не содержат посторонних вирусных агентов, в том числе SV40, не содержат микобактерий туберкулеза, других бактерий, микоплазм и грибов. Вирусы должны храниться при температуре минус 60 °С и ниже. Контроль SV40 должен проходить с использованием амплификации с помощью полимеразной цепной реакции. Что это за вирус и почему его определению уделяют особое внимание? Вирус SV40, который может контаминировать полиомиелитную вакцину, связан с развитием рака. Этот вирус, обнаруженный исследователями в различных видах опухолей, разрушает защитный механизм организма путем отключения белка, который предохраняет клетки от превращения в раковые. Впервые вирус SV40 был обнаружен в 1961 году в клетках почек обезьян, которые используют для приготовления полиомиелитной вакцины. Поэтому с 1961 года клетки обезьян, используемых для приготовления полиомиелитных вакцин, контролируют на наличие вируса SV40.

*Получение культуры клеток обезьян.* Для выращивания культур клеток почек обезьян используют специальные питательные среды для вирусологических исследований: среда Игла, среда 199 с добавлением 0,5 % ферментативного гидролизата белка. В среды выращивания культуры клеток добавляют 5–10 % фетальной сыворотки телят. Сыворотка, используемая для размножения клеток при тестировании, должны быть свободна от бактерий, грибов и микоплазм. Необходимо также обращать особое внимание на источник получения сыворотки в связи с возможностью присутствия у животных энцефалопатических агентов. Запрещено использовать сыворотку человека.

*Трипсинизацию почечной ткани* проводят 0,25 % раствором трипсина, растворенным в 0,01 М фосфатном буфере с рН около 7,0–7,5, но без сыворотки. Культуру клеток получают инкубированием при температуре 37 °С. Для дальнейшего производственного процесса считают пригодными только те партии культур клеток, в которых не регистрировалось никаких признаков дегенерации монослоя клеток или микробной контаминации. Общее число выбракованных по неспецифическим причинам культур используемой партии не должно превышать 10 %. Для определения контаминации посторонними вирусными агентами оставляют незараженными от 10 до 25 % культур клеток от каждой партии. За контрольными культурами наблюдают в течение 14 дней с момента заражения посевным вирусом основной части производ-

ственной партии клеток. Трипсин, полученный от крупного рогатого скота, должен быть свободен от грибов, бактерий, микоплазм, вирусных агентов, в том числе парвовирусов, и контаминации энцефалопатическими агентами.

Перед заражением вирусом культуры клеток промывают раствором Эрла или Игла для освобождения от сывороточных белков. Для размножения вируса используют ту же среду, что и для выращивания клеток, но без сыворотки. Инокуляцию культур клеток посевным вирусом производят путем введения в емкости с культурой клеток питательной среды, содержащей вирус полиомиелита с титром не менее  $10^7$  БОЕ/мл. Культуру клеток инкубируют при температуре ( $34 \pm 0,5$ ) °С в течение 3–4 дней. Штаммы Sabin адаптированы к размножению при указанной температуре. В случае повышения температуры при их культивировании может произойти реверсия полиовирусов в сторону вирулентного фенотипа, поэтому весьма важно сохранять температуру инкубирования зараженных культур клеток на строго определенном уровне.

*Культуры с полной дегенерацией клеток отбирают для сбора вирусосодержащей жидкости*, которую собирают в отдельные емкости от каждой партии клеток. Из каждой емкости отбирают образцы для проведения контроля. На период контроля вирусосодержащую жидкость хранят при температуре минус 20 °С.

Вирусосодержащую жидкость контролируют по следующим показателям: стерильность, титр вируса, определение контаминации другими вирусами, определение подлинности, которое проводят путем серологического контроля вирусов с соответствующими антисыворотками (гетерологичными и гомологичными) или соответствующими моноклональными антителами. Концентрацию титра вируса определяют в сравнении со стандартным референтным препаратом, используя тест нейровирулентности на обезьянах или альтернативный метод на трансгенных мышях линии TgPVR для типа вируса 1 и 2 (введение мышам вакцины должно в течение 14 дней привести к параличу и гибели всех мышей). Определение нейровирулентности проводится по определению паралитогенной активности вируса не только при интрацеребральном заражении обезьян, но также при интраспинальной инокуляции препарата. Однако последнее время все шире применяется метод определения нейровирулентности *in vitro* в реакции ПЦР для количественного

определения нуклеотида 472 и определении генетических маркеров gct/40 и b gct/40 + для типа вируса 3.

Первичные сборы вируса одного типа, прошедшие все необходимые контроли, объединяют. После перемешивания сведенной вирусодержащей жидкости из емкости берут образцы для контроля стерильности на бактерии, грибы, микоплазмы. Затем вирусодержащую жидкость подвергают сепарированию для удаления клеточного дебриса.

*Полученный осветленный фильтрат вирусодержащей жидкости подвергают фильтрации* через глубинные фильтры, а затем проводят через стерилизующие мембраны с размером пор 0,22 мкм. Из стерильного препарата отбирают образцы на контроль и хранят препарат при температуре минус 20 °С до окончания контроля.

*Контроль препарата in bulk* проводят в соответствии с рекомендациями ВОЗ по следующим показателям:

- стерильность – бактерии, грибы, микоплазмы;
- рН, контроль вирусной контаминации методом ПЦР;
- тесты на подлинность вирусов полиомиелита:

✓ по методу, рекомендованному ВОЗ «Mutant Analysis by PCR and Restriction Enzyme Cleavage (MAPREC) for oral poliovirus (Sabin) vaccine»;

✓ по методу определения нейровирулентности на обезьянах;

✓ по альтернативному методу на трансгенных мышях – TgPVR21 для полиовируса 3 типа по рекомендациям ВОЗ «WHO neurovirulence test of type 3 live poliomyelitis vaccines (oral) in transgenic mice susceptible to poliovirus». Трансгенные мыши, в чей геном вставлен ген, кодирующий белок, который является человеческим рецептором для вирусов, чувствительны к полиовирусам всех трех типов. Интраспинальное введение таким мышам образцов вакцин позволяет выявить серии вакцины с отличной от нормы нейровирулентностью. Данный метод может быть альтернативным при исследовании нейровирулентности живых полиомиелитных вакцин и заменить обезьян, низших приматов, являющихся единственными животными, чувствительными к этой инфекции.

По данным специалистов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М. П. Чумакова (Россия), высокоэффективным оказался молекулярно-биологический метод, основанный на использовании полимеразной цепной реакции и рестрикционного анализа и позволяющий количе-

ственно оценивать содержание менее 1 % мутантов в популяции. При проведении анализа посевных вирусов более 20 моновакцин 3 типа и более 50 первичных сборов вируса, которые использовали при получении моновакцин, была показана высокая чувствительность, воспроизводимость и четкая корреляция между молекулярно-биологическими данными и результатами определения остаточной нейровирулентности на обезьянах. Этот метод должен быть использован для контроля производства живой полиомиелитной вакцины на всех этапах технологии. В попытке разработать тесты, не основанные на использовании приматов, было получено несколько альтернатив. Как указано выше, одним из них является набор трансгенных мышинных моделей, в которых человеческий ген полиовирусного рецептора замещает аналогичный ген мыши. Полученная мышинная модель поддерживает рост полиовируса человека, а после интраспинальной инъекции нейровирулентного штамма у нее развиваются клинические симптомы паралича. Одна мышинная модель, линия TgPVR21, подходит для тестирования типов 2 и 3; вторая мышинная модель, TgPVR1, может быть использована для тестирования типа 1. Второй набор тестов, основанный на молекулярных методах, измеряет наличие и соотношение мутаций в критической точке 5'-нетранслируемого региона. Наиболее современный тест, известный как тест MAPREC, хорошо коррелирует с испытанием трансгенных мышей, а также с тестом нейровирулентности на обезьянах. Были разработаны также аналогичные тесты, основанные на хемилюминесценции или эффективности трансляции.

*Прошедший контроль препарат разливают в первичную упаковку* шприцевым методом в асептических условиях по 2 мл (10 доз). Объем одной дозы 0,2 мл или 4 капли.

*Вакцину в первичной упаковке (флаконы) подвергают контролю.* Препарат проходит контроль по аналогичным методикам, описанным для контроля in bulk. Необходимо отметить, что контроль полиомиелитных вакцин является наиболее сложным и ответственным этапом их изготовления. Это связано с тем, что вакцина должна сохранять исходный уровень остаточной нейровирулентности авторских полиовирусов и не должна содержать никаких посторонних вирусных и других агентов. Все испытания вакцины должны осуществляться на фоне референс-вакцины соответствующего типа.

В одной дозе препарата (0,2 мл) содержится:

- 1 тип – 1000000 инфекционных единиц;

- 2 тип – 100000 инфекционных единиц;
- 3 тип – 300000 инфекционных единиц.

В одной дозе вакцины содержится стабилизатор –  $MgCl_2$  в количестве 18 мг и антибиотик – канамацин в количестве 30 мкг.

**Технология изготовления инактивированной вакцины полиомиелитной, трехвалентной.** Вакцина представляет собой трехвалентный препарат из инактивированных штаммов вируса полиомиелита типов 1 (Mahoney), 2 (MEF-1), 3 (Saukett), полученных на первичной, вторичной культуре клеток почек африканских зеленых мартышек (Vero) или диплоидной культуре клеток человека. Вакцину выпускают в жидком виде 1 мл (2 дозы). В одной прививочной дозе (0,5 мл) содержится D-антигенных инфекционных единиц: тип 1 – не менее 20, тип 2 – не менее 4, тип 3 – не менее 16.

*Получение культуры клеток* проводят в биореакторах, используя три генерации клеток:

- 1-ый пассаж проводится на микроносителях 3,5–4,0 г/л при температуре 37 °С в присутствии глюкозы и величине рН около 7,2. Когда величина рН снижается, её корректируют добавлением стерильных растворов натрия бикарбоната. Выращивание проводится в течение 5–7 суток с рециркуляцией среды (2 литра в минуту). Клетки промывают дважды 0,01 М фосфатным буфером с рН 7,3. Полученную культуру клеток 1-го пассажа подвергают 15–25-ти минутной трипсинизации путем добавления в биореактор раствора трипсина в цитратном буфере до конечной концентрации 0,25 %. Процесс проводят при незначительном постоянном перемешивании;

- 2-ой пассаж проводится на микроносителях при температуре 37 °С в присутствии глюкозы и величине рН около 7,2. Когда величина рН снижается, её корректируют добавлением стерильных растворов натрия бикарбоната. Выращивание проводится в течение 4–7 суток с рециркуляцией среды (2 литра в минуту). Клетки промывают дважды 0,01 М фосфатным буфером с рН 7,3. Проводят постоянный контроль глюкозы и при снижении её концентрации менее 5,5 mM добавляют необходимое количество глюкозы. Полученную культуру клеток 2-го пассажа подвергают 15–25-ти минутной трипсинизации путем добавления в биореактор раствора трипсина в цитратном буфере до конечной концентрации 0,25 %. Процесс проводят при незначительном постоянном перемешивании. Затем к клеткам добавляют питательную среду и дополнительную порцию микроносителя;

- 3-й пассаж проводится путем переноса трипсинизированных клеток в биореактор с питательной средой, добавляют микроноситель в количестве 1,5–3,0 г/л. Затем корректируют рН бикарбонатом натрия при снижении величины ниже 7,2 и содержание глюкозы при снижении её содержания в растворе менее 5,5 mM. Культивирование продолжают в течение 3–6 дней.

Все три пассажа культуры клеток сопровождаются тестированием до и после начала культивирования по следующим показателям: стерильность, содержание клеток, микроскопия клеток, рН, осмолярность.

*Культивирование вируса* проводят в биореакторе при добавлении к выросшим клеткам 3-го пассажа штаммов вируса и микроносителей. Культивирование проводят в течение 3–4 дней при температуре  $(34 \pm 0,5)$  °С. Каждый вирус выращивается в отдельном реакторе. При выращивании вируса проводят контроль величины рН, стерильности. По завершению выращивания проводится определение стерильности, посторонних агентов, титра вируса и D-антигенов, которые являются маркерами эффективности вакцины. D-антигены определяют количественно иммуноферментным анализом (ELISA), используя поликлональные антисыворотки или моноклональные антитела против вируса полиомиелита.

*Отделение вируса от дебриса клеток путем стерилизующей фильтрации* через мембраны с размером пор 1,2; 0,8; 0,45 и 0,22 мкм. Полученный фильтрат вируса подвергают ультрафильтрации с целью очистки и концентрации. Критическими точками является определение биоагрузки и D-антигенов.

*Проведение хроматографии гель-фильтрацией* на колоночном сорбенте в 0,04 М фосфатном буфере при рН – 7,0. На этой стадии проводят определение D-антигена, биоагрузки, белкового азота, соотношения экстинций E-260/E-280.

*Проведение ионно-обменной хроматографии* на колоночном сорбенте в 0,04 М фосфатном буфере при рН – 7,0. На этой стадии определяют биоагрузку, белковый азот и D-антиген.

Для очистки инактивированных вирусных вакцин может использоваться макропористое стекло, получаемое путем обработки двухфазного натриево-боросиликатного стекла сначала кислым, а затем щелочным раствором. При такой обработке из стекла извлекаются все компоненты боратной фазы, а богатая кремнеземом фаза сохраняется в пористом стекле в виде губчатого

скелета, образованного почти чистым кремнеземом. Поверхность макропористого стекла образуется в водных растворах, поэтому она гидратирована, несет группы типа Si–OH или Si–(OH)<sub>2</sub> и проявляет свойства слабого катионита. Было установлено, что взаимодействие вирусов с поверхностью макропористого стекла обусловлено рядом взаимодействий (ионное, гидрофобное и др.). Вирус связывается с поверхностью сорбента избирательно, так как конкурирует с молекулами примесей за места на поверхности сорбента. Ослабляет взаимодействие вируса с сорбентом трис-HCl, NaCl, мочевины. Для десорбции вируса с сорбента повышают pH элюента, а также его ионную силу за счет увеличения концентрации натрия хлористого и триса.

*Стандартизация суспензии вируса* осуществляется путем разведения средой 199, водой для инъекций, буферными солями (натрий карбонат и натрий фосфаты) и стабилизатором глицин.

*Полученную стандартизованную суспензию вируса подвергают стерилизующей фильтрации* через мембраны с размером пор 0,22 мкм. На этой стадии препарат контролируют на стерильность, титр вируса, pH (величину которого при необходимости корректируют 1M NaOH), содержание D-антигена.

*Инактивация полученной суспензии вируса* проводится в две стадии:

а) к суспензии прибавляют раствор формальдегида и выдерживают 6–7 дней при температуре 35 °С, постоянно контролируя величину pH, и при её сдвиге в кислую сторону (менее 7,0) в суспензию добавляют 1M раствор NaOH;

б) суспензию подвергают стерилизующей фильтрации через фильтры с мембранами с размером пор 0,22 мкм. После чего проводят дальнейшую инактивацию до 13 дней.

*Из инактивированной суспензии вируса (in bulk) отбирают пробы для проведения следующих тестов:* стерильность, полнота инактивации. Контроль инактивации вируса проводят на первичной культуре клеток, наиболее чувствительных к вирусу полиомиелита: используют два образца с объемом материала, эквивалентным 1500 человеческим дозам, который добавляется к культуре клеток таким образом, чтобы образец приходился на 3 см<sup>2</sup>. Наблюдение проводят в течение 2 недель. Также проводятся тесты клеточной ДНК (не более 10 нг / на одну человеческую дозу), содержания D-антигенных единиц (1-го типа вируса – не менее 300, 2-го типа вируса – не менее 60, 3-го ти-

па вируса – не менее 240), свободного формальдегида (не более 0,2 г/л), белкового азота (не более 100 мкг/мл), бактериальных эндотоксинов (не более 50 МЕ/мл), величины pH (6,8–7,4), бычьего сывороточного альбумина (не более 500 нг/мл). Эффективность вакцины определяют либо методом ELISA, или методом *in vivo* на крысах. Десятерым крысам вводят внутримышечно в подобранных разведениях по 0,5 мл вакцины. Крысы, отобранные для этого испытания, должны быть проверены на отсутствие антител к вирусу полиомиелита. Через 21 день после иммунизации у крыс производится забор крови. Сыворотка, полученная из этих образцов, контролируется методом ELISA по титру нейтрализации против трех типов вируса полиомиелита. На период контроля вакцина находится на хранении при температуре 2–8 °С.

*Вакцину in bulk различных типов вируса объединяют*, в установленных соотношениях разводят фосфатным буфером (в состав буферного раствора входят: натрий дигидрофосфат моногидрат, динатрий гидрофосфат дигидрат, натрия хлорид, калия хлорид, магния сульфат гептагидрат, кальция хлорид дигидрат и феноловый красный) до регламентируемых количеств антигенных единиц D.

Препарат контролируют по указанным тестам. *После завершения контроля вакцину подвергают разливу в первичную упаковку* (стеклянные ампулы или флаконы). Готовый препарат контролируют в соответствии с рекомендациями ВОЗ, требованиями Европейской фармакопеи и нормативной документацией фирмы производителя. В готовом препарате определяют: содержание D-антигенов (в 1 мл вакцины должны содержаться D-антигенные единицы: тип 1 – не менее 40, тип 2 – менее 8, тип 3 – не менее 32), pH (6,8–7,4), белковый азот (не более 10 мкг/мл), бактериальные эндотоксины (не более 10 МЕ/мл), стерильность, объем наполнения (не менее 1,1 мл).

Контроль осуществляется при сравнении с референс-препаратом – первым международным стандартом, введенным в 1994 году, и вторым международным стандартом, введенным в 1991 году, представляющим собой лиофильно высушенные сыворотки крови человека, содержащие антитела к вирусу полиомиелита типов 1, 2 и 3. Эти стандарты необходимы для калибровки национальных стандартов.

Таким образом, на сегодняшний день мировое сообщество для профилактики полиомиелита использует два вида вакцин: живую оральную и инактивированную внутримышечную. Схема получения вакцины против полиомиелита показана на рис. 10.

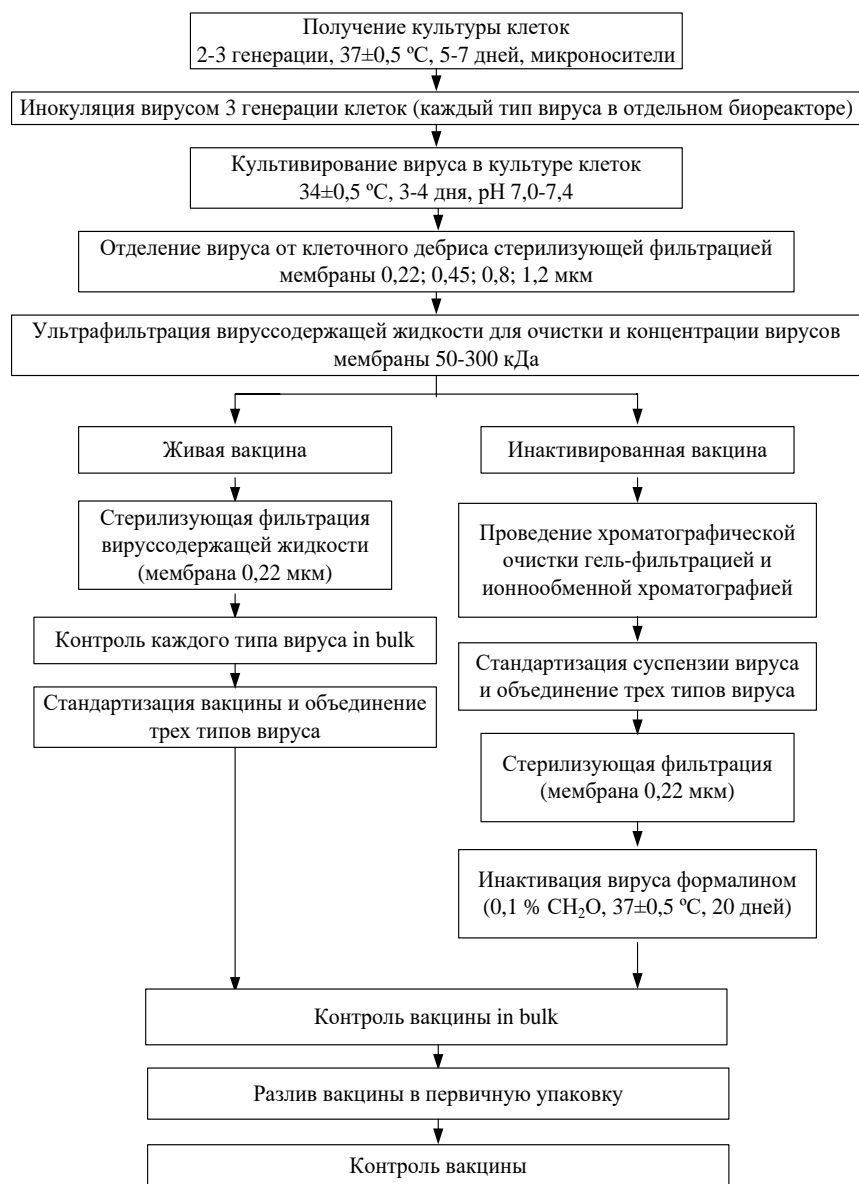


Рисунок 10 – Схема получения вакцины против полиомиелита

В 2002 году Техническая консультативная группа ВОЗ обсудила три возможных варианта после эрадикации полиомиелита:

- ✓ глобальное прекращение иммунизации живой полиомиелитной вакциной с заменой или без замены инактивированной полиовакциной по решению конкретной страны;
- ✓ замена ОПВ на ИПВ во всех странах;
- ✓ создание новой живой вакцины, не обладающей нейровирулентностью и трансмиссибельностью.

Эксперты ВОЗ пришли к выводу, что наиболее реален первый вариант и имеются обоснованные причины для прекращения живой поливакциной в связи с тем, что её применение создает риск: возврата паралитического полиомиелита вследствие появления вакциннородственных вирусов с нейровирулентными свойствами; возникновения вакцинно-ассоциированных случаев паралитического полиомиелита.

Не исключается возможность использования для профилактики полиомиелита ИПВ, которая лишена вышеперечисленных недостатков.

Необходимость в вакцинации против полиомиелита уже не вызывает сомнений. В качестве примера мы хотели привести ситуацию, сложившуюся у нашего ближайшего соседа России. В 1995 году эпидемиологическая ситуация по полиомиелиту в России резко обострилась – было зарегистрировано 150 случаев, вызванных диким штаммом вируса полиомиелита 1-го типа: в Чеченской Республике 144 случаев, 6 из которых закончились летальным исходом. Вспышка в Чеченской Республике была обусловлена провалом прививочной работы на территориях, эндемичных по этой инфекции. Ситуацию удалось стабилизировать благодаря массовым прививкам против полиомиелита всем детям до 7 лет. Уже в 1997–1998 гг. на территории России не зарегистрировано ни одного случая, вызванного диким вирусом.

Еще в 1999 году ВОЗ пересмотрела рекомендации в пользу четырех доз ИПВ. Хотя ИПВ дороже, чем ОПВ, тенденция к применению ИПВ усилится благодаря введению комбинированных вакцинных препаратов, содержащих антигены ИПВ, АКДСа, Н1в и гепатита В.

Поскольку данное инфекционное заболевание побеждено с помощью вакцинации, внимание обращается на побочные эффекты при применении вакцин. Основной проблемой ОПВ является вышеуказанное возвращение (в редких случаях) к нейровирулентности с последующим появлением ас-

социированного полиомиелита. Реверсия наиболее распространена для вируса вакцины типа 3, менее – для типа 2, и крайне редко – для типа 1.

С чем связаны случаи полиомиелита, обусловленные реверсией к нейровирулентному фенотипу у вакцинных штаммов? Маркером аттенуации у полиовирусов типа 3 является замена цитозина на урацил в положении 472 в 5' некодирующей области генома. У нейровирулентных ревертантов вакцины типа 3 в этом положении происходит реверсия к цитозину. При пероральном введении вакцины в кишечнике детей преимущественно размножаются ревертанты, обладающие нейровирулентностью.

Таким образом, как видно из приведенных данных, существует два противоположных мнения по вопросу использования вакцин против полиомиелита. С одной стороны, ВОЗ утверждает, что как только будет зафиксирован последний случай полиомиелита, вакцинацию ОПВ следует прекратить. Тщательный контроль позволит выявить более поздние случаи заболевания, которые будут сдерживаться путем интенсивной вакцинации на окружающей территории. Другое мнение состоит в том, что ОПВ следует постепенно замещать на ИПВ в течение нескольких лет. США, например, выбрали последний подход. Соображения, свидетельствующие в пользу данного подхода, следующие: 1) способность полиовируса выживать в окружающей среде; 2) наличие лабораторных и производственных запасов полиовируса дикого типа; 3) циркуляция реверсированного вакцинного вируса. Как упоминалось ранее, появление ИПВ-содержащих вакцин АКДСа будет способствовать осуществлению этого сдвига в практике вакцинации. Проблемой в данном случае является стоимость ИПВ, которая выше, чем у ОПВ, и возможность обеспечить этой вакциной развивающиеся страны. В результате может оказаться, что будет применяться один подход для одной из частей стран, и другой – для остальной части.

### 1.5.3. *Genamum B*

Гепатит В – заболевание, передающееся парентеральным или половым путем и являющееся девятой причиной заболеваемости и смертности на планете. Инфицирование вирусом гепатита В вызывает различные клинические проявления: молниеносную, острую, хроническую и скрытые формы гепатита. Молниеносная и острая формы являются крайне тяжелыми и дают высокую смертность. Хронический гепатит несет ответственность за распростра-

нение вируса и потенциально может развиваться в цирроз и рак печени. Каждый год умирает более миллиона хронических вирусоносителей. Вакцинопрофилактика является единственным эффективным способом предупреждения этого заболевания.

Первоначально была создана вакцина для профилактики гепатита В, получаемая из плазмы человека. Весьма интересен опыт, накопленный в ходе создания инактивированной вакцины против вируса гепатита В, который, как известно, не культивируется *in vitro* и не размножается в организме пригодных для широкого использования животных. Клетки печени людей, хронически инфицированных вирусом гепатита В, выделяют избыток вирусного поверхностного белка, то есть поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) в кровь в виде вирусоподобных частиц размером 22 нм с защитными эпитопами. Поэтому для производства вакцины было предложено извлекать из плазмы клинически здоровых антигеноносителей поверхностный антиген (HBsAg), очищать и концентрировать его, а затем инактивировать формалином. Антиген выделяли с помощью ультрацентрифугирования, хроматографии и ферментативной обработки. Полученный препарат подвергали инактивации для уничтожения вируса гепатита В и других потенциально патогенных контаминантов для организма человека. Препарат проходил клинические испытания в США, Франции, Англии, Голландии, Японии. Однако в связи с технологическими трудностями при получении вакцины, ограниченностью в сырье и возможности контаминации препарата эта вакцина не получила широкого применения.

За прошедшие годы были предложены технологии получения вакцин против гепатита В. По нашему мнению заслуживает внимание технология, предложенная российскими учеными.

Куриные эмбрионы заражают непосредственно в аллантоисную жидкость рекомбинантным вирусом осповакцины, экспрессирующего HBsAg. После заражения куриные эмбрионы помещали на 72 часа в температуру 37 °С. После инкубирования эмбрионы охлаждают в течение 18 часов при температуре 4–5 °С. Затем эмбрионы вскрывают и в асептических условиях собирают аллантоисную жидкость. Иммуноферментным методом определяют содержание антигена в аллантоисной жидкости. Содержание HBsAg должно быть не менее 300 нг/мл. Аллантоисную жидкость подвергают стерилизующей фильтрации через мембраны с размером пор 0,22 мкм. Полученный раствор концентрируют в 4 раза на мембранах с порогом отсечения 15 кДа. К полученному концентрированному раствору прибавляют 0,01 М фосфатный буферный раствор (рН – 7,2), содержащий 0,15 М натрия хлорида и про-

водят диафильтрацию. Выход HBsAg составляет на этой стадии 83 %. В концентрате проводят контроль на отсутствие вируса.

Выделение антигена осуществляет проведением иммуноаффинной хроматографии с использованием специфических поликлональных анти-HBs антител, выделенных из козьей сыворотки при помощи аммония серноокислого. Иммуносорбент готовят на основе CN-Bg-активированной сефарозы 4В.

Колонку заполняют подготовленным сорбентом и наносят материал, содержащий HBsAg. Колонку промывают 0,15 М фосфатным буферным раствором (рН – 7,2), содержащим 0,15 М NaCl, а затем 0,15 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН – 9,5) и 0,15 М KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (рН – 5,0). Десорбцию HBsAg проводят элюированием цитратно-фосфатным буферным раствором с рН 2,2. Полученные фракции контролируют на наличие HBsAg, их объединяют и нейтрализуют. Выход HBsAg составляет 73 % от исходного материала. Полученный антиген контролировали в соответствии с требованиями, предъявляемыми к антигену для конструирования вакцины.

С 1987 года стали доступны две лицензированные рекомбинантные вакцины, вырабатываемые дрожжами и содержащие главный поверхностный белок (S-белок) вируса гепатита В (HBsAg). Эти вакцины изготавливаются лидерами производства вакцин: Merck Sharp Dohme (США) и Smith Kline Beecham (Бельгия). Оценка, проведенная FDA, признала безопасность вакцины против гепатита В на основе исследования 12 млн доз, введенных детям в возрасте до 12 месяцев. Вакцина продемонстрировала высокую эффективность для защиты от гепатита В. В настоящее время рекомбинантную вакцину для профилактики гепатита В выпускают: GlaxoSmithKline (Бельгия), Heberbiotec (Куба), Berna Biotech (Корея), Instituto Butantan (Бразилия), Научно-производственная компания «Комбиотех» (Россия) и ряд других производителей.

У большинства бактерий есть еще один тип генетических элементов, которые существуют в клетках автономно, то есть независимо от хромосом. Это плазмиды, являющиеся типичными репликаонами. Термин «плазмиды» впервые был применен Ледербергом для обозначения всех внехромосомных наследственных детерминант. Как и все репликаоны, они имеют способность к саморегуляции независимо от механизмов, которые регулируют размножение бактериальной хромосомы. Плазмиды – линейные или кольцевые ковалентно замкнутые молекулы ДНК, которые содержат от 1500 до 40000 пар нуклеотидов. Содержание плазмидной ДНК не превышает нескольких процентов от общего содержания ДНК в хроматине. Основной особенностью плазмид является их способность к автономной репликации и трансмиссии

(способность к самопередаче). Плазмиды состоят из трех групп генов: участков ДНК, отвечающих за автономную репликацию плазмиды в клетке; генов, которые обеспечивают способность переноса плазмид из одной клетки в другую; генов, которые определяют полезные свойства для клеток хозяина. В связи с вышеизложенным можно сказать, что плазмиды успешно используются в генной инженерии. Существует несколько методов выделения плазмид. Для примера мы приводим методы выделения плазмид с использованием неионного детергента тритона X-100 (А) и выделения с помощью детергента додецилсульфата натрия (В).

Суспензию бактериальные клетки, например, *E. Coli* (для получения максимального лизиса клетки следует собирать в середине логарифмической фазы роста) центрифугируют при 10000 об/мин при температуре 5 °С в течение 10 мин; осадок ресуспендируют в буферном растворе (0,05 М трис; 0,005 М ЭДТА; 0,05 М NaCl; рН 8,0); осадок повторно отделяют центрифугированием при указанных параметрах; осадок ресуспендируют в 25 % сахарозе в буферном растворе (0,05 М трис; 0,001 М ЭДТА; рН 8,0) и охлаждают; добавляют лизоцим 5 мг/мл в буфере (0,25 М трис, рН 8,0). Следующие стадии проводят либо по методу А, либо по методу В.

*Метод А* заключается в следующем: добавляют лизирующую смесь (10 % тритон X-100, 1 М трис, 0,25 М ЭДТА, рН 8,0), тщательно перемешивают и выдерживают при температуре 0 °С в течение 20 минут; центрифугируют смесь при 35000 g в течение 20 минут при температуре 5 °С на центрифуге Beckman (ротор JA-20). Этим методом от основной массы хромосомной ДНК отделяется около 95 % плазмид; фракцию подвергают дальнейшей очистке и концентрированию центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия в присутствии бромистого этидия.

*Метод В:* добавляют лизирующую смесь – 20 % раствор додецилсульфата натрия, тщательно перемешивают и выдерживают 10 минут при температуре 0 °С (в течение этого времени клетки лизируются и раствор становится вязким); осаждают хромосомную ДНК 3 М NaCl до конечной концентрации 1 М, оставляют пробу на 2 часа для формирования осадка при температуре 0 °С; осаждают высокомолекулярную хромосомную ДНК и все клеточные обломки в течение 30 минут при 17000 об/мин при температуре 5 °С и отделяют раствор, обогащенный плазмидной ДНК; для удаления РНК добавляют рибонуклеазу (5 мг/мл) и проводят инкубирование в течение 1 часа при температуре 37 °С; для депротенинизации добавляют равный объем насыщенного трисом фенола. Смесь центрифугируют при 5000 об/мин и отделяют



фракцию, содержащую плазмидную ДНК; добавляют 2 объёма этанола (минус 20 °С) и оставляют на ночь при минус 20 °С; выпавший осадок ДНК осаждают центрифугированием при 12000 g в течение 20 минут при температуре минус 10 °С; осадок ДНК растворяют в трис-буфере.

Рассмотрим в качестве примера получение поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) с помощью специально разработанной системы с использованием интегрирующего вектора на метилотрофных дрожжах *Pichia Pastoris*. Сначала ген HBsAg встроили между промотором гена алкогольоксидазы 1 (AOX1p) и сигналом терминации – полиаденилирования (AOX1t) того же гена. Регуляция активности гена AOX1 *P. Pastoris* осуществляется с помощью метанола. В его присутствии на долю алкогольоксидазы может приходиться до 30 % всех белков клетки, а в отсутствие метанола алкогольоксидаза не синтезируется вообще.

Вектор, специально сконструированный для этих исследований, содержит следующие элементы: 1) блок AOX1p-HBsAg-AOX1t; 2) сайт инициации репликации, функционирующий в *P. pastoris*; 3) фрагмент ДНК, содержащий сайт инициации репликации плазмиды pBR322 и селективный маркер *E. Coli*; 4) фрагмент 3'-OX1, способствующий интеграции клонированной ДНК в определенный сайт хромосомы; 5) активный ген гистидинолдегидрогеназы (HIS4), кодирующий фермент, который участвует в синтезе аминокислоты гистидина. Наличие в этой конструкции последовательностей pBR322 позволяет использовать для работы с ней *E. Coli*, что облегчает клонирование и при необходимости позволяет получать большие количества векторной ДНК. Клон интегрировали фрагментом AOX1p-HBsAg-AOX1t при росте в присутствии метанола, который активирует AOX1 – промотор, синтезирующий в больших количествах аутентичный белок HBsAg, накапливающийся в цитоплазме. Чтобы предотвратить утрату плазмиды, была предусмотрена интеграция участка AOX1p-HBsAg-AOX1t в геном *P. Pastoris*. Для этого штамм *P. pastoris* HIS4 с дефектным геном гистидинолдегидрогеназы трансформировали фрагментом вектора, содержащим элементы AOX1p-HBsAg-AOX1t, HIS4 и 3'-AOX1. В результате двойного кроссингвера между AOX1p и 3'-AOX1 введенной ДНК, с одной стороны, и комплементарными последовательностями хромосомной ДНК, с другой, произошла интеграция последовательностей AOX1p-HBsAg-AOX1t и HIS4 в геном, сопровождающаяся утратой хромосомного гена AOX1. Клетки, в геном которых включил-

ся ген HIS4, растут на среде без гистидина; этот признак может использоваться для их отбора. Вторым критерием отбора служит замедление роста клеток в присутствии метанола, поскольку после потери гена AOX1 в результате двойного кроссингвера активным остается только один, менее эффективный, ген AOX2.

Вакцина для профилактики гепатита В, рекомбинантная, представляет собой субъединичную вирусную вакцину, содержащую HBsAg. Вакцину получают с использованием культуры модифицированных дрожжей. Препарат очищают с помощью последовательных биотехнологических процессов, включающих хроматографию, ультрацентрифугирование в градиенте хлористого цезия или бромистого калия, обработку формалином. Вакцина содержит в 1 мл 20 мкг HBsAg.

Для экспрессии клонированных эукариотических генов интенсивно используются обычные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Существует, по крайней мере, пять причин, сделавших этот вид излюбленным объектом биотехнологов:

1. Дрожжи являются одноклеточными микроорганизмами, просто культивируемыми в лабораторных и промышленных условиях, а их генетика, биохимия и физиология хорошо изучены.

2. Выделены и охарактеризованы несколько промоторов этих дрожжей, а для систем эндогенных дрожжевых экспрессирующих векторов могут использоваться природные, так называемые 2 мкм-плазмиды.

3. Относительная простота очистки гетерогенных конечных продуктов, секретируемых в питательную среду, так как очень немногие из собственных белков дрожжей секретируются в среду.

4. В клетках *Saccharomyces cerevisiae* осуществляется большое число посттрансляционных модификаций.

5. В США организацией FDA данные микроорганизмы признаны безопасными, что основано на многолетнем использовании дрожжей в хлебопекарской и пивоваренной промышленности.

Анализ представленных материалов позволяет предложить схему получения рекомбинантных продуктов: получение ДНК; введение ДНК в плазмидный вектор; трансформация; выявление необходимого клона; выращивание культуры и выделение плазмид; определение нуклеотидной последовательности клонированного фрагмента ДНК; конструирование и построение

плазмиды для экспрессии; трансформация; обнаружение необходимого клонна; выращивание культуры и выделение плазмид; проверка нуклеотидной последовательности ДНК; трансформация; выращивание культур для производства белка – HbsAg последовательности ДНК; трансформация; выращивание культур для производства белка – HbsAg.

**Получение рекомбинантной вакцины против гепатита В.** Штамм (дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansunela polymorpha*) используется в качестве продуцента поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) в производстве рекомбинантной вакцины против гепатита В. Штамм был модифицирован методом мутагенеза с помощью 5-fluorouracil кислоты с отбором устойчивого URA фенотипа, а затем трансформирован рекомбинантной плазмидой pH-HBs, с последующей селекцией клонов трансформантов. Штамм представляет собой клетки овальной формы размером 3–15 мкм, часть клеток имеет дочерние образования («почки»), иногда достигающие размеров материнской клетки. Клетки растут на полных органических и синтетических средах, содержащих глюкозу, глицерин или метанол в качестве единственного источника углерода. При росте на плотных средах клетки формируют гладкие круглые колонии белого цвета с ровными краями. При росте на жидких средах культура имеет вид ровной суспензии. Клетки растут в пределах температуры 4–42 °С. При росте на селективных средах клетки штамма проявляют прототрофный признак. Клетки штамма выращиваются в условиях ферментации с использованием 0,5 % метанола в качестве индуктора промотора MOX (метанолоксидаза) и, соответственно, экспрессии гена, кодирующего HBsAg в количестве не менее 150 мг на 1 литр ферментационной среды. Хранят штамм в жидкой среде, содержащей 2 % глюкозы, 15 % глицерина, 0,7 % азота дрожжевых сред при температуре минус 70 °С. Выращивание проводят при температуре 30 °С.

В настоящее время производители вакцины против гепатита В используют различные штаммы продуцентов и методы выделения антигена.

*Технологический цикл получения вакцины* состоит из следующих стадий.

**Ферментация производственных штаммов.** Ферментация культуры *Hansunela polymorpha* с интегрированной копией плазмид производится на среде, состоящей из глюкозы, глицерина и метанола, который данный штамм использует как единый источник углерода и энергии. Проводится три гене-

рации: 1 генерация в течение 45–48 часов при температуре 30–37 °С; 2 генерация в течение 20–24 часа при температуре 30–37 °С; 3 генерация производственная в течение 72–120 часов при температуре 30 °С. В процессе культивирования проводится контроль контаминации культуры (при микроскопическом исследовании не должны обнаруживаться клетки микроорганизмов, отличные от дрожжей), содержания дрожжевых клеток по определению оптической плотности, сухого веса (более 100 г/л), pH среды 6,5–7,5, растворенного кислорода. При культивировании рекомбинантных микроорганизмов необходимо подбирать специальные условия, а именно: тип реактора, тип мешалки, конструктивные особенности реактора, температурные условия, давление воздуха, так как клетки рекомбинантных микроорганизмов более хрупкие, чем нетрансформированные клетки, поскольку часть энергетических затрат расходуется на синтез чужеродных белков, и в результате образуется менее прочная клеточная стенка. Самый распространенный ответ клеток на внешнее воздействие – уменьшение количества всех синтезируемых белков, в том числе и рекомбинантных; под влиянием ряда факторов могут изменяться физико-химические свойства клеток, что затрудняет дальнейшую технологическую работу с ними, например, может увеличиваться количество полисахаридов или белков. Учитывая этот факт, появление таких компонентов (полисахаридов, белков или липидов) может в дальнейшем затруднять очистку HBsAg.

*Полученную культуру дрожжевых клеток охлаждают* до температуры 10–15 °С и подвергают отделению от культуральной жидкости путем ультрацентрифугирования при температуре 10–15 °С. Биомассу клеток промывают буферными растворами для полного удаления остатков питательной среды.

*Дезинтеграция клеток Hansunela polymorpha* путем обработки гомогенизацией высокого давления для разрушения клеток. Важным условием на этом этапе является однократное силовое воздействие с минимальным выделением тепла. При этом образуется экстракт, содержащий различные белки и HBsAg. Гомогенизацию проводят на гомогенизаторах высокого давления, например, фирм LKB (Швеция), Manton Gaulin (США), Laval (Швеция).

*Полученный экстракт с HBsAg обрабатывают с целью осаждения балластных белков* разрушенных клеток таким образом, чтобы в надосадочной жидкости находился неочищенный раствор HBsAg. Одним из производителей вакцины для осаждения балласта используется ПЭГ, который добав-

ляют при температуре 2–8 °С. Полученная смесь для формирования осадка выдерживается при указанной температуре в течение 16–24 часов. Затем осадок отделяется, надосадочная жидкость, содержащая HBsAg, обрабатывается адсорбентом, в котором сорбируется антиген. Адсорбент отделяют центрифугированием, промывают и с помощью солевых растворов проводят десорбцию HBsAg. Каждый производитель определяет адсорбент по своему усмотрению. Одним из них является аэросил.

Полученный раствор, содержащий антиген, подвергают ионообменной хроматографии, собирают фракции с HBsAg, которые затем объединяют. Для удаления солей и концентрации раствора проводят ультрафильтрацию с последующим ультрацентрифугированием в градиенте хлористого цезия. По данным других производителей, они используют градиент бромистого калия. Раствор очищают от солей градиента ультрафильтрацией.

Полученный раствор антигена подвергают молекулярно-распределительной хроматографии, после чего обрабатывают формалином при температуре 37 °С в течение 72–96 часов. Для удаления свободного (не связанного с белком) формалина проводят ультрафильтрацию с последующей стерилизующей фильтрацией через мембраны с размером пор 0,22 мкм.

Концентрированный раствор HBsAg контролируют в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения: проводят определение содержания липидов (от 30 до 100 мкг на 100 мкг белка), полисахаридов (не более 10 мкг на 100 мкг белка), ДНК (не более 250 пикограмм на 100 мкг белка), формалина (менее 0,01 %), цезия (не более 25 мкг на 100 мкг белка), бромидов (не более 50 мкг на 100 мкг белка), белка (150–250 мкг/мл), стерильности (отсутствие роста бактерий грибов), иммуноферментный анализ (подлинность на HBsAg), SDS-PAGE (должен обнаруживаться белок с молекулярной массой 23 кДа (95 %) и димер – 46 кДа).

При качестве препарата, соответствующем всем перечисленным требованиям, очищенный материал (bulk rHBsAg) разводят фосфатным буфером и подвергают стерилизующей фильтрации на мембранах с размером пор 0,22 мкм. К полученному раствору прибавляют стерильную суспензию гидроксида алюминия в фосфатном буфере. Адсорбцию проводят в течение не менее 2 часов при комнатной температуре. К суспензии добавляют стерильный раствор мертиолята до конечной концентрации 0,01 %.

На рис. 11 представлена схема получения вакцины против гепатита В.

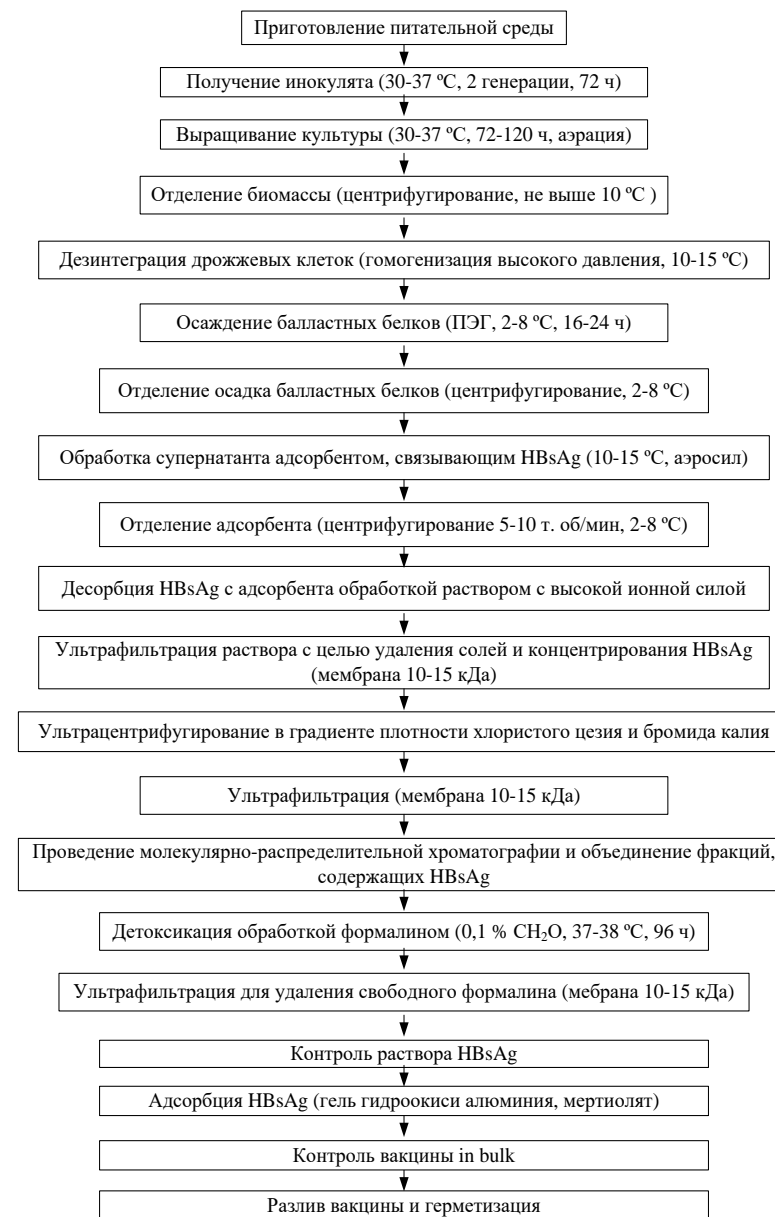


Рисунок 11 – Схема получения вакцины против гепатита В

В табл. 12 приведены показатели, по которым разные производители контролируют готовый препарат вакцины.

Таблица 12 – Характеристика вакцин против гепатита В разных производителей

Наименование показателя	Heber Biotec, Куба	Green Cross, Корея	Biotecnologia, Бразилия
<b>Описание</b>	Суспензия белого цвета	Суспензия белого цвета	Суспензия белого цвета
<b>pH</b>	6,4–7,4	5,4–7,4	6,6–7,4
<b>Стерильность</b>	Стерилен	Стерилен	Стерилен
<b>Пирогены</b>	Апирогенен	Апирогенен	Апирогенен
<b>Аномальная токсичность</b>	Атоксичен	Атоксичен	Атоксичен
<b>Содержание белка мкг/мл</b>	От 13 до 30	Не более 40	Не более 25
<b>Идентификация антигена по мол. Массе</b>	24 и 46 кДа	–	23 и 46 кДа
<b>Специфическая активность (относительная) (in vitro)</b>	Не менее 0,75	Не менее 0,65	0,65–1,2
<b>Алюминий, мг/мл</b>	0,35–0,65	Менее 1,25	Менее 1,25
<b>Мертиолят мг/мл</b>	0,03–0,07	0,03–0,07	0,03–0,07

При обсуждении рекомбинантных вакцин необходимо остановиться еще на одном вопросе – *туморогенном действии рекомбинантных препаратов*. Присутствие в препаратах клеточной гетерологичной ДНК в большой концентрации представляет онкогенную опасность, та как ДНК может вызывать инактивацию супрессорных онкогенов или активацию протоонкогенов после её интеграции с клеточным геномом. По требованию ВОЗ уровень такой гетерологичной ДНК в вакцинах не должен превышать 100 пг на одну вводимую дозу.

Всемирной организацией здравоохранения разработаны основные требования к генно-инженерным продуктам, в частности, и к рекомбинантным вакцинам. Эти требования изложены в ряде технических докладов ВОЗ и заключаются в следующем.

1. Должны быть приведены описания клетки-хозяина, её источников и прошлого, а также экспрессирующего вектора, используемого в производстве. Эти описания должны включать подробности о происхождении и идентичности клонируемого гена, а также строение, генетику и структуру экспрессирующего вектора. Необходимо полное описание источника получения и функции компонентов вектора, такие, как область начала репликации, промоторы или индикаторы резистентности к антибиотикам, карта расщепления рестриктаз, указывающая по меньшей мере те сайты, которые используются в конструкции. Необходимо подробно описывать метод, посредством которого вектор вводится в клетку-хозяина, состояние вектора в клетке, то есть должно быть подробно описано, интегрирован вектор или находится вне хромосомы, с указанием количества реплик. Особое внимание уделено вопросу документального подтверждения генетической устойчивости сочетания «хозяин-вектор».

2. В соответствии с рекомендациями ВОЗ, необходимо указать последовательность нуклеотидов вставленного гена и фланкирующих контрольных районов экспрессирующего вектора.

3. При производстве препаратов необходимо подробно описать меры стимулирования и контроля экспрессии клонируемого гена в клетке-хозяине.

4. Рекомендованы основные требования к контролю производства.

Производство продукта генной инженерии должно основываться на системе посевных серий, в состав которой входит банк рабочих клеток изготовителя и производное главной серии. Клетки-хозяева, содержащие экспрессирующий вектор, должны клонироваться и использоваться для создания главной серии посевного материала. В процессе получения посевного материала одновременно в одной и той же лаборатории или одними и теми же специалистами не должны обрабатываться другие линии клеток. Необходимо иметь полную информацию о происхождении, форме, хранении и средней продолжительности жизни посевного материала при предусмотренной степени его использования. Также должны быть предусмотрены доказательства стабильности системы экспрессии «хозяин-вектор» в банке посевного материала в условиях хранения и взятия в производство. При использовании для производства высших эукариотических клеток, при установлении идентичности посевного материала оказываются весьма удобными различающие кле-

точные маркеры, такие, как специфические изоферменты, или иммунологические особенности.

5. Крайне важным является получение сведений об онкогенности непрерывных линий клеток. Последовательность ДНК клонируемого гена должна быть подтверждена на стадии главной серии посевного материала. Однако в некоторых случаях, например, когда в геном непрерывной линии клеток вставляют множественные копии генов, может оказаться неудобным определять последовательность ДНК клонируемого гена на стадии главной серии посевного материала. В этих случаях могут оказаться информативными саузерн-блоттинг суммарной клеточной ДНК и нозерн-блоттинг транскриптов, содержащих последовательность продукта.

6. Существенными являются доказательные исследования, направленные на подтверждение отсутствия в серии посевного материала инфекционных агентов: бактерий, микоплазм, вирусов, грибов, а также желательно подтвердить отсутствие онкогенных агентов.

7. Специальное внимание необходимо уделять контаминации вирусами тканей животных, из которых создаются линии клеток. Надлежащая производственная практика (GMP) рекомендует необходимость установления критериев отбраковки сбора клеток или прекращения введения данной культуры. Причинами отбраковки может быть контаминация культуры одним из перечисленных агентов, отклонение выхода продукта, который не должен превышать установленные пределы.

8. Должны быть установлена молекулярная целостность гена, который будет экспрессироваться, а также фенотипические и генотипические характеристики клетки-хозяина после длительного выращивания культуры; должна быть регламентирована максимальная длительность непрерывной культуры на основании информации о стабильности системы.

9. При производстве, основанном на ограниченном числе пассажей, должно быть установлено и специфицировано максимальное количество удвоений клеток или пассажей, разрешенных при производстве.

10. Процесс производства должен предусматривать технологические процедуры для очистки от балластных компонентов, связанных с самим продуктом или произошедших из клеток-хозяев: белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов или других контаминирующих агентов, в том числе компонентов питательных сред и химических реактивов, используемых в процессе очистки.

Выполнение этих требований в значительной степени определяет эффективность и безопасность получаемых препаратов.

Первая рекомбинантная вакцина против гепатита В была создана компанией «Smith Kline Beecham» под названием «Энджерикс». За прошедшие годы вакцинами против гепатита В были вакцинированы миллионы людей, и эффективность данного препарата уже не вызывает сомнения. Иммунизация стандартными вакцинами для профилактики гепатита В, содержащими рекомбинантный HBs антиген, приводит к формированию иммунного ответа по классическому пути, то есть через презентующие клетки к Т-хелперным лимфоцитам (CD 4), узнающим молекулы II класса главного комплекса гистосовместимости (МНС) на антиген презентующих клетках. Т-хелперы запускают механизм дифференциации HBs-специфических В-лимфоцитов в плазматические клетки, продуцирующие анти-HBs-иммуноглобулины класса G. Таким образом, во время первичного иммунного ответа на вакцину происходит формирование как Т-, так В-лимфоцитов памяти, которые обеспечивают быстрый (до 4 дней) и сильный иммунный ответ в случае контакта иммунизированного человека с нативным возбудителем.

В заключение необходимо отметить, что *сегодня рекомбинантная вакцина против гепатита В является единственной эффективной вакциной против данной инфекции* и используется во всех странах, проводящих вакцинацию против гепатита В. Многочисленные попытки создать другие формы вакцин против гепатита В оказались безуспешны. Работа по исследованию вакцин, направленных на профилактику инфекции, продолжается и сегодня. Создание альтернативных вакцин диктуется тем, что лишь 90–95 % вакцинированных дают положительный ответ. Предложенные вакцины из синтетических пептидов, представляющие собой фрагменты оболочки вируса гепатита В (HBsAg), были инкапсулированы в олигосахаридные микроносители или липосомы и использованы для иммунизации животных. После изучения иммунного ответа у животных авторам пришлось признать низкую эффективность предложенных препаратов. Используемая в качестве вакцины ДНК, изученная на лабораторных животных и прошедшая контроль на добровольцах в США в 2005 году, также не подтвердила терапевтической эффективности предложенного препарата. К сожалению, за последнее время никаких дополнительных данных о высокой эффективности других вакцин против гепатита В опубликовано не было.

## 1.6. Комбинированные вакцины

В настоящее время для иммунизации населения применяются два вида комбинированных вакцин: вакцины, полученные путем смешивания различных антигенов, и вакцины, используемые в виде различных шприцев (в случае несовместимости антигенов) с последовательным введением. Мы остановимся на вакцинах, полученных комбинацией в одном объёме. В табл. 13 отображен состав комбинированных вакцин.

Таблица 13 – Состав комбинированных вакцин

Наименование вакцины и производитель	Состав вакцин на одну дозу											
	IPV	ЭП	КС	ЭП	ДА	СА	К	КТ	ФГА	П	HBsAg	Hib
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
АКДС (Украина, Россия)	–	–	–	–	30 МЕ	60 МЕ	4 МЕ	–	–	–	–	–
DT-COQ (Франция)	–	–	–	–	30 МЕ	60 МЕ	4 МЕ	–	–	–	–	–
Infanrix Пер В (Бельгия)	–	–	–	–	30 МЕ	40 МЕ	–	25 мкг	25 мкг	8 мкг	10 мкг	–
Priorix (Бельгия)	–	10 <sup>3</sup> тЦД50	10 <sup>3</sup> тЦД50	10 <sup>3,7</sup> тЦД50	–	–	–	–	–	–	–	–
Tetracoq (Франция) три типа	1,2,3	–	–	–	30 МЕ	60 МЕ	4 МЕ	–	–	–	–	–
Trinovax (Франция)	–	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	5·10 <sup>3</sup>	–	–	–	–	–	–	–	–
Tritarix Пер В (Бельгия)	–	–	–	–	30 МЕ	40 МЕ	4 МЕ	–	–	–	10 мкг	–

Продолжение таблицы 13

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
MMR (США)	–	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	–	–	–	–	–	–	–	–
Eutravac (Корея)	–	–	–	–	30 МЕ	40 МЕ	–	4 МЕ	–	–	10 мкг	–
Twinrix (Бельгия)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	10 мкг 360 ЕДА	–
Infanrix Hexa (Бельгия) три типа	–	–	–	–	30 МЕ	40 МЕ	25 мкг	25 мкг	–	8 мкг	10 мкг	+
ADACEL (США)	–	–	–	–	5 Lf	2 Lf	–	2,5 мкг	5 мкг	3 мкг	–	–

Примечание: ДА – дифтерийный анатоксин; СА – столбнячный анатоксин; К – коклюшный корпускулярный компонент; КТ – коклюшный токсин; ФГА – филламентозный гемагглютинин; П – пертактин; HBsAg – антиген гепатита В; IPV – инактивированная полиомиелитная вакцина; А – антиген гепатита А; Hib – вакцина против гемофильной b-инфекции; КР – корь; КС – краснуха; ЭП – эпидемический паротит. В вакцине ADACEL также присутствуют фимбрии 2 и 3 в количестве 5 мкг.

Безопасность и иммуногенность детских вакцин, вводимых одновременно, – это крайне актуальные вопросы, так как появляются новые антигены и возрастают усилия, направленные на то, чтобы прививать детей дошкольного возраста при первой же возможности. Комбинированное введение всех вакцин, положенных ребенку, – это важная стратегия, призванная обеспечить выполнение прививок по календарю. Чем больше раз родителям приходится водить ребенка на прививки в медицинские учреждения, тем больше вероятность того, что ребенок пропустит какие-то прививки и останется незащищенным. Практика использования комбинированных вакцин – это безопасная и эффективная практика.

*Преимуществом комбинированных вакцин является:*

- ✓ меньшие психологические нагрузки на ребенка;

- ✓ оптимальный выбор клинического состояния для вакцинации;
- ✓ максимальный контроль за проведением вакцинации.

Однако остаются и нерешенные вопросы, на которые сегодня мы не можем ответить в полном объеме. Необходимо подробно изучить следующее:

- риск побочных реакций, которые могут происходить после применения комбинированных препаратов;
- влияние одного из антигенов на иммуногенность другого компонента комбинированной вакцины;
- количественная оценка безопасности и эффективности комбинированной вакцинации.

При конструировании комбинированных вакцин обязательным является изучение таких факторов: физико-химической совместимости антигенов, адьювантов, консервантов и других компонентов, входящих в вакцину; стабильность многокомпонентных комбинаций антигенов; различная длительность приобретенного иммунитета у отдельных компонентов комбинированной вакцины. Крайне важным является влияние одного компонента вакцины на протективные свойства другого. Так, например, в Европе за последние годы были зарегистрированы две вакцины, содержащие 6 антигенов для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша, полиомиелита, гепатита В и НВ-инфекции. При изучении иммуногенности этой вакцины в США было обнаружено снижение титра антител против НВ-антигена по сравнению с моновакциной. Это явилось причиной отказа регистрации данной вакцины в США. В Украине сегодня используется вакцина, содержащая 6 компонентов – INFANRIX–HEXA. В состав пяти компонентов входят: дифтерийный и столбнячный анатоксины, инактивированные формальдегидом; ацеллюлярный компонент, представленный пертактином (м.м. 69 кДа), гемагглютинин, коклюшный токсин, инактивированные глутаровым альдегидом и формальдегидом; HBsAg; инактивированные вирусы полиомиелита (консервант – 2-феноксиэтанол): тип 1 – штамм Mahoney, тип 2 – штамм MEF-1, тип 3 – штамм Saukett, находящиеся в виде сорбированной суспензии в шприце; вакцина НВ, лиофилизированная во флаконе. Перед использованием содержимое шприца переносится во флакон, растворяется и вводится в виде 6-валентной вакцины.

Несомненный интерес представляет сорбированный препарат анатоксинов, длительное время выпускавшийся в СССР для борьбы с заболеваниями газовой гангрены, столбняка и ботулизма, в состав которого входили следующие анатоксины: перффригенс (50 ЕС), эдематенс (15 ЕС), столбняк (20 ЕС), ботулизм А (10 ЕС), ботулизм В (2,5 ЕС), ботулизм Е (10 ЕС), ботулизм С (5,5 ЕС), оксид алюминия – 2,7–3,3 мг в 1 мл препарата.

Для примера эффективности использования комбинированных вакцин мы обратимся к опыту отдела исследований и развития института биологии им. Смита Кликке (Бельгия). Ими была изучена эффективность вакцины Twinrix, Smith Kline Beecham Biologicals. Эта вакцина содержит антигены против гепатита А и В. Показано, что через три года положительная реакция сыворотки исследуемых детей и взрослых на антитела к вирусу гепатита А составляла 100 % и 94 % вакцинированных имели положительные защитные титры сыворотки по отношению к гепатиту В. По этим показателям не обнаружено отличий в сравнении с использованием моновакцин. Комбинированная вакцина против гепатитов А и В продемонстрировала свою безопасность, хорошую переносимость, высокую степень иммуногенности как для взрослых, так и для детей. Комбинированная вакцина более удобна и снижает стоимость при применении по сравнению с моновалентной вакциной. Аналогичные данные, подтверждающие высокую эффективность, безопасность и экономическую целесообразность при применении, получены при использовании многих комбинированных препаратов.

Таким образом, использование комбинированных вакцин приводит к меньшему числу уколов, что, в свою очередь, сделает многочисленные иммунизации легче переносимыми для пациентов – детей, для родителей, иммунизированных детей, а также для работников здравоохранения.

Опыт показывает, что разработка комбинированных вакцин – это нечто большее, чем простое смешивание антигенов. Возможная несовместимость или взаимная интерференция между самими антигенами, адьювантами или консервантами делает обязательным тестирование каждого состава на стабильность, эффективность и, что крайне важно, безопасность.

## 1.7. Завтрашний день вакцинации

Традиционные вакцины, избавившие человека от десятков инфекционных заболеваний, в ряде случаев являются малоэффективными либо слишком небезопасными. Традиционные вакцины содержат инактивированные или аттенуированные патогенные микроорганизмы (бактерии или вирусы) или очищенные продукты их метаболизма (полисахариды, токсины и др.). Эти вакцины имеют ряд существенных недостатков: не все патогенные микроорганизмы можно вырастить в необходимых для производства вакцины количествах; работа с большим количеством патогенных микроорганизмов требует соблюдения строжайших мер предосторожности; аттенуированные штаммы могут подвергаться реверсии и становиться вирулентными; инактивация часто бывает неполной; срок годности вакцины зависит от условий её хранения; возникают трудности при транспортировании; сложности при очистке компонентов; контаминация вакцин посторонними агентами за счет использования культуры клеток, сыворотки животных, антибиотиков и консервантов. В качестве альтернативы обычным методам иммунизации разрабатываются оригинальные подходы конструирования вакцин, которые привели к созданию вакцин нового типа: растительных вакцин, ДНК-вакцин, пептидных вакцин и ряда других.

### 1.7.1. Растительные вакцины

*Вакцины растительного происхождения* представляют собой препараты на основе трансгенных растений, в геном которых был встроены соответствующий фрагмент генома патогенного микроорганизма.

Первая такая вакцина получена в 1992 году. Трансгенное растение табака стало продуцировать «Австралийский антиген» (HBsAg) – антиген вируса гепатита В. Полученный из растений и частично очищенный антиген, введенный мышам, вызывает иммунный ответ, подобный вакцинации против гепатита В. В 1998 году с помощью картофеля, продуцирующего В-субъединицу холерного антигена, была получена защита у мышей при заражении возбудителем холеры. Аналогичная вакцина была получена на табаке, продуцирующем антигены вируса кори. Проведены работы по получению вакцин против бешенства на томатах. На настоящий момент клубни карто-

феля трансгенных сортов, экспрессирующие бактериальные токсины и антигены гепатита В (уровень антител при использовании картофеля превысил уровень защитного титра у людей – 10 МЕ/мл) и вируса Норфолка в сыром виде, представляющие собой съедобные вакцины, успешно прошли 1 фазу клинических испытаний. Вакцина против вируса Норфолка, полученная на трансгенном картофеле, была изучена на 20 добровольцах, 19 из которых (95 %) показали высокий уровень иммунного ответа. Начаты работы по созданию вакцин против туберкулеза в листьях салата. Проводятся интенсивные исследования российских ученых (Новосибирск, ГНЦ вирусологии и био-технологии «Вектор») по созданию съедобной растительной вакцины против СПИДа и гепатита В. Ими получен химерный ген, который встроен в плазмиду кишечной палочки. После проверки возможности производства данного химерного белка была подключена бактерия (предварительно в неё была внедрена плазида) *Agrobacterium tumefaciens*, которой были заражены проростки томатов итальянского селекционного сорта «Вентура», отличающиеся высоким содержанием белка. Химерный ген встраивался в геном растения, и начиналось продуцирование нужного белкового антигена. Полученный из сублимированных томатов порошок растворяли в воде и скармливали мышам. Через определенное время в крови животных обнаруживались антитела против антигенов гепатита В и СПИДа. Обнадёживающие результаты получены при создании коревых вакцин на трансгенных растениях. Мышей кормили листьями табака с гемагглютинином из вируса штамма кори Едмонтон. Титры антител превысили защитный титр в 5 раз. Следующим этапом было изучение таких вакцин на приматах. Трансгенный рис, салат и детское питание против кори находятся на стадии разработки. Применение съедобных вакцин растительного происхождения значительно облегчает процессы производства препаратов и их доставки в организм. Учитывая, что большинство патогенов попадает в организм через слизистые оболочки, создание и поддержание полноценного местного иммунитета слизистых оболочек должно обеспечить защиту человека от большинства инфекционных заболеваний. Особенно привлекательным выглядит пероральное применение растительных вакцин, так как оно позволит избежать использования инъекционных процедур. Кроме того, растительные вакцины не содержат животных белков и патогенов животного происхождения. Трансгенные растения, такие, как картофель, томаты, бананы, в состав которых входят необходимые для вак-



цинации антигены, можно выращивать в промышленных масштабах, и при этом не нужно создание дорогостоящих технологических процессов и уникального оборудования. Одним из критериев приемлемости является съедобность плодов растений в сыром виде, что позволит избежать потери антигенной активности при термической обработке растений. В то же время, для практического использования растительных вакцин придется ответить на ряд существенных вопросов:

- возможность сохранения антигенов в кислой среде желудка;
- способность переносить хранение и изучение температурных режимов;
- детальное изучение возможности развития иммунологической толерантности слизистой оболочки ротовой полости при употреблении съедобных вакцин;
- разработка протоколов приема растительных вакцин;
- изучение и подбор адъювантов, повышающих эффективность таких вакцин;
- подбор оптимального метода введения генного материала: либо с помощью генных пушек при бомбардировке эмбриональных клеточных культур растений, либо с помощью бактерии *Agrobacterium tumefaciens* для доставки в геном растений плазмиды с встроенной ДНК.

Таким образом, вакцины с использованием трансгенных растений (картофеля, риса, томатов, салата, листьев табака) позволяют надеяться на создание в ближайшем будущем эффективных препаратов против гепатита В, ВИЧ, сибирской язвы, вируса папилломы, холеры, кори и ряда других инфекционных заболеваний.

### 1.7.2. ДНК-вакцины

*Новый подход, позволяющий индуцировать у организма иммунный ответ без введения антигена*, основанный на включении в клетки животного гена, кодирующего белок – антиген, привел к появлению нового типа вакцин – ДНК-вакцин. Ученые обнаружили, что фрагменты ДНК вирусов и бактерий, имплантированные в клетки животных, способны синтезировать собственные белки. Сами клетки, получившие гены другого организма, в ответ начинают вырабатывать антитела на вновь синтезируемые белки. Экспе-

рименты по созданию ДНК-вакцин преимущественно ведутся с бактериальными плазмидами – небольшими стабильными кольцевыми ДНК, которые содержатся вне хромосом. Плазмиды хороши в том плане, что сами по себе не провоцируют развитие инфекции. Их используют в качестве вектора – средства доставки. Чтобы вызвать необходимый иммунный ответ, выделенные из бактерий плазмиды модифицируют, внося определенные изменения в структуру ДНК, а именно, «вшивают» гены, которые кодируют один или несколько определенных белков антигенов, вырабатываемых конкретными вирусами или бактериями. Так же встраиваются в плазмиду гены, необходимые для обеспечения экспрессии всей конструкции. Очень важно, что фрагменты ДНК, ответственные за воспроизводство и развитие инфекционного процесса, в плазмиды не вводятся.

В первых экспериментах такого рода *E.Coli*-плазмиду, содержащую клонированный ген белка-антигена, транскрипция которого находилась под контролем промотора вируса животных, конъюгировали с микрочастицами золота и бомбардировали ими клетки уха мыши при помощи «генной пушки». В этом методе используется сжатый гелий, содержащий частицы коллоидного золота с сорбированными на нем плазмидами, экспрессирующими антиген. При этом препарат вводится в эпидермис. Преимуществом этого метода является попадание плазмид непосредственно в клетки и факт того, что большая часть плазмид прямо контактирует с клетками Лангерганса. Это важно в связи с тем, что кожа богата антигенпредставляющими клетками (клетки Лангерганса), синтезирующими молекулы II класса МНС. Поэтому ДНК, введенная непосредственно в кожу, может быть легко ими захвачена.

Впоследствии выяснилось, что клонированную ДНК можно вводить в клетки и с помощью внутримышечной инъекции раствора с большим количеством плазмиды, несущей соответствующую ДНК. Для этого необходимо в 100 раз больше ДНК, чем при бомбардировке микрочастицами. В одном из экспериментов более чем в 75 % случаев ген включался в клетки мыши, и синтезированный белок-антиген индуцировал синтез антител. В одной из серий экспериментов мышам в задние конечности вводили раствор с *E.Coli*-плазмидой, несущей ДНК нуклеопротеина вируса гриппа А, транскрипция которой находилась под контролем промотора вируса саркомы Рауса или цитомегаловируса. Хотя уровень экспрессии гена нуклеопротеина был настолько низок, что не поддавался регистрации, через 2 недели после иммунизации

в крови мышей обнаруживались антитела к вирусу гриппа А. Выживаемость иммунизированных мышей оказалась значительно выше, чем мышей из контрольной группы. Более того, они были не чувствительны и к другому штамму вируса гриппа. Такая перекрестная защита не вырабатывается при введении традиционных противогриппозных вакцин.

Позднее состоялись первые клинические испытания на человеке, которые, прежде всего, продемонстрировали безопасность нового метода. Гены ВИЧ вносили в клетки пациентов, уже зараженных вирусом. Еще позднее аналогичные эксперименты провели со здоровыми людьми. Кроме генов ВИЧ пересаживали гены гриппа и гепатита В. Во всех случаях вакцины провоцировали иммунный ответ в виде выработки специфических антител. Вакцины вводили либо путем инъекций, либо с помощью так называемой «генной пушки». Этот аппарат, выпуская струю сжатого гелия, пробивает клеточные мембраны микроскопическими металлическими частицами, покрытыми ДНК. Существуют данные о возможности «выстреливать» ДНК-вакцину, упакованную в липосомы.

При введении ДНК-вакцины активизируются клетки иммунной системы: В-лимфоциты вырабатывают антитела, нейтрализующие антигены в жидких межклеточных тканях (гуморальный иммунный ответ), а цитотоксические Т-лимфоциты разрушают бактерии и вирусы внутри клеток (клеточный иммунный ответ). Получены экспериментальные данные, что один и тот же антиген, введенный в организм обычным методом и с помощью ДНК-вакцины, продуцирует разные варианты иммунного ответа. При ДНК-вакцинации синтезируются иммуноглобулины – IgG2a (максимум через 6 недель), а при традиционном введении – IgG1 (через 1–2 недели). При ДНК-вакцинации Т-хелперы животных секретируют интерферон гамма, а после обычной вакцинации – интерлейкины ИЛ-4 и ИЛ-5. Таким образом, использование ДНК-вакцины приводит к так называемому Т-хелперному ответу (Th-1), а обычная вакцинация – к Th-2.

Интерес к ДНК вакцинам стимулируется рядом свойств, которыми они обладают. Используя один и тот же плазмидный или вирусный вектор, можно создавать вакцины против различных инфекционных заболеваний, меняя только последовательность, кодирующую необходимые антигены. В то же время, по мнению ряда специалистов, прямая инокуляция плазмидной ДНК должна приводить к синтезу белков *in vivo*, конформационная и пост-

трансляционная модификация которых идентична синтезируемым при инфекционном процессе заражения вирусом.

Мы остановимся еще на одном вопросе использования ДНК-вакцин. В ДНК микроорганизмов, в том числе и кольцевой плазмиде, часто встречается определенный фрагмент цитозин-гуанин (С-Г). Эти два нуклеотидных основания намного реже встречаются у позвоночных. Кроме того, если у позвоночных цитозин и гуанин расположены последовательно в одной цепочке двойной спирали, к ним обычно прикрепляется метиловая химическая группа. Бактерии обходятся без этого дополнения. Ученые предположили, что клетки позвоночных воспринимают часто повторяющиеся неметилованные С-Г фрагменты как сигнал опасности. Это позволяет надеяться на создание в будущем универсальной антибактериальной вакцины с С-Г фрагментом в качестве активного компонента вакцины.

*Относительно новой вехой* в радиологической вакцинологии является разработка ДНК-вакцин, представляющих собой плазмидную ДНК, в которую встроены ген гликопротеина вируса бешенства. Также получена высокоэффективная ДНК-вакцина, которая в опытах на мышах не только излечивала от цитомегаловирусной инфекции, но и предотвращала её.

*Преимуществами этих препаратов* являются:

- ✓ отсутствие специальных методов доставки и высокая стабильность. ДНК-вакцины стабильны даже при комнатной температуре;
- ✓ высокая степень очистки;
- ✓ отсутствие балластных белков и контаминации посторонними агентами;
- ✓ индуцирование у животных системного и местного иммунитета.

Двукратная внутримышечная вакцинация собак плазмидной ДНК, экспрессирующей гликопротеин вируса бешенства, защищает животных от контрольного заражения вирулентным штаммом вируса бешенства. Уже разработаны и проходят испытания ДНК-вакцины против инфекций, вызываемых вирусами гепатита В и С, гриппа, лимфоцитарного хореоменингита, бешенства, японского энцефалита, туберкулеза, лейшманиоза, малярии и др. Нужный ген вставляют в плазмиду или безопасный вирус. Такой носитель-вектор проникает в клетку и синтезирует нужные белки, обладающие протективным действием.

Для внедрения этих вакцин в медицинскую практику требуется решение еще очень многих вопросов. Например, генами кодируются белковые антигены, и пока не существует альтернативы полисахаридным антигенам, входящим в состав ряда традиционных вакцин. Несомненно, важным является разработка методов получения и очистки плазмидной ДНК, освобождения от балластных примесей бактериального происхождения, хромосомной ДНК и примесей РНК. Самостоятельным вопросом является подбор для ДНК-вакцин адъювантов и носителей. Обращает на себя внимание вопрос о судьбе введенной в клетку ДНК. На сегодняшний день нет однозначного ответа на эти вопросы. ДНК может интегрироваться в геном-хозяина с весьма серьезными последствиями, если при этом происходит злокачественная трансформация клеток или затрагивается какой-то важный ген, что может приводить к мутагенному эффекту. По мнению многих специалистов, такое развитие событий считается крайне маловероятным. По их мнению, такая ДНК какое-то время просуществует в клетке в виде нереплицирующегося внехромосомного элемента, а затем разрушится. По нашему мнению, эти вопросы еще недостаточно изучены и внедрение ДНК-вакцин в медицинскую практику требует всестороннего изучения, особенно судьба введенной ДНК-вакцины, длительность экспрессии антигена, безвредность ДНК-вакцин, образование антител к самой ДНК и примесям вакцины и т.п.

### **1.7.3. Генно-инженерные вакцины**

*Для получения генно-инженерных вакцин в геном живых аттенуированных бактерий, вирусов, дрожжей или клеток эукариотов встраивается необходимый ген, кодирующий протективный антиген возбудителя.* Данный подход предусматривает использование природного тропизма вектора (вируса или бактерий) по отношению к определенному виду клеток, что значительно увеличивает адресность доставки необходимой генетической информации.

*В качестве вакцины используется либо протективный антиген, полученный при культивировании *in vitro* (примером может служить хорошо зарекомендовавшая себя вакцина против гепатита В), либо модифицированные микроорганизмы со встроенным геном (примером может служить антирабическая вакцина для животных, полученная на основе осповакцины, в вирус*

которой включен предварительно клонированный ген возбудителя бешенства). Вирус, носитель вектора, активно размножается, а продуцируемые включенным геном антигены обеспечивают необходимый иммунный ответ.

Сегодня получены вакцины на основе вируса осповакцины (к гриппу А, гепатитам А и В, малярии, герпесу и др.), которые находятся на различных стадиях изучения. Клонированы гены для дифтерийного и столбнячного анатоксинов, токсина синегнойной палочки, сибиреязвенного, холерного, коклюшного и шиггелезного токсинов. В качестве носителя бактериального вектора используется БЦЖ и кишечная группа возбудителей (*E.Coli*, *S.tythinurium*, *Vibrio cholerae*), которые перспективны для разработки рекомбинантных энтеральных вакцин, вводимых через рот.

Важным условием получения рекомбинантных вакцин является соблюдение основных принципов их производства:

- получение соответствующего фрагмента нуклеиновых кислот – РНК или ДНК;
- выбор высококачественной, хорошо изученной в этом отношении модели вектора-носителя и использование соответствующего гена;
- выбор системы экспрессии клонированного гена, способной обеспечить максимальный выход и функциональную полноценность продукта;
- создание достаточно удобных и по возможности универсальных векторов для целевой доставки генов в клетки и ткани организма;
- должны быть изучена стабильность системы экспрессии антигена во время хранения рабочего банка клеток;
- необходимо определить нуклеотидную последовательность, исследовать пептидные карты и последовательность концевых аминокислот генно-инженерного продукта с целью подтверждения отсутствия изменений в посевной культуре, которые могут сопровождаться перестройкой, делением или вставками нуклеотидов.

В настоящее время широко проводятся исследования по созданию рекомбинантных вакцин на основе аттенуированных живых бактериальных штаммов. Актуальность разработки вакцинных препаратов такого типа вызвана, прежде всего тем, что возможности традиционных методов вакцинопрофилактики и ряда инфекций исчерпаны и для разработки новых препаратов необходимо привлечение принципиально иных подходов. Одним из та-

ких подходов при создании вакцинных препаратов является разработка живых рекомбинантных вакцин. Для конструирования таких вакцин необходимы три составляющих их компонента: бактериальный вектор; гетерологичный протективный антиген и генетические структуры, обеспечивающие стабильную экспрессию протективного антигена в бактериальном векторе. В качестве бактериальных векторов для клонирования гетерологичных факторов патогенности применяют аттенуированные штаммы микроорганизмов, причем многие исследователи предпочитают аттенуированные штаммы сальмонелл, таких как *S. typhi*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. choleraesuis*, *S. dublin*. Такие живые бактериальные векторы вызывают интерес в связи с возможностью перорального способа применения сконструированных на их основе вакцин, способностью активно индуцировать клеточный, гуморальный и секреторный звенья иммунитета, а также высокой экономичностью. В сальмонеллезных вакцинных штаммах были клонированы и в различной степени охарактеризованы протективные белки: *E.Coli*, фрагмент С столбнячного токсина, пептид-В-субъединицы холерного токсина, антигены вируса гепатита В, нуклеопротеин вируса гриппа А, стрептококковый белок М и другие.

Сегодня на различных стадиях разработки находятся десятки генно-инженерных вакцин против инфекционных заболеваний: герпеса, СПИДа, малярии, туберкулеза, бешенства и других инфекций, а также ряд противоопухолевых вакцин. В клиническую практику с 2000 года внедрена рекомбинантная вакцина против боррелиоза на основе БЦЖ, которая при введении в организм человека приводила к синтезу протективного антигена боррелий – поверхностного липопротеина (r Osp A), приводящего к защитному эффекту. Препарат выпускается «SmithKline Beecham Pharmaceuticals» и был лицензирован в США в 1999 году. Рекомбинантные вакцины против бешенства широко применяются во многих странах мира как экологически безопасные для борьбы с бешенством диких плотоядных животных. Несомненный интерес представляет рекомбинантная вакцина Гардасил против вируса папилломы человека, представляющая собой вирусоподобные частицы высокой степени очистки главного рекомбинантного капсидного полипептида (капсид L1) белка вируса папилломы человека (HPV) четырех типов с активностью не менее: 6 (27 МЕ/мл), 11 (52 МЕ/мл), 16 (52 МЕ/мл), 18 (21 МЕ/мл). Суммарное значение для 4 типов – не более 500 МЕ/мл. Для усиления иммуногенности вирусоподобные частицы адсорбированы на алюминии гидроксиде

(адьювант). Вакцина используется для профилактики заболеваний, вызываемых вирусом папилломы человека: рака шейки матки и влагалища, генитальных кондилом и предраковых состояний. Рекомбинантная вакцина против гепатита В подробно описана в п.п. 1.5.3.

#### 1.7.4. Пептидные вакцины

Альтернативой традиционным вакцинам могут быть *иммуногенные пептидные эпитопы, индуцирующие специфический иммунный ответ при введении человеку или животным синтетических пептидов.*

Мысль о создании и применении пептидных вакцин появилась в ходе исследования клеточного развития иммунитета: процессинга антигена во вспомогательных клетках и презентации антигена Т-клеткам (расщепление антигенов до пептидов).

М. Села в 1974 году был первым, кто охарактеризовал искусственно созданный пептид, который при введении животным приводил к образованию антител к белку лизоциму.

Синтетические пептиды обладают слабой иммуногенностью. Для повышения иммуногенности и стабилизации пептидов и доставки их к иммунокомпетентным клеткам необходим носитель, или какой либо другой адьювант, например, иммуностимулирующий комплекс или липосомы. По мнению Н.В. Медуницына, *к носителю для пептидных вакцин необходимо предъявлять следующие требования:*

- ✓ не должен доминировать над ответом к пептиду;
- ✓ не должен нарушать специфичность пептида;
- ✓ должен иметь собственную спецификацию по характеристике его биологических свойств и структуры, включая молекулярные параметры;
- ✓ на стадии конъюгирования должен иметь постоянные соотношения с пептидом.

В качестве примера можно привести данные об использовании пептидной вакцины для защиты животных от вируса ящура – FMDV (foot-and-mouth disease virus). Основной антигенной детерминантой, индуцирующей образование антител, является вирусный капсидный белок 1-VP1 (viral protein 1). Химическими методами синтезировали домены VP1 FMDV и проверили возможность создания на их основе пептидных вакцин. Каждый из пептидов,

соответствующих аминокислотным остаткам 141–160, 151–160 и 200–213 С-концевого участка VP1, и аминокислотным остаткам 9–24, 17–32 и 25–41 N-концевого участка, сшили по отдельности с инертным белком-переносчиком (гемоцианином моллюска фиссурелии), чтобы предотвратить их разрушение, и ввели морским свинкам. Синтез антител в количестве, достаточном для защиты животного от последующих FMDV-инфекций, обнаруживался только при введении пептида 141–160. Введение же целого VP1 или пептидов 9–14, 17–32, 25–41 индуцировало синтез антител в меньших количествах. Более длинный пептид, состоящий из аминокислотных остатков 141–158 и 200–213, которые были соединены двумя пролиновыми остатками, индуцировал эффективный синтез антител у морских свинок даже в том случае, когда он не был сшит с белком-носителем. Эта «двухпептидная» молекула оказалась эффективнее любого изолированного пептида и блокировала пролиферацию вируса ящура у крупного рогатого скота и морских свинок. Полученные результаты весьма перспективны. Однако доза пептидной вакцины примерно в 1000 раз выше, чем в случае убитой FMDV-вакцины. Для повышения иммуногенности пептидов фрагмент ДНК, кодирующий пептид из аминокислотных остатков 142–160 VP1 FMDV, сшили с геном, кодирующим коровий белок гепатита В (HBcAg). При экспрессии этого химерного гена в *E. Coli* его продукты – белковые молекулы – в процессе самосборки образовывали стабильные «27 нм-частицы», на поверхности которых находился пептид из VP1 FMDV. Эти частицы обладали высокой иммуногенностью. Иммуногенность такой пептидной вакцины была в 500 раз выше, чем у свободного синтетического пептида, но в 10 раз ниже, чем у инактивированных FMDV-частиц. Таким образом, HBcAg можно использовать в качестве эффективной молекулы – носителя синтетических пептидов.

За последние годы появились сообщения о создании учеными Канады вакцины для лечения болезни Альцгеймера, состоящей из амилоидных пептидов. При болезни Альцгеймера в мозгу обнаруживаются и аккумулируются токсические соединения – амилоидные пептиды, образующие бляшки, которые, в свою очередь, повреждают нервные клетки и вызывают симптомы болезни Альцгеймера: потерю памяти и старческое слабоумие. На животных, специально выведенной линии мышей с амилоидными бляшками, показано, что введенная животным пептидная вакцина препятствует образованию новых бляшек, очищает мозговую ткань, предотвращает симптомы болезни

Альцгеймера. На 2008–2010 г.г. намечены клинические испытания полученной вакцины.

Корпорацией Bristol Myers Squibb проводится III фаза клинических испытаний антиген – специфичной пептидной противоопухолевой вакцины MDX-1379, содержащей пептиды меланомы gp 100 и испытываемой для лечения меланомы у человека.

Обнадеживающие результаты получены при изучении пептидных вакцин для лечения аллергических заболеваний. Получено 6 пептидов (по 2 из каждого белка) в рекомбинантной форме в виде дрожжевых вирусоподобных частиц (ВПЧ) с диаметром около 40 нм, что обеспечивает их высокую иммуногенность. На мышах обнаружено снижение продукции Ig E рекомбинантными пептидами из основных белков аллергенов по сравнению с неиммунизированными мышами. Для того, чтобы представить объём работ, выполняемых исследователями при создании пептидных вакцин, мы приведем краткую схему эксперимента получения пептидной вакцины для лечения аллергического заболевания, вызываемого клещами (*D. pteronyssinus*) домашней пыли (КДП):

- селекция 4 основных аллергенов из КДП, чьи эпитопы будут использоваться для создания вакцины;
- селекция индивидуальных пептидов, представляющих потенциальные В-клеточные эпитопы основных аллергенов КДП;
- конструирование гибридных генов, кодирующих дрожжевой белок р1 и *D. pteronyssinus* (Dp) пептидов, имеющих С-концевую локализацию;
- получение 4-х индивидуальных ВПЧ, содержащих по 2 пептида из каждого Dp аллергена;
- анализ способности Ig G и Ig A индуцированных иммунизацией мышей индивидуальными ВПЧ распознавать экстракт КДП и полноразмерные белки;
- оценка связывания Ig E из сыворотки крови больных с рекомбинантными ВПЧ, содержащими Dp пептиды (ВПЧ-Dp);
- изучение протективных свойств индивидуальных ВПЧ-Dp по индукции аллергии экстрактом КДП на модели экспериментальных мышей.

В результате проведения многостадийных исследований предлагается разработать и получить мультивалентную вакцину, основанную на

ВПЧ-пептидной вакцине, содержащей 4 индивидуальных ВПЧ-Dp, экспрессирующих В-клеточные эпитопы основных белков Dp.

Экспериментальные синтетические вакцины получены против дифтерии, гепатита В, гриппа, холеры, стрептококковой и пневмококковой инфекции и ряда других инфекций. Предложены экспериментальные вакцины для профилактики ВИЧ, состоящие из небольших, наиболее иммуногенных отрезков белков вируса, достаточно репрезентативных для формирования иммунного ответа. Основной трудностью получения пептидных вакцин является тот факт, что конформационно В-клеточные эпитопы, которые вовлечены в реакцию нейтрализации, например, для токсинов или вирусов, трудно воспроизводимы синтетическим путем. Несомненный интерес для нас представляют пептидные вакцины для создания иммунитета к вирусным инфекциям, таким, как корь, краснуха и паротит. Эти вакцины могут быть альтернативой к традиционным живым аттенуированным вакцинам.

Предложены пептиды для вакцинации против краснухи. Пептиды получены либо путем химического синтеза, либо рекомбинантным путем, причем последовательность аминокислот соответствует, по крайней мере, одной антигенной детерминанте. Иммунизация животных такой вакциной приводила к появлению вируснейтрализующих антител и защитному эффекту при заражении животных соответствующим вирулентным вирусом. Вакцину вводили внутримышечно или парентерально, используя в качестве носителей и адьювантов микрочастицы, капсулы или липосомы. Были созданы вакцины против краснухи, содержащие несколько пептидных молекул с разными эпитопами. Создание пептидных вакцин против вирусных инфекций, таких, как краснуха, корь, паротит или полиомиелит, не содержащих живых вирусов, позволило бы значительно снизить побочное действие при вакцинации против этих инфекций.

Таким образом, представленные данные показывают возможность получения пептидных вакцин для лечения и профилактики вирусных и бактериальных инфекций, опухолевых и аллергических заболеваний.

#### *Преимущества пептидных вакцин:*

- синтетические пептиды отличаются высокой стандартностью;
- безопасны и обладают слабой реактогенностью;
- гарантированы от остаточной вирулентности (в отличие от существующих вакцин);

- не несут риска реверсии патогенности;
- перспективны в тех случаях, когда предстает трудность выделения и очистки достаточного количества антигенных субстанций для конструирования вакцины (например, при получении антигенов паразитов или опухолевых антигенов).

#### *Сложности при разработке пептидных вакцин:*

- трудность воспроизведения конформации антигенных полимеров, которая характерна для многих вирусов;
- пептиды легко подвергаются протеолизу;
- некоторые эпитопы В-клеток, распознаваемые нейтрализующими антителами, иногда состоят из не связанных друг с другом фрагментов.

Как и в случае испытания пептидных вакцин против гепатита В, пептидная вакцина, составленная из последовательности протеинов малярийного плазмодия, привела к неудовлетворительным результатам у маленьких детей в странах, в которых малярия эндемична. По-видимому, создание вакцин на основе пептидов потребует дальнейших исследований, направленных на создание антигенных пептидных молекул и тщательного подбора носителя.

В будущем синтетические пептидные вакцины могут стать высокоспецифичной, относительно недорогой, безопасной и эффективной альтернативой традиционным вакцинам, несмотря на то, что для этого необходимо провести еще немало исследований по различным направлениям. Основные принципы этих исследований отражены в рекомендациях ВОЗ по созданию и контролю пептидных вакцин (1999 г.). Одним из основных требований является полная характеристика синтезированного пептида физико-химическими и медико-биологическими методами: электрофорез в полиакриламидном геле, ионообменная хроматография, масс-спектрокопия, изоэлектрическое фокусирование и хроматофокусирование, аминокислотный анализ, изучение последовательности аминокислот кислотным, щелочным или ферментативным гидролизом, иммуногенность, антигенность, специфическая биологическая активность. Обязательно должны быть охарактеризованы основные и минорные примеси пептидных мономеров. Должен быть определен адьювант и носитель, причем обязательным требованием является повышение иммуногенности при использовании носителя по сравнению со свободной молекулой пептида. Кроме этого, дополнительно вводимые в состав вакцины компоненты не должны вызывать аутоиммунные процессы и побочные реакции,

должны быть безвредными. Антигенные пептиды могут быть также инкапсулированы в липосомы или липидные эмульсии, включать другие компоненты, иммуностимулирующие комплекс, например, холестерин, фосфолипиды, сапонины, полимеры, полисахариды, цитокины и т.п. Определение иммуногенности вакцин должно проводиться при сравнении с референс-вакциной.

Несмотря на двадцатилетнюю историю создания пептидных вакцин и на перспективность их использования, сегодня не существует ни одной зарегистрированной вакцины на основе пептидов для профилактики инфекционных заболеваний у человека.

### 1.7.5. Рибосомальные вакцины

*Рибосомы* – органеллы, продуцирующие белок по матрице иРНК.

*Выделенные рибосомы с матрицей в чистом виде и представляют собой рибосомальную вакцину.* Сегодня широкое распространение получили следующие рибосомальные вакцины: Бронхомунал, ИРС-19, Рибомунил и др. Рибосомальные вакцины представляют собой рибосомальную фракцию, выделенную из микроорганизмов и обладающую иммуногенными свойствами: способностью индуцировать синтез антител и защищать животных и человека от заражения соответствующим микроорганизмом.

Впервые рибосомальная вакцина была получена в 1965 году из *M. Tuberculosis*. В последующие 20 лет были получены рибосомальные вакцины из различных микроорганизмов: *Salmonella*, *St. aureus*, *N. meningitides*, *V. cholerae*, *Streptococcus*, *Haemophilus influenzae* и др. Смесь рибосомальных фракций патогенных стафилококков, стрептококков, диплококков была исследована в клинике в качестве аэрозольной вакцины, предназначенной для ежедневных ингаляций в течение нескольких недель. В качестве адьюванта в состав таких рибосомальных вакцин был введен пептидогликан, выделенный из *Klebsiella pneumoniae*. Вакцинация приводила к повышению титров соответствующих антител и снижению частоты простудных заболеваний у вакцинированных. Протективная активность рибосомальных вакцин может быть связана с адсорбированными на рибосомах молекулами бактериальных антигенов. В силу этого соединение антигенных детерминант с рецепторами иммунокомпетентных клеток может протекать более эффективно. Несомненный

интерес представляют экспериментальные работы по использованию вакцины для предотвращения кариеса зубов, полученной из *Streptococcus mutalis*.

Схема получения рибосомальных вакцин включает в себя дезинтеграцию бактерий при температуре 2–4 °С в присутствии додецилсульфата натрия, с последующим этапом ступенчатого дифференциального центрифугирования. Первоначально при 18000 г в течение 30–60 минут удаляют обломки клеток, митохондрии, ядра, а затем ультрацентрифугированием при 105000 г в течение 90–120 минут осаждают рибосомы. Следующим этапом является стадия очистки рибосом (очистку можно проводить центрифугированием в градиенте, например, сахарозы 10–30 %), стерилизующей фильтрации и лиофилизации продукта. Предложен также способ получения рибосом, позволяющий отказаться от использования ультрацентрифугирования. После дезинтеграции клеток проводят центрифугирование для удаления неразрушенных клеток и их осколков; к супернатанту прибавляют буферный раствор (20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH – 7,2) и 50 % полиэтиленгликоль (6000) до конечной концентрации 10 %. Осадок рибосом отделяют центрифугированием, освобождают от остатков ПЭГ и подвергают лиофилизации. Преимуществом данного метода авторы считают отсутствие ультрацентрифугирования и лучшую очистку от эндотоксинов.

Примером рибосомальных вакцин, широко представленным на фармацевтическом рынке, является препарат «Рибомунил» (Pierre Fabre Medicament, Франция), выпускаемый в виде таблеток. Каждая таблетка содержит 0,25 мг бактериальных рибосом (35 % рибосом *Klebsiella pneumoniae*, 30 % рибосом *Diplococcus pneumoniae*, 30 % рибосом *Streptococcus pyogenes*, 5 % рибосом *Haemophilus influenzae* и 0,375 мг протеогликанов мембраны *Klebsiella pneumoniae*). Препарат оказывает иммунокорректирующее действие, сочетает свойства вакцины и неспецифического иммуностимулятора. Входящие в состав «Рибомунилы» рибосомы выделены из бактерий, наиболее часто вызывающих инфекционные заболевания дыхательных путей и ЛОР-органов. Рибосомальная фракция препарата стимулирует функцию Т- и В-лимфоцитов, обеспечивает вакцинирующий эффект (значительно превосходящий таковой при использовании вакцин из цельных микробных тел) путем образования специфических сывороточных и секреторных антител к четырем видам наиболее распространенных инфекционных бактериальных возбудителей. Протеогликаны стимулируют неспецифические факторы

защиты: активируют макрофаги и полиморфно-ядерные клетки (фагоцитоз, хемотаксис, адгезия), повышают синтез альфа-интерферона, интерлейкинов – 1, 6 и 8; обеспечивают поликлональную стимуляцию Т- и В-лимфоцитов, активируют клетки-киллеры. По имеющимся данным, рибосомы являются в 1000 раз более иммуногенными, чем цельные микробные клетки, так как содержат весь спектр антигенных структур бактерий.

Препараты ИРС 19 – *St. Pneumoniae* (тип 1, 2, 3, 5, 8, 12), *St. Pyogenes* группа А, *H. Influenzae* (тип В), *Klebsiella pneumoniae*, *S. Aureus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria subflava* разновидность *flava*, *Neisseria subflava* разновидность *perflava*, *St. dysgalactiae* (группа С), *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* группа G (*Solvay Pharmaceuticals*, Франция ) и Бронхомунал – *St. Pneumoniae*, *St. Viridans*, *St. Pyogenes*, *H. Influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaena*, *S. Aureus*, *Moraxella catarrhalis* (*Sandoz, Lek*, Словения) представляют собой лиофилизированные лизаты бактерий, которые в своем составе также содержат рибосомальную фракцию бактерий. Препараты повышают естественные защитные силы организма, влияя как на гуморальные, так и на клеточные механизмы иммунитета. Препараты увеличивают количество циркулирующих Т-лимфоцитов и синтез Ig А в слизистой оболочке пищеварительного тракта, а также повышают содержание иммуноглобулинов в секрете дыхательных путей.

Данные литературы о рибосомальных (субклеточных) вакцинах свидетельствуют о высокой иммуногенности препаратов и их безвредности, относительно доступных технологиях получения препаратов и стабильности готовой вакцины при хранении в широком диапазоне температур (от плюс 10 °С до плюс 25 °С).

### 1.8. Производство вакцин

Требования к производству иммунобиотехнологических препаратов изложены в ряде документов по надлежащей производственной практике GMP, в разделах, посвященных производству биологических и генно-инженерных продуктов. Мы остановимся на основных положениях изложенных в этих документах, а именно требованиях, предполагающих наличие всех средств для GMP:

- обученный персонал, имеющий необходимую квалификацию;
- соответствующие помещения и площади;
- необходимое оборудование и правильное его обслуживание;
- соответствующие вещества, первичная упаковка и этикетки;
- утвержденные методики и инструкции;
- соответствующее хранение и транспортирование.

Способы, с помощью которых производятся, контролируются и вводятся в организм биологические препараты, обязательно требуют соблюдения некоторых особых предосторожностей. В отличие от препаратов, как правило, получаемых и контролируемых воспроизводимыми химическими и физическими методами, биологические препараты производятся с использованием биологических процессов и материалов, таких, как культуры клеток, живые микроорганизмы (вирусы, бактерии, грибы), кровь или плазма человека, животных и т.п. Эти процессы отличаются присущей им вариабельностью, так что диапазон и природа побочных продуктов также варьируется. Кроме того, контроль препаратов осуществляется на лабораторных животных, культуре клеток, живых микроорганизмах, что также приводит к определенной вариабельности полученных результатов. По этой причине при производстве биологических препаратов необходимо точнейшее следование принципам GMP на всех стадиях производства.

#### *Требования к персоналу*

1. Предприятием, производящим биологические препараты (вакцины, препараты крови, генно-инженерные продукты и др.), и его персоналом должны управлять люди, хорошо изучившие методы, применяемые при производстве биологических препаратов, и обладающие научными знаниями, на которые опирается производство этих продуктов.

2. Весь персонал, работающий в зонах, где производятся биологические препараты, должен пройти дополнительное обучение, которое специфично для выпускаемой продукции и их работы. Персонал должен получить соответствующую теоретическую и практическую подготовку по микробиологии, санитарии, вирусологии, генетике, фармации, ветеринарной медицине и т.д. Операторы должны быть обучены правильному выполнению методик.

3. Персонал, работающий в чистой и асептической зонах, должен быть подобран особенно тщательно: следует убедиться, что он будет соблюдать все предписанные правила; что он не подвержен каким-либо заболеваниям



или состояниям, которые могут нарушить микробиологическую чистоту продукта. Важным является установление надлежащего уровня чистоты, гигиены и опрятности. Персонал должен быть проинструктирован о том, что следует немедленно сообщать о проявлении у него любых симптомов (например, насморк, кашель, диарея и др.), которые могут вызвать увеличение количества или изменения типов микроорганизмов в рабочей среде. Необходимо систематически проверять состояние здоровья, которое может неблагоприятно сказаться на качестве продукта и должно служить основанием для отстранения от работы в производственной или контрольных зонах.

4. В чистой и асептических зонах в процессе работы должно находиться лишь минимальное количество персонала. Инспекционные проверки и контрольные функции следует по возможности осуществлять извне.

5. В течение рабочего времени персонал, который проводит работы с живыми микроорганизмами или животными, не должен входить в помещения, где проводится работа с другими микроорганизмами или продуктами, не приняв четко установленных мер по удалению загрязнений, в частности, таких, как смена обуви и одежды.

6. Персонал, занятый в производственных процессах, не должен контактировать с теми, кто ухаживает за животными.

7. Следует систематически проводить обучение кадров, вести документацию по подготовке кадров и периодически оценивать эффективность программы обучения.

8. Весь персонал (в том числе и инспектор), занятый в производстве и контроле, включая работу с животными, должен быть вакцинирован соответствующими вакцинами.

9. Любые изменения в иммунологическом статусе персонала, которые могут отрицательно повлиять на качество продукции, должны исключать возможность работы в производственной зоне. Производство БЦЖ вакцины и препаратов туберкулина должны проводиться персоналом, который регулярно проходит контроль иммунологического статуса и рентгеновский контроль грудной клетки.

#### ***Требования к помещениям и оборудованию***

1. Внутренние поверхности (стены, полы, потолки) должны быть гладкими и без трещин, чтобы их было легко мыть и дезинфицировать. По воз-

можности следует избегать наличия дренажей, а в асептической зоне дренажи и водопроводные раковины должны отсутствовать.

2. Освещение, отопление, вентиляция и кондиционирование воздуха должны обеспечивать надлежащую температуру, относительную влажность воздуха и сводить до минимума загрязнения с учетом удобства персонала.

3. Степень контроля окружающей среды, загрязнения частицами и микробной контаминации производственных помещений должна соответствовать требованиям к продукту и конкретному этапу производства, при этом необходимо учитывать уровень загрязнения исходных материалов и риск для конечного продукта.

4. Работу с живыми организмами следует проводить на оборудовании, позволяющем поддерживать чистоту культуры и сохранять её во время производственного процесса.

5. В случае производства препаратов в порядке производственной кампании планировка и конструкция помещений и оборудования должны быть такими, чтобы их обеззараживание, а также санитарная обработка и очистка, после окончания кампании не представляла проблем.

6. Партии посевов и банк клеток, используемые для производства биологических препаратов, должны храниться отдельно от других материалов. Доступ к ним должен быть разрешен уполномоченному на это персоналу.

7. Такие препараты, как убитые вакцины, в частности, полученные путем генной инженерии, анатоксины и бактериальные экстракты, после инактивации можно перемещать в контейнерах точно так же, как и любые другие стерильные биологические препараты.

8. Специальные помещения необходимо использовать (вплоть до завершения процесса инактивации) для производства вакцины БЦЖ, анатоксинов: столбнячного, ботулинистического, гангренозного и других биологических препаратов.

9. Для производства препаратов цельной крови или плазмы человека и животных должны быть отдельные помещения и отдельное оборудование. Производство препаратов из крови человека и крови животных должно быть разделено.

10. Помещения и оборудование при производстве биологических препаратов должно быть сконструировано таким образом, чтобы исключить пересечение потоков и возможность перекрестного загрязнения.

11. Для обработки стерильных продуктов следует использовать зоны с избыточным давлением, однако в специальных зонах, где работают с патогенными микроорганизмами, допускается и отрицательное давление.

12. Система труб, клапаны и вентиляционные фильтры должны быть сконструированы надлежащим образом для упрощения очистки и стерилизации. Рекомендуется использование систем CIP (clean in place) и SIP (sterile in place). Клапаны на сосудах ферментации должны полностью стерилизоваться паром. Воздушные фильтры должны быть гидрофобными и проходить инспекцию согласно утвержденному графику в процессе использования.

13. В зонах производства для работы с патогенными микроорганизмами должны быть устройства для обработки. Воздух должен отводиться через специальные фильтры. Стоки, которые могут содержать микроорганизмы, должны эффективно обрабатываться.

14. Одновременное производство в одной и той же зоне с использованием закрытых систем биоферментеров может быть приемлемым для таких продуктов, как моноклональные антитела, и продуктов, получаемых методом рекомбинантной ДНК-технологии.

### ***Требования к производству***

1. Для всех производственных операций должны существовать стандартные рабочие методики, стандартные операционные процедуры, стандарты предприятия.

2. В спецификации на исходное сырье должны быть включены подробные описания их источников происхождения и метода производства, а также применявшихся методов контроля, в частности, микробиологической чистоты.

3. Питательные среды и культуры следует вводить в биореакторы или ферментеры в тщательно контролируемых условиях, обеспечивающих исключение загрязнения. После проведения операции необходимо убедиться в герметичности соединений. По возможности питательные среды необходимо стерилизовать *in situ*. Возможно применение стерилизующих фильтров непрерывного действия для введения в биореактор газов, кислот, щелочей, растворов углеводов или дополнительных количеств питательных сред.

4. Если в процессе производства осуществляется инактивация (например, при получении анатоксинов или вакцин), то следует принять меры, которые позволят избежать риска перекрестной контаминации инактивированного и неинактивированного продуктов.

5. Чтобы избежать нежелательного дрейфа свойств, который может наблюдаться при повторяющемся субкультивировании или множественном воспроизведении, производство препаратов, получаемых с помощью микробных культур (например, вакцина БЦЖ), клеточных культур (например, вакцины против кори или полиомиелита), или размножением в эмбрионах или животных должно основываться на системе главных и рабочих партий посевного материала или банка клеток.

6. Количество поколений (удвоений) между партией посевного материала или банком клеток и конечным продуктом должно согласовываться с дозой препарата. Масштабирование процесса не должно менять этого фундаментального соотношения. Партии посевного материала и банки клеток должны быть созданы, храниться и использоваться таким образом, чтобы свести к минимуму риск загрязнения или изменения. Должен проводиться постоянный мониторинг температуры хранения материала с фиксацией полученных результатов. Любые отклонения от установленных пределов и любые предпринятые действия по корректировке должны протоколироваться.

7. Только уполномоченному персоналу должна быть разрешена работа с материалами. Эта работа должна выполняться под контролем ответственного лица. Доступ к хранящемуся материалу должен контролироваться. Различные партии посевного материала или банки клеток должны храниться таким образом, чтобы предотвратить путаницу или перекрестное загрязнение.

8. Центрифугирование, сепарирование или смешивание продуктов может привести к образованию аэрозолей. При этом необходимо принимать меры предосторожности для предотвращения переноса живых микроорганизмов.

9. Для хроматографической очистки ряда препаратов (например, для вакцины против гепатита В или полиомиелита) используется целый ряд оборудования, и, как правило, такое оборудование должно быть предназначено для очистки одного продукта, должно стерилизоваться и проходить санитарную обработку между партиями. Не рекомендуется использование одного и того же оборудования на различных этапах обработки. Должны быть опреде-

лены критерии приемлемости, срок службы и способы санитарной обработки и стерилизации колонок.

10. Все производственные процессы должны быть точно определены, и их следует систематически актуализировать с учетом накопленного опыта.

11. Критические стадии производственного процесса биологических препаратов и существенные изменения производственного процесса должны пройти валидационные исследования.

12. Во время производства необходимо составлять протоколы рукописным способом и/или с использованием записывающего прибора, который документально подтверждает, что действительно проведены все стадии, требуемые установленными методиками и инструкциями, а также, что количество и качество продукции соответствует запланированным нормам. Любые значительные отклонения должны быть полностью запротоколированы и исследованы. Протоколы производственного процесса, позволяющие исчерпывающе проследить историю серии, следует составлять в полной и доступной форме.

13. Необходимо учитывать, что изменения, которые для фармацевтических препаратов относятся к изменениям типа I, для вакцин и препаратов крови относятся к существенным изменениям типа II. К этим изменениям типа II относятся изменения объема серий, даже незначительные изменения в производственном процессе, смена производителя активной субстанции, изменения в спецификации и ряд других.

14. Если в ходе разработки продукта вносятся изменения в производственный процесс, эти изменения и сопутствующие им модификации тестирования в ходе процесса должны подробно описываться. Следует отметить, что новый продукт может требовать дополнительных доклинических исследований, подтверждающих его исходное клиническое применение. Необходимо включать информацию о процессе очистки и предоставлять данные о стабильности, показывающие стабильность продукта в течение клинических испытаний. В дополнение к этому, может возникнуть потребность в проведении исходных клинических испытаний на небольших исследуемых группах или с повышением дозы вакцины с целью установления безопасности продукта. Кроме того, может быть необходимым проведение прямого сравнения старых и новых продуктов в ходе рандомизированных клинических испыта-

ний, чтобы установить взаимосвязь между функционированием двух продуктов.

### ***Требования к животным***

Животные используются как для получения биологических препаратов (например, обезьяны для получения полиомиелитной вакцины; лошади для получения специфических иммуноглобулинов и антитоксических сывороток; эмбрионы японских перепелов для получения вирусных вакцин), так и для их контроля: вакцина БЦЖ (морские свинки), вакцина АКДС (мыши, морские свинки, кролики), вирусные вакцины (обезьяны).

Помещения для животных, используемых при производстве и контроле препаратов, должны быть отделены от помещений производственного процесса. Проводится обязательный контроль на контаминацию животных бактериальными, вирусными, микоплазменными и другими инфекциями. Строго регламентируется состав кормов для каждого вида животных. На предприятиях, производящих биологические препараты, должны быть специалисты по ветеринарной медицине. Животные каждого вида должны находиться в отдельных помещениях. Обязательным является контроль и регистрация состояния здоровья животных. Должны быть утверждены правила работы с животными и требования по эксплуатации. Общие требования к помещениям для животных и уходу за ними изложены в Директиве ЕС 86/609/ЕЕС. Сегодня для содержания и обслуживания животных создана специальная индустрия, обеспечивающая проведение процессов в соответствии с требованиями GMP/GLP. Так, например, Tecniplast, в соответствии с директивами ЕС 86/609/ЕЕС и руководством по содержанию лабораторных животных ETS 123 Rev A, выпускает пластиковые клетки для содержания животных с индивидуальной вентиляцией, стеллажи для клеток (полочные и модульные), мочные машины, автоклавы для клеток, ламинарные станции, станции удаления используемых подстилок и другое оборудование, а также инвентарь для животных.

### ***Требования к контролю качества.***

1. Особо важную роль в обеспечении стабильности качества биологических препаратов играет межоперационный контроль. Отличительной особенностью данной группы препаратов является невозможность проведения контроля качества многих препаратов на стадии готового средства. Это диктует необходимость проведения контроля на всех стадиях производства.

Так, например, для вакцин (АКДС-вакцина или рекомбинантная вакцина против гепатита В) в соответствии с рекомендациями ВОЗ контроль проводится на этапе очищенных концентрированных анатоксинов (АКДС) или концентрата раствора HBsAg (вакцина против гепатита В) до добавления адъюванта. Затем препарат контролируется как в форме in bulk, так и в форме готового препарата в первичной упаковке.

2. Для возможности проведения повторных контролей или подтверждения его результатов может быть необходимым хранение образцов промежуточных продуктов в достаточном количестве и при соответствующих условиях хранения.

3. Важнейшим вопросом производства биологических препаратов является обеспечение системы контроля качества стандартными образцами. Так, например, для контроля вакцин, препаратов, крови и других биотехнологических продуктов используются рекомендованные ВОЗ образцы: международные биологические стандарты, международные биологические эталонные препараты и международные биологические эталонные реагенты. Сегодня существуют стандартные образцы к большинству производимых биологических препаратов: вакцинам (см. табл. 14), интерферонам, препаратам крови, интерлейкинам и многим другим биологическим продуктам. Обеспечение такими стандартами осуществляют, например, Национальный институт стандартизации и контроля биологических препаратов (NIBSC, Англия); Лаборатория стандартизации биологических препаратов Государственного института сывороток (Копенгаген, Дания); Государственный институт стандартизации и контроля им. Л.А. Тарасевича (Москва, Россия); Международный институт вакцин (Южная Корея). Необходимо отметить, что в Украине на сегодняшний день не существует органа, обеспечивающего производителей национальными биологическими стандартами.

Крайне важным и своевременным для проведения контроля качества вакцин, вводимых людям, явилось создание и выпуск в 2008 году второго дополнения к Государственной Фармакопее Украины (ГФУ). В данном документе впервые на территории стран СНГ представлены требования к качеству и производству вакцин. Кроме того, предлагаются методы для контроля ряда компонентов вакцин, включая адъюванты и консерванты. Изложение национальных требований к вакцинам в ГФУ совпадает с требованиями Европейской фармакопеи. Изложены требования как к производственному процессу, так и к контролю на всех этапах производства: промежуточных продуктов; продукции in bulk; конечного продукта. Также указан принцип определения срока годности вакцины и требования к стабильности.

Таблица 14 – Перечень стандартов ВОЗ, используемых для контроля вакцин

Наименование стандарта	Характеристика стандарта	Держатель
1	2	3
БЦЖ-вакцина (живая), 1 международный стандарт, 1965 г.	Лиофилизированная (2,5 мг) бактериальная масса	NIBSC
Вакцина против кори (живая) 2 международный стандарт, 1994 г.	Лиофилизированный аттенуированный штамм кори – $4,4 \cdot \log_{10}$ 20000 инфекционных единиц во флаконе	NIBSC
Вакцина против паротита (живая) 1 международный стандарт, 1994 г.	Лиофилизированный аттенуированный штамм паротита – $4,6 \cdot \log_{10}$ 40000 инфекционных единиц во флаконе	NIBSC
Вакцина против краснухи (живая) 1 международный стандарт, 1994 г.	Лиофилизированный аттенуированный штамм краснухи – $3,9 \cdot \log_{10}$ 8000 инфекционных единиц во флаконе	NIBSC
Вакцина против полиомиелита инактивированная, 1 международный стандарт, 1994 г.	Тип-1-антиген – 430 D антигенных ед./мл Тип-2-антиген – 95 D антигенных ед./мл Тип-3-антиген – 285 D антигенных ед./мл	NIBSC
Вакцина против полиомиелита (живая) аттенуированная, 1 международный стандарт, 1995 г.	Тип-1 – $6,6 \cdot \log_{10}$ CCID 50 / мл Тип-2 – $5,6 \cdot \log_{10}$ CCID 50/ мл Тип-3 – $6,2 \cdot \log_{10}$ CCID 50/ мл	NIBSC
Вакцина против коклюша, 3 международный стандарт, 1998 г.	Лиофилизированная инактивированная Bordetella pertussis, 46 ME/мл	NIBSC
Коклюшный токсин, 1 международный стандарт, 2003 г.	Коклюшный токсин 10000 ME/ампуле	NIBSC
Гепатит В, поверхностный антиген, 2 международный стандарт, 2003 г.	HBsAg 33 ME/ ампуле	NIBSC
Вакцина против гемофильной инфекции типа b, 1 международный стандарт, 2004 г.	Модифицированный полисахарид, конъюгированный с белком	NIBSC
Дифтерийный анатоксин, 3 международный стандарт, 1999 г. (пересмотр 2004 г).	Адсорбированный дифтерийный анатоксин, 160 ME/ампула	NIBSC
Дифтерийный анатоксин, 1 международный стандарт для флокуляции, 1988 г.	Дифтерийный анатоксин, 900 Lf/мл	NIBSC

1	2	3
Столбнячный анатоксин, 3 международный стандарт, 2000 г. (пересмотр 2004 г).	Адсорбированный дифтерийный анатоксин, 469 МЕ/ ампула	NIBSC
Столбнячный анатоксин, 1 международный стандарт для флокуляции, 1988 г.	Столбнячный анатоксин 1000 Lf/ампула	NIBSC

### **Контрольные вопросы**

1. Классификация вакцин. Роль вакцин в профилактике инфекционных заболеваний.
2. Привести схему получения дифтерийного очищенного концентрированного анатоксина.
3. Перечислить основные требования к производству вакцин в условиях надлежащей производственной практики (GMP).
4. Привести схему получения живых вирусных вакцин.
5. Привести схему получения рекомбинантных вакцин на примере вакцины против гепатита В.
6. Привести перечень основных методов контроля вакцинных препаратов.
7. Перечислить основные требования к производству живой противотуберкулезной вакцины БЦЖ.
8. Привести примеры вакцин будущего: растительных, пептидных и ДНК-вакцин.
9. Привести схему получения рибосомальных вакцин.
10. Роль животных в производстве и контроле вакцинных препаратов.

## **Раздел 2. ПРЕПАРАТЫ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ РАЗЛИЧНОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ**

### **2.1. Иммуноглобулины крови человека**

*Иммуноглобулины* представляют собой семейство структурно родственных белков, несущих функцию циркулирующих антител.

Сегодня известно *пять основных классов иммуноглобулинов*: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Иммуноглобулины синтезируются лимфоидными клетками, в частности плазматическими. Ферментативный гидролиз папаином позволил разделить молекулу иммуноглобулина на три фрагмента. Два из этих фрагментов идентичны друг другу и сохранили способность связывать по одной молекуле антигена. Эти фрагменты обозначаются как Fab (Fragment antigen binding – фрагмент, связывающий антиген). Третий фрагмент, обозначаемый как Fc (Fragment crystalline – фрагмент кристаллический), обуславливающий различные эффекторные (добавочные) функции антител: связывание комплемента, реакция с макрофагами и транспорт через биологические мембраны. В 1962 году Porter была предложена схема строения молекул иммуноглобулинов, согласно которой каждая молекула состоит из четырех полипептидных цепей двух типов: двух длинных (тяжелых) – 50–77 кДа и двух более коротких (легких) – 22 кДа. Подобное строение характерно для иммуноглобулинов всех видов животных и человека. Тяжелые цепи ковалентно связаны друг с другом дисульфидными мостиками, и обычно каждая из них таким же образом соединена с одной легкой цепью. Легкие цепи являются общими для всех классов иммуноглобулинов. Тяжелые цепи каждого из пяти классов имеют свои характерные особенности. Легкая и тяжелая цепь создают структуру, на конце которой расположены шесть полипептидных цепей, образующих область связывания антигена – участок комплементарности, CDR (complementary determining region) к эпитопу антигена по три CDR-участка в VL и VH-доменах.

### **2.1.1. Иммуноглобулин человека нормальный для внутримышечного введения**

До появления препаратов иммуноглобулинов и организации их производства для профилактики лечения кори, полиомиелита, гепатита А, краснухи и ветряной оспы использовали плазму или сыворотку людей переболевших этими заболеваниями.

Впервые препараты нормального иммуноглобулина из сыворотки крови человека были применены в 1944–1945 гг. Ordman С. W. и Stokes J. для лечения и профилактики кори и гепатита. В 1952 году врач О. Bruton с успехом использовал фракции иммуноглобулина человека, полученные по методу Кона. Он применил подкожное и внутримышечное введение иммуноглобулина при агаммаглобулинемии для профилактики хронических заболеваний легких – пневмонии и других бактериальных инфекциях. Для выделения иммуноглобулинов в промышленных количествах в настоящее время повсеместно используется одна из модификаций метода, основанного на фракционировании белков крови путем обработки этанолом при низких температурах, предложенных в 1946 году Коном. Прежде чем приступить к рассмотрению конкретных технологий получения иммуноглобулинов мы рассмотрим основные методы выделения иммуноглобулинов из крови человека.

1. *Осаждение органическими растворителями, преимущественно этиловым спиртом.*

Технологический процесс выделения IgG фракции основан на последовательном изменении основных факторов, влияющих на растворимость белков: концентрации этанола, величины рН, ионной силы, концентрации белка и температуры. Фракционирование осуществляется путем медленного добавления к растворам сывороточных белков охлажденного до минус 10–15 °С этанола при непрерывном перемешивании и постоянном снижении температуры ниже 0 °С. В этих условиях денатурирующее воздействие спирта на сывороточные белки проявляются лишь вне значительной степени и выделенная фракция иммуноглобулинов сохраняет растворимость, хотя незначительная часть молекул IgG подвергается агрегации. У этого вида фракционирования есть сложности: необходим строгий контроль температуры, рН, ионной силы в процессе производства и меры по устранению вспенивания. Получен-

ная спиртовым осаждением по методу Кона фракция II состоит в основном из IgG.

2. *Очистка с помощью этакридина лактата (риванола).*

Риванол образует с сывороточными белками комплексы, которые выпадают в осадок при рН 5,0–5,8. В виду высокой изоэлектрической точки IgG по сравнению с остальными сывороточными белками в слабощелочной среде риванол не образует комплексов с IgG.

К сыворотке добавляют раствор риванола (7,5 г/л) при постоянном перемешивании. Осадок удаляют центрифугированием. IgG остается в надосадочной жидкости. Риванол удаляют либо активированным углем (10 мг/мл), либо хлоридом натрия (50г/л). В дальнейшем иммуноглобулины осаждают одним из известных методов, например, этанолом. Метод очистки иммуноглобулинов с помощью риванола был предложен I. Horejsi и P. Smetana в 1954 году.

3. *Осаждение полиэтиленгликолем, например, ПЭГ с относительной молекулярной массой 400–6000.*

Для разделения белков ПЭГ оказался особенно удобным, поскольку он не приводит к их денатурации. Для примера, можно привести данные фракционирования сыворотки полиэтиленгликолем: 60 г/л полностью осаждает IgM; 120 г/л – осаждает IgG; 140 г/л – осаждает IgA. Таким образом, возможно проведение фракционирования иммуноглобулинов по классам. Преимуществом применения данного метода является возможность проведения процесса фракционирования при комнатной температуре. Особое внимание необходимо уделять методам очистки препарата от остаточного количества полиэтиленгликоля.

4. *Осаждение аммонием сернокислым или натрием сернокислым.*

Добавление солей приводит к изменению ионной силы раствора и заряда молекулы белка, что в свою очередь способствует резкому уменьшению растворимости белка и выпадению его в осадок. Для примера можно привести следующий метод: к 100 мл сыворотки добавляют 50 мл насыщенного раствора аммония сернокислого. Осадок отделяют центрифугированием и растворяют в 50 мл дистиллированной воды и снова осаждают 25 мл насыщенного раствора аммония сернокислого. Осаждение повторяют 4–5 раз. Для освобождения от соли проводят диализ против буферного раствора или воды. Для промышленного варианта более приемлемо использование диафильтра-

ции на аппаратах с мембранами с порогом отсека 15–50 кДа. Процесс осаждения проводят при температуре 4–8 °С.

5. *Хроматографические и гельфильтрационные методы очистки на различных сорбентах:* катионно- и анионообменных на основе сефадексов (ДЕАЕ (диэтиламиноэтил) – сефадекс; QAE (QAE-аминоэтил-2-оксипропил-аминоэтил) – сефадекс, А-25, А-50; SP (SP-сульфопропил), С-25, С-50; CM (CM-карбоксиметил), С-25, С-50; сефадексы G-100 и G-200; ионообменные целлюлозы: карбоксиметилцеллюлоза (КМ-целлюлоза); фосфоцеллюлоза (Ф-целлюлоза); диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ-целлюлоза).

6. *Для выделения и очистки иммуноглобулинов из крови человека используют также и другие методы,* которые сегодня используются в промышленных условиях еще недостаточно широко, а именно: *аффинная хроматография на различных носителях,* способных специфически связывать иммуноглобулины; *осаждение иммуноглобулинов ионами металлов:* Zn, Cu, Ba, Mn, Ca; *очистка с помощью жирных кислот,* например, каприловой кислоты; *осаждение ионными полимерами,* например, поливинилпирролидоном.

Необходимо отметить, что все чаще при выделении иммуноглобулинов используют комбинацию двух или более методов. Для промышленного выделения наиболее активно используют осаждение этиловым спиртом при температуре ниже 0 °С с привлечением хроматографических методов на различных носителях.

*Схему получения иммуноглобулина человека нормального для внутримышечного введения спиртовым осаждением* можно представить следующим образом:

1. К сыворотке крови человека, охлажденной до температуры 0–2 °С при постоянном перемешивании добавляют, охлажденный до минус 10 °С этиловый спирт до конечной концентрации 8,0 %. В конце осаждения температура смеси должна находиться в пределах от 0 °С до минус 2 °С. На этой стадии происходит осаждение остатков фибриногена, денатурированного белка, тканевых частиц и других нерастворимых примесей. Выпавший балластный осадок удаляют центрифугированием при низких температурах. Важным условием получения стабильных иммуноглобулинов, как на этой стадии, так и на всех последующих, является строгое соблюдение температурных режимов и минимального вспенивания смесей при перемешивании и

центрифугировании. Наиболее интенсивной при перемешивании является зона, которая прилегает к лопастям мешалки и захватывается ими. Подачу спирта осуществляют именно в эту зону для предупреждения денатурации белков за счет высокой концентрации осадителя. Охлажденный спирт поступает в реактор либо самотеком из мерника, расположенного на определенной высоте над реактором (около 0,8–1,0 метра), либо из мерника с помощью дозирующего насоса, снабженного устройством, позволяющим регулировать скорость подачи спирта.

2. Центрифугат охлаждают до температуры минус 3–4 °С и осаждают медленным прибавлением, охлажденного до минус 20 °С этилового спирта до конечной концентрации 25 %. Осаждение проводят в течение 3–4 часов. Конечная температура смеси минус 5–6 °С. Обязательным условием является поддержание величины рН на уровне 7,1–7,3. Смесь центрифугируют (температура центрифугата на выходе не выше минус 6 °С). Центрифугат используют для выделения альбумина. Осадок (фракция II + III по Кону), содержащий фракцию иммуноглобулинов подвергают дальнейшей очистке.

3. Полученный осадок при 0 °С растворяют в 0,9 % изотоническом растворе хлорида натрия до получения гомогенной суспензии и процесс переосаждения повторяют при тех же условиях (см. п. 2). Получают осадок А1.

4. Осадок А1 растворяют при температуре от 0 °С до минус 1 °С в концентрированном растворе хлорида натрия при ионной силе 0,01, доводят величину рН до 5,0–5,1 (по другим данным оптимальная величина рН – 5,3–5,4) и осаждают, охлажденным до минус 20 °С этиловым спиртом. Конечная концентрация спирта 17 % и температура минус 5–6 °С. Осаждение проводят в течение 3–5 часов, постепенно увеличивая скорость добавления спирта. Для формирования осадка смесь оставляют при указанной температуре на 10–16 часов. На этой стадии при рН 5,1–5,2 (изоэлектрическая точка альфа- и бета-глобулинов) в осадок выпадают балластные компоненты, потери иммуноглобулиновой фракции незначительны. Смесь центрифугируют при низких температурах. На выходе центрифугат (Б), содержащий иммуноглобулины, должен иметь температуру не выше минус 5 °С.

5. К центрифугату Б, охлажденному до температуры минус 3–4 °С прибавляют концентрированный раствор натрия хлорида до ионной силы 0,05–0,07 и начинают осаждение медленным прибавлением, охлажденного до минус 20 °С этилового спирта до конечной концентрации 25 %. Осаждение

проводят в течение 3–4 часов. Конечная температура смеси минус 5–6 °С. Обязательным условием является поддержание величины рН на уровне 7,1–7,3. Смесь центрифугируют (температура центрифугата на выходе не выше минус 6 °С). Осадок содержит иммуноглобулины.

6. Осадок подвергают прессования для удаления остаточного количества спирта, затем растворяют в 0,9 % растворе натрия хлорида и проводят стерилизующую фильтрацию. Стерильный раствор иммуноглобулина выдерживают при комнатной температуре в течение 30–45 суток и при температуре 2–8 °С – 30–45 суток. Указанный срок необходим для формирования осадков небольших количеств лабильных примесей и их последующего удаления фильтрацией. Выпавший осадок удаляют фильтрацией.

7. Раствор иммуноглобулина подвергают диафильтрации на разделительных аппаратах для полного удаления этилового спирта, низкомолекулярных примесей и фрагментов. Устанавливают рН раствора – (7,0 ± 0,4); белок – (10 ± 0,5) %; в качестве стабилизатора прибавляют аминокислоту – глицин в количестве 12–30 мг/мл; подвергают стерилизующей фильтрации. Добавление полярных веществ к раствору повышает диэлектрическую постоянную, что приводит к повышению заряда глобулярного белка и стабильности молекул иммуноглобулинов в растворе. Так, для стабилизации иммуноглобулинов добавляют аминокислоту – глицин в количестве от 1,2 до 3,0 %.

8. Проведение контроля препарата иммуноглобулина в форме in bulk и разлив в первичную упаковку (ампулы или флаконы).

9. Контроль готового препарата.

10. Маркировка и упаковка иммуноглобулина для внутримышечного введения.

Представленная схема получения иммуноглобулина в различных вариантах сегодня используется большинством производителей препаратов крови и по праву может считаться «классической». Однако и ей присущи определенные недостатки: большой расход этилового спирта, соблюдение низкотемпературных режимов и, что наиболее важно, потеря иммуноглобулинов (до 50 %) в процессе фракционирования. В связи с этим в течение всех 50 лет использования метода Кона проводятся работы по увеличению выхода иммуноглобулинов за счет введения в технологию дополнительных стадий. Для понимания технологических потерь в табл. 15 приводятся данные по содержанию иммуноглобулинов в плазме и фракциях, полученных при спиртовом осаждении.

Таблица 15 – Содержание IgG, IgA и IgM в плазме крови человека и фракциях при спиртовом осаждении

№ п/п	Фракции	Содержание иммуноглобулинов в граммах в пересчете на 1 литр исходной плазмы			% от содержания в плазме		
		IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM
1	Плазма	8,46±0,37	1,6±0,13	0,83±0,07	100	100	100
2	Осадок А8	0,1±0,02	0,02±0,001	следы	1,2	1,25	0,0
3	Центрифугат А	0,85±0,04	0,56±0,04	следы	10,0	35,0	0,0
4	Центрифугат А1	0,3±0,05	следы	следы	3,5	0,0	0,0
5	Осадок Б	1,91±0,09	0,78±0,04	0,74±0,03	22,6	48,75	89,2
6	Осадок В	Конечный продукт	0,02±0,001	0,01±0,001	62,7	1,25	1,2

Как видно из табл. 15 основные потери иммуноглобулина класса G наблюдается на стадии осадка Б. Из приведенных данных также видно, что использование спиртового осаждения приводит практически к полной потере иммуноглобулинов классов А и М. Это заставляет специалистов постоянно работать над введением дополнительных стадий с целью увеличения выхода иммуноглобулина для внутримышечного применения.

Можно привести несколько технологических схем дополнительного извлечения иммуноглобулина.

*Способ извлечения иммуноглобулина класса G спиртовым осаждением сводится к следующему:*

1. Экстрагирование IgG из осадка Б проводили при рН 5,3–5,4, в условиях близких к изоэлектрической точке плазминогена. Для этой цели осадок суспендировали в воде в соотношении 1 : 15, устанавливали рН 5,3–5,35 и охлаждали до 0 °С или минус 1 °С.

2. Охлажденную суспензию осаждают, охлажденным до минус 20 °С этиловым спиртом. Конечная концентрация спирта 17 % и температура минус 5–6 °С. Осаждение проводят в течение 2–3 часов, постепенно увеличивая скорость добавления спирта. Для формирования осадка смесь оставляют при указанной температуре на 10–12 часов. На этой стадии при рН 5,3–5,4 (изоэлектрическая точка плазминогена) в осадок выпадают балластные компо-



ненты, потери иммуноглобулина незначительны. Смесь центрифугируют при низких температурах. На выходе центрифугат (Б1), содержащий иммуноглобулины (до 86 % IgG), должен иметь температуру не выше минус 5 °С.

3. К центрифугату (Б1) охлажденному до температуры минус 3–4 °С прибавляют концентрированный раствор натрия хлорида до ионной силы 0,05–0,07 и начинают осаждение медленным прибавлением, охлажденного до минус 20 °С этилового спирта до конечной концентрации 25 %. Осаждение проводят в течение 3–4 часов. Конечная температура смеси 5–6 °С. Обязательным условием является поддержание величины рН на уровне 7,0–7,3. Смесь центрифугируют. Температура центрифугата на выходе не выше минус 5 °С. При необходимости переосаждение повторяли при тех же условиях.

4. Осадок иммуноглобулина растворяют в водном растворе с ионной силой 0,01; рН 6,5–7,5 в соотношении 1 : 5 и содержанием белка 4,0–5,0 %. Нерастворившиеся белки отделяли осветляющей и стерилизующей фильтрацией.

5. Раствор иммуноглобулина подвергают диафильтрации на разделительных аппаратах для полного удаления этилового спирта, низкомолекулярных примесей и фрагментов. Устанавливают рН раствора  $4,2 \pm 4,3$ ; содержание белка  $5,5 \pm 0,5$  %, подвергают стерилизующей фильтрации.

6. При кислотном значении рН раствор термостатировали при  $37 \pm 0,2$  °С в течение 40–48 часов. Затем величину рН доводили до 6,5–7,5 и концентрировали белок до  $10 \pm 0,5$  % ультрафильтрацией.

7. В раствор иммуноглобулина прибавляли глицин до конечной концентрации 0,3 М и препарат подвергали стерилизующей фильтрации.

Контроль полученного препарата продемонстрировал его соответствие требованиям спецификации на иммуноглобулин человека нормальный для внутримышечного введения. В то же время хотелось бы отметить, что содержание полимеров (2,5 %) превышало их количество в препарате, полученном по обычной технологии (0,5 %).

Также, предложена *схема получения иммуноглобулина класса G из осадков Б риванол-спиртовым методом*:

1. Осадок Б суспендируется в 0,1 % растворе хлорида натрия, значение рН доводится до 5,0–5,1, (1 М ацетатным буфером) перемешивается в течение 5 часов при температуре около 0 °С. Суспензия центрифугируется. Температура центрифугата на выходе не выше минус 5 °С. Осадок удаляется.

2. Центрифугат, содержащий иммуноглобулины подщелачивают до величины рН 6,9–7,3 при помощи 1 М бикарбоната натрия. К полученному раствору при постоянном перемешивании и температуре 10 °С прибавляют 2 % раствор риванола с рН 6,9–7,3. Балластные белки выпадают в осадок и их отделяют фильтрацией.

3. К раствору, содержащему иммуноглобулины, для удаления риванола добавляют натрий хлористый до конечной концентрации 0,87 % при температуре 8–10 °С. Риванол, выпавший в осадок, удаляют центрифугированием. Центрифугат охлаждают до температуры около 0 °С.

4. К центрифугату медленно прибавляют, охлажденный до минус 20 °С этиловый спирт до конечной концентрации 25 %. Осаждение проводят в течение 1–2 часа. Конечная температура смеси 5–6 °С. Обязательным условием является поддержание величины рН на уровне 7,1–7,3. Смесь центрифугируют (температура центрифугата на выходе не выше минус 6 °С). Осадок содержит иммуноглобулины.

Дополнительное извлечение иммуноглобулинов из осадка Б позволило увеличить выход препарата на 25–30 %. По качественному составу препарат не отличался от препарата, полученного спиртовым методом.

Один из возможных путей повышения эффективности препаратов иммуноглобулинов заключается в расширении спектра содержащихся в них антител. Между тем некоторые виды антител содержатся во фракции классов IgM и IgA. Противовирусные антитела содержатся, главным образом, во фракции класса IgG, а антитела против ряда возбудителей бактериальной природы (эшерихии, сальмонеллы, шигеллы и другие энтеробактерии) содержатся во фракции класса IgM. Как видно из табл. 15, IgM находятся в осадке Б.

Были предложены методы для получения иммуноглобулинов, обогащенных классами М и А. Для этого использовали каприлатно-спиртовый метод или фракционирование риванолом и осаждение аммонием сульфатом. Полученные препараты содержали 80 % IgG и 20 % IgM или 80 % IgG и 20 % IgA.

Предложен *метод осаждения путем каприлатно-спиртовой обработки*:

1. Осадок Б суспендируют в 0,05 М ацетатном буфере (рН – 4,8) при соотношении 1 : 10. Балластные белки и липопротеиды осаждали из получен-

ного экстракта каприловой кислотой. К 1 литру суспензии осадка Б при комнатной температуре и постоянном перемешивании прибавляют 25 грамм каприловой кислоты.

2. Полученную смесь выдерживают при 4 °С в течение 18 часов для формирования осадка. Осадок отделяют центрифугированием и удаляют.

3. Надосадочную жидкость, содержащую иммуноглобулины охлаждают до температуры 0–1 °С и прибавляют охлажденный до минус 15 °С 96 % этиловый спирт до конечной концентрации 30 % (рН – 5,0). Смесь центрифугируют на холоде. Надосадочную жидкость удаляют.

4. Осадок растворяют в 0,9 % растворе натрия хлорида и подвергают осветляющей и стерилизующей фильтрации. Полученный комплекс иммуноглобулинов содержал: 54–72 % IgG, 15–24 % IgM и 12–18 % IgA.

Предложен также *метод получения комплекса иммуноглобулинов из осадка Б с использованием хлороформа для удаления липопротеидов:*

1. К осадку Б при комнатной температуре и постоянном перемешивании прибавляют воду для инъекций в соотношении 1 : 12, после чего в раствор вносят натрий хлористый до конечной концентрации 0,9 %, рН 7,0–7,5.

2. К экстракту осадка Б при постоянном перемешивании добавляют 1 N раствор HCl до величины рН – 4,6. Затем прибавляют хлороформ до конечной концентрации 3 %. Смесь перемешивают в течение одного часа и выдерживают при температуре 0–3 °С в течение 12–14 часов. Выпавший осадок отделяют центрифугированием.

3. Надосадочную жидкость подвергают осветляющей фильтрации. К фильтрату прибавляют 50 % раствор ПЭГ до конечной концентрации 12 % (или проводят осаждение этиловым спиртом до 26 %). Осадок отделяют центрифугированием.

4. Осадок растворяют в 0,3 M глицине, рН – 4,6. Проводят осветляющую и стерилизующую фильтрацию. Выдерживают 20–25 дней при комнатной температуре.

5. Проводят контроль выделенного препарата иммуноглобулинов. Препарат был полностью очищен от липопротеинов и агрегатов. Состав комплекса: IgG – 50–70 %, IgM – 15–25 %, IgA – 15–25 %. Препарат лиофилизирован. Растворимость не более 5 минут. Фракционный состав – не более 5 дуг преципитации. Препарат предлагается для перорального применения.

Содержит высокие титры антител к шигеллам и сальмонеллам. Аналогичные результаты были получены при использовании для осаждения каприловой кислоты.

Интерес представляет *метод получения иммуноглобулинов из крови человека с использованием в качестве осадителя ПЭГ с молекулярной массой 4000–6000, с последующим использованием ионов цинка.* Данную технологию можно представить следующим образом:

1. К плазме крови человека при величине рН – 7,0 прибавляют ПЭГ до конечной концентрации 15 %. Смесь выдерживают в течение 40 минут для формирования осадка. Осадок отделяют центрифугированием. Надосадочную жидкость удаляют.

2. Осадок ресуспендируют в 20 mM буфере ацетата натрия (рН – 4,7) в соотношении 1 : 10. К этому ресуспендированному осадку прибавлен ПЭГ до конечной концентрации 6,0 %. Смесь выдерживают в течение 40 минут для формирования осадка. Осадок отделяют центрифугированием. Надосадочную жидкость сохраняют. Осадок удаляют.

3. рН надосадочной жидкости при помощи 0,25 M NaOH доводят до величины 8,0.

4. Затем к надосадочной жидкости добавлен ПЭГ в буферном растворе с величиной рН 8,0 (10 mM Трис) до конечной концентрации 12,0 %. Смесь выдерживают в течение 40 минут для формирования осадка. Осадок отделяют центрифугированием. Надосадочную жидкость удаляют. Осадок сохраняют.

5. Осадок ресуспендируют в 15 объемах буферного раствора 20 mM ацетата натрия с величиной рН 4,0 и рН доведен 0,25 M NaOH до величины 8,5.

6. К полученному раствору при 0 °С добавлен 50 mM раствор ацетата цинка до конечной концентрации 2 mM. Смесь выдерживают в течение 40 минут для формирования осадка. Осадок отделяют центрифугированием. Надосадочную жидкость удаляют.

7. Осадок иммуноглобулинов растворяют в 20 mM буферном растворе ацетата натрия (рН – 4,0) в соотношении 1 : 10. Раствор иммуноглобулина подвергают анализу. При необходимости можно провести ультрафильтрацию для освобождения от ионов цинка.

Процесс осаждения ПЭГ можно проводить как при температуре 2–8 °С, так и при комнатной температуре. Степень чистоты выделенного иммуноглобулина не отличается от чистоты препарата, выделенного по методу Кона. Остаточный уровень ионов цинка находится на физиологическом уровне. Выход иммуноглобулинов составляет 75–90 % от их содержания в плазме крови человека, в то время как по методу Кона удается выделить 50–60 % иммуноглобулинов. Использование ПЭГ и ионов цинка полностью сохраняет структуру белковой молекулы иммуноглобулинов.

Для получения нормального иммуноглобулина были попытки выделения и очистки препарата с использованием *риванол-спиртового метода выделения*. Несмотря на преимущества данного метода (уменьшение объемов реакционных смесей, сокращение расхода этилового спирта, уменьшение трудозатрат практически в 2 раза и снижение количества стадий выделения) этот метод не нашел практического использования при выделении иммуноглобулинов из крови человека.

Продолжается поиск и разработка методов позволяющих предотвратить деградацию молекул иммуноглобулинов в процессе производства. Известно, что причинами дестабилизации белковых молекул иммуноглобулина являются конформационные изменения и частичная денатурация белка. Последнее может быть связано не только с условиями фракционирования (добавление спирта, риванола и других осадителей), но и с термическими воздействиями при лиофилизации препарата. В связи с этим, отдельным вопросом получения иммуноглобулинов является стадия лиофилизации, так как ряд продуктов представлен в виде лиофилизатов. Режим сублимационного высушивания препарата иммуноглобулина оказывает существенное влияние на количество образующихся агрегатов. Высокое содержание фрагментов коррелирует с содержанием агрегатов после сушки. *Методом молекулярного светорассеивания* была изучена *денатурационная устойчивость иммуноглобулинов*. Для этого 1,5 % раствор иммуноглобулина термостатировали при 60 °С в течение 30 минут. В различных концентрациях изучали аминокислоты: глицин, аланин, валин, фенилаланин; сахара и многоатомные спирты. Установлено, что стабилизирующим действием обладают глицин, аланин, валин, в то время как фенилаланин не проявляет стабилизирующего действия. Их защитный эффект возрастает с увеличением концентрации в растворе и увеличением молекулярной массы. Из сахаров наилучшие результаты

получены при использовании маннита и сорбита в количестве 2–3 %. Для стабилизации препаратов в процессе лиофилизации наиболее часто используют глицин или глюкозу, а для стабилизации иммуноглобулина – маннит. Препараты иммуноглобулинов, изготовленные методом фракционирования этиловым спиртом на холоде с последующей сушкой (вариант А) более стабильны, чем препараты иммуноглобулинов, приготовленные по варианту Б, содержащему спирт. Однако использование для удаления спирта диафильтрации приводит к тому, что препараты, полученные таким способом более стабильны по сравнению с лиофильно высушенными продуктами.

Все приведенные методы позволяют получить преимущественно иммуноглобулин класса G. Последнее связано с тем, что в процессе фракционирования иммуноглобулины классов М и А практически полностью теряются. В случае необходимости выделения этих классов иммуноглобулинов или препаратов содержащих терапевтические дозы классов А и М необходимо применять специальные методы выделения.

Требования к качеству препаратов иммуноглобулинов для внутримышечного и внутривенного введения изложены в требованиях ВОЗ и соответствующих статьях ряда фармакопей. Для лучшего понимания принципов контроля препаратов крови мы остановимся только на основных методах контроля, присущих большинству известных препаратов крови с указанием на источник – Европейская фармакопея (Е. Ф.), Государственная фармакопея Украины (ГФУ).

#### **Основные методы контроля:**

1. *Подлинность* – определение проводят методом иммуноэлектрофореза. На электрофореграмме, полученной при взаимодействии исследуемого препарата и антисыворотки, против белков нормальной крови человека должны обнаруживаться линии преципитации, идентичные линиям преципитации, полученным со стандартным раствором иммуноглобулина. Должно отсутствовать взаимодействие с антисыворотками к крови животных (Е. Ф. 0338, 0918).

2. *Фракционный состав* также определяют методом иммуноэлектрофореза против антисыворотки крови человека. На иммунофореграмме должны выявляться дуги преципитации, соответствующие IgG, IgA, IgM в зависимости от состава препарата. (Е. Ф. 0338, 0918).

3. *Электрофоретический состав белков* – определение проводят методом зонального электрофореза, используя пластины с гелем ацетата целлюлозы в буфере из барбитуратов с pH 8,6 (Е. Ф. 2.2.31.).

4. *Общий белок* – определение проводят с биуретовым реактивом при сравнении со стандартным раствором иммуноглобулина (Е. Ф. 2.5.9.).

5. *Молекулярные параметры* – определение проводят методом жидкостной хроматографии (УФ детектор при 280 нм). Хроматографию проводят, используя калибровочный стандарт с известным фракционным составом. Проводят определение мономеров, димеров, агрегатов и фрагментов (Е. Ф. 2.2.29.).

6. *Стерильность* – определение проводят методом мембранной фильтрации. Стерильность контролируют на двух видах сред: тиогликолевой (при температуре 30–35 °С) и соево-казеиновой (при температуре 20–25 °С) в течение 14 суток (Е. Ф. 2.6.1.).

7. *Аномальная токсичность* – определение проводят на животных (мыши и морские свинки), вводя указанную в спецификации тест дозу.

8. *Пирогенность* – определение проводят на животных (кроликах), вводя указанную в спецификации тест дозу. Повышение температуры не более по Е. Ф. 2.6.12.

9. *Бактериальные эндотоксины* – определение проводят LAL-тестом.

10. *Стабильность*. Препарат не должен образовывать гель при инкубации при температуре 56–58 °С в течение 4 часов.

11. *Термостабильность*. Определение проводят для изучения стабильности специфической активности иммуноглобулинов. Препарат в течение 28 суток выдерживают при температуре 37 °С. Потеря специфической активности не более 20 % от первоначальной.

12. *pH*. Определение проводят потенциометрически (Е. Ф. 2.2.3.).

13. *Специфическая активность*. Определение проводят согласно спецификациям. Антитела к поверхностному антигену гепатита В (Е. Ф. 0722, 1016); антитела к вирусу гепатита А (Е. Ф. 0769); антитела к вирусу бешенства (Е. Ф. 0723); антитела к вирусу краснухи (Е. Ф. 0617); антитела к вирусу кори (Е. Ф. 0397); антитела к вирусу оспы (Е. Ф. 0724); антитела к бактериям столбняка (Е. Ф. 0398); анти-D-антитела к антистафилолизину (Е. Ф. 0557, 1527) и др.

14. *Объем, который изымается*. Метод описан в спецификации на препарат.

15. *Прекалликреиновый активатор*. Определение проводят по Е. Ф. 2.6.17.

16. *Антикомплементарная активность*. Определение проводят по Е. Ф. 2.6.17.

17. *Анти-А анти-В гемагглютинины*. Определение проводят по Е. Ф. 2.6.20.

18. *Растворимость (для лиофилизированных препаратов)*. Метод описан в спецификации на препарат.

19. *Вода (для лиофилизированных препаратов)*. Определение проводят по методу указанному в спецификации (Е. Ф. 2.5.12.; 2.2.32.; 2.2.40.).

20. *Осмоляльность*. Определение проводят по Е. Ф. 2.2.35.

21. *Функциональная активность Fc-фрагментов иммуноглобулинов*. Определение проводят по Е. Ф. 2.7.9.

Предусматривается контроль *осмолярности иммуноглобулинов для внутривенного применения*. Этот параметр может определять возможность наличия побочного действия и всегда должен учитываться при введении больших доз препарата у детей с полиорганной недостаточностью и нарушением гомеостаза. Так, например, гиперосмолярные по отношению к плазме крови препараты с большей вероятностью могут вызывать нарушение функции почек, что следует учитывать при назначении того или иного препарата.

Особый интерес представляют *иммуноглобулины направленного действия*, содержащие специфические антитела к ряду возбудителей инфекционных заболеваний. Сегодня выпускаются препараты, содержащие высокие титры антител к вирусам (краснухи, кори, гепатиту В, бешенства и др.) и бактериям (стафилококку, столбняку и др.) Довольно часто специфические иммуноглобулины вводятся одновременно с соответствующей вакциной для создания пассивного иммунитета. Так, например, в случае укуса человека животными (поскольку вакцина обеспечивает выработку антител только через 10–14 дней после введения), для создания пассивного иммунитета человеку вводят антирабический иммуноглобулин из расчета 20–40 МЕ на 1 кг массы тела. Иммуноглобулин антирабический из крови человека производит ряд стран: Австрия, Китай, Франция. Для лечения клещевого энцефалита используется иммуноглобулин для внутримышечного введения, полученный из

крови доноров, вакцинированных против клещевого энцефалита. В настоящее время в России на 10-ти предприятиях выпускается иммуноглобулин против клещевого энцефалита. Хорошо зарекомендовал себя препарат ФСМЕ-Булин (Австрия), содержащий антитела против вируса клещевого энцефалита. Защитное действие проявляется уже через 24 часа после инъекции и сохраняется около 4-х недель. Специфические иммуноглобулины для внутримышечного введения используются для профилактики и лечения дифтерийной, столбнячной, коклюшной, стафилококковой и других инфекций. Содержание белка в этих препаратах составляет 100 мг/мл, глицина от 22,5 до 30 мг/мл.

Получение специфических иммуноглобулинов для внутримышечного введения проводится по той же схеме, как и иммуноглобулин человека нормальный. Отличие только в используемом сырье: либо используют кровь доноров, иммунизированных соответствующим антигеном, либо кровь нормальных доноров путем контроля сывороток – используют сыворотки с максимальным содержанием специфических антител. Контроль этих препаратов проводится с дополнительной характеристикой – определением содержания специфических антител.

### **2.1.2. Иммуноглобулины для внутривенного введения**

Иммуноглобулины для внутривенного применения используются для лечения инфекционно-воспалительных осложнений, которые возникают на фоне вторичного иммунодефицита у больных острой и хронической лейкемией, обусловленных патологическими процессами и влиянием цитостатических препаратов. Известно, что лечение онкогематологических больных всегда связано с высоким риском бактериальных осложнений, что в значительной степени усложняет лечение и ухудшает прогноз основного заболевания. Это прежде всего связано с подавлением как специфического так и неспецифического механизма резистентности организма больного к опухолевому заболеванию, а также химиотерапией, которая используется при лечении данного контингента пациентов и еще больше подавляет иммунные реакции организма. При хронических лейкемиях, особенно в третьей стадии хронической лимфоидной лейкемии, обнаруживается гипогаммаглобулинемия за счет значительного снижения содержания IgG в сыворотке крови, что в свою очередь

приводит к возникновению бактериальных осложнений (пневмония, бронхит, отит и др.). Наибольшую угрозу представляет грамотрицательный сепсис, который в 25 % случаев заканчивается септическим шоком. В связи с этим незаменимыми лекарственными средствами в этих случаях являются иммуноглобулины для внутривенного введения. Основной причиной летальных исходов при остром панкреатите являются гнойно-септические осложнения, в патогенезе которых ведущую роль играет формирование вторичного иммунодефицита. У 30 % больных в 1–3 сутки заболевания обнаруживается дефицит IgG и IgM. Применение иммуноглобулина для внутривенного введения нормализует содержание иммуноглобулинов к 7 дню. Значительно снижается число гнойно-септических осложнений. Практически во всех случаях применения иммуноглобулина применяются достаточно высокие дозы вводимого препарата: при синдромах первичного иммунодефицита – 200–800 мг/кг; при синдромах вторичного иммунодефицита – 200–400 мг/кг; при бактериальных инфекциях (включая сепсис) и вирусных инфекциях – 400–1000 мг/кг.

*Побочные действия иммуноглобулинов для внутривенного введения* изучены еще в недостаточной степени. Побочные действия более вероятны при первой инфузии и возникают чаще всего после начала введения или в течение первого часа: со стороны ЦНС – головная боль, тошнота, реже головокружение; со стороны пищеварительного тракта в редких случаях – рвота, боль в животе, диарея; со стороны сердечнососудистой системы – редко артериальная гипотензия, тахикардия, ощущение сдавливания или боль в груди, цианоз, одышка. Аллергические реакции: очень редко отмечались тяжелая артериальная гипотензия, коллапс и потеря сознания. Возможна гипертермия, озноб, повышенные потоотделение и утомляемость, недомогание; редко – боль в спине, миалгия, онемение, приливы и ощущение холода. Кроме того, иммуноглобулины представляют опасность переноса вирусных гепатитов и ВИЧ-инфекции. При крайне низких показателях лейкопении у больных с сепсисом в стадии септикобактериемии внутривенное введение иммуноглобулинов угнетает клиренс иммунных комплексов и бактерий, тем самым повышая чувствительность организма к инфекции, в результате чего даже авирулентные штаммы микроорганизмов могут вызвать летальный исход инфекционного процесса.

Ограничением применения иммуноглобулинов для внутримышечного введения является: невозможность введения больших объемов препарата,

медленная резорбция антител из мышечной ткани и значительный местный протеолиз иммуноглобулинов. Этим недостатком лишены иммуноглобулины для внутривенного введения. Введение иммуноглобулинов для внутривенного применения позволяет вводить большие дозы препарата (500–1000 мг на кг массы больного) и достаточно быстро создать в крови больного концентрацию антител в защитной концентрации. В тоже время появление побочных действий при введении иммуноглобулинов в значительной степени связаны с используемым способом изготовления препарата. Так, например, основным недостатком препаратов, полученных с применением гидролитических ферментов, является наличие в препаратах фрагментов. Фрагментированные молекулы в течение суток выводятся из организма, в то время как период полураспада мономерных молекул составляет 21–30 дней, то есть действие препарата, защита организма от микробов и вирусов становится более продолжительной. Присутствующие в препаратах полимеры могут приводить к тяжелым анафилактическим реакциям. Наличие димеров может способствовать появлению побочных эффектов, включая лихорадку, тошноту, понижение кровяного давления. В связи с этим перед производителем стоит задача – максимально уменьшить содержание димеров в препарате, исключить присутствие в иммуноглобулинах фрагментов и полимеров. Учитывая, что подкласс иммуноглобулина IgG3 обладает более высокой способностью образовывать димеры необходимо в процессе производства препарата максимально снизить его содержание в препарате. В соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения *иммуноглобулины для внутривенного введения должны подвергаться дополнительному тестированию, по сравнению с препаратами для внутримышечного введения*, по тестам: на гипотензивную активность; на антикомплементарную активность; на количественное содержание гемоглобину. Выпускаемые препараты иммуноглобулинов для внутривенного применения должны быть максимально очищены от полимеров и агрегатов (содержание мономеров и димеров не менее 90 % от общего содержания белка); антикомплементарная активность – связывание комплемента не более чем 50 % (не более 1 гемолитической единицы СН на 1 мг иммуноглобулина); содержание активатора прекалликреина, обладающего гипотензивным действием – не более 35 МЕ/мл; анти-А и анти-В гемоглобину в титрах не более 1 : 64 в реакции Кумбса.

Учитывая, что основные требования к препаратам плазмы крови – качество и безопасность, необходимо отметить, что в рекомендациях ВОЗ обязательным является контроль препаратов по тестам: стерильность, пирогенность, безопасность, специфическая активность. Безопасность контролируют на двух видах животных – мышцах при внутривенном введении 0,5 мл препарата и морских свинках при введении внутривенно 5 мл препарата. Контроль пирогенности рекомендован в дозе 0,5 грамма иммуноглобулина на 1 кг массы кролика. Для 5 % раствора препарата эта доза составляет 10 мл. Специфическая активность иммуноглобулина человека нормального для внутривенного введения контролируется по содержанию двух видов антител – против вируса и против бактерий. Выбор микроорганизмов определяется непосредственно производителем по его усмотрению. Наиболее часто определяют антитела против полиомиелита, кори, дифтерийного токсина, столбнячного токсина, стафилококкового токсина, вируса гепатита В и др. В препаратах, выпускаемых сегодня в Украине, например, регламентируется концентрация антител против вируса кори и стафилококкового токсина. Необходимо отметить, что все используемые методы контроля иммуноглобулинов должны быть одобрены национальным органом контроля иммунобиологических препаратов.

Сегодня в Украине еще недостаточно развита нормативная база по производству и контролю препаратов, полученных из плазмы крови. Приказы МОЗ Украины от июля 2005 года за № 247 и № 375 «Про затвердження документів з питань контролю якості препаратів крові» не отражают полностью рекомендации ВОЗ и требования Европейской фармакопеи к иммуноглобулинам для внутримышечного введения и не определяют требования к иммуноглобулинам для внутривенного введения. Это особенно важно, так как выпускаемые сегодня в Украине иммуноглобулины для внутривенного введения по ряду показателей определяющих безопасность препарата не отвечают международным требованиям. Так, Европейскими требованиями предусмотрен контроль препаратов по тесту осмольность (норма – минимум 240 ммоль/кг); прекалликреиновый активатор (норма – не более 35 МЕ/мл); анти-А и анти-В гемоглобину (норма – не более 1 : 64).

Необходимость контроля над содержанием в иммуноглобулинах для внутривенного применения прекалликреинового активатора определено ролью данного соединения в активации системы кининов. Активатор приво-

дит в рабочее состояние калликреины (протеиназы типа трипсина), а эти ферменты в свою очередь отщепляют кинины из кининогенов. Кинины характеризуются широким спектром биологической эффективности, главным проявлением которого является гипотензивное действие.

Иммуноглобулины выделяют из донорской плазмы. Каждая серия препарата изготавливается из смеси исходного материала не менее чем от 1000 человек, что нивелирует различие в содержании антител в препарате и обеспечивает достаточную стандартность в отношении иммунологической активности. Это требование для национального производителя полностью совпадает с требованиями Европейской фармакопеи для иммуноглобулина человека нормального для внутримышечного и внутривенного введения. Фракции иммуноглобулинов плазмы крови доноров выделяют, очищают и концентрируют методом фракционирования спиртово-водными осадителями при температуре ниже 0 °С. Все доноры тщательно проверяются лабораторными тестами для снижения риска передачи патогенов от инфицированных доноров, которые тестируются на отсутствие антител к вирусу иммунодефицита (ВИЧ 1/2), антител к вирусу гепатита С и антигена вируса гепатита В (HBsAg).

*Технология получения иммуноглобулинов для внутривенного введения с использованием гидролиза пепсином* можно представить следующим образом:

1. К сыворотке крови человека, охлажденной до температуры 0–2 °С при постоянном перемешивании добавляют, охлажденный до минус 10 °С этиловый спирт до конечной концентрации 8,0 %. В конце осаждения температура смеси должна находиться в пределах от 0 °С до минус 2 °С. На этой стадии происходит осаждение остатков фибриногена, денатурированного белка, тканевых частиц и других нерастворимых примесей. Выпавший балластный осадок удаляют центрифугированием при низких температурах. Важным условием получения стабильных иммуноглобулинов, как на этой стадии, так и на всех последующих, является строгое соблюдение температурных режимов и минимального вспенивания смеси при перемешивании и центрифугировании.

2. Центрифугат охлаждают до температуры минус 3–4 °С и осаждают медленным прибавлением, охлажденного до минус 20 °С этилового спирта до конечной концентрации 25 %. Осаждение проводят в течение 3–4 часов. Конечная температура смеси минус 5–6 °С. Обязательным условием является

поддержание величины рН на уровне 7,1–7,3. Смесь центрифугируют (температура центрифугата на выходе не выше минус 6 °С). Центрифугат используют для выделения альбумина. Осадок (фракция II + III по Кону), содержащий фракцию иммуноглобулинов подвергают дальнейшей очистке.

3. Полученный осадок при 0 °С растворяют в 0,9 % изотоническом растворе хлорида натрия до получения гомогенной суспензии и процесс переосаждения повторяют при тех же условиях (п. 2). Получен осадок А1.

4. Осадок А1 растворяют при температуре от 0 °С до минус 1 °С в концентрированном растворе хлорида натрия при ионной силе 0,01, доводят величину рН до 5,0–5,1 и осаждают, охлажденным до минус 20 °С этиловым спиртом. Конечная концентрация спирта 17 % и температура минус 5–6 °С. Осаждение проводят в течение 3–5 часов, постепенно увеличивая скорость добавления спирта. Для формирования осадка смесь оставляют при указанной температуре на 10–16 часов. На этой стадии при рН 5,1–5,2 (изоэлектрическая точка альфа- и бета-глобулинов) в осадок выпадают балластные компоненты, потери гамма-глобулиновой фракции незначительны. Смесь центрифугируют при низких температурах. На выходе центрифугат Б, содержащий иммуноглобулины, должен иметь температуру не выше минус 5 °С.

5. К центрифугату Б охлажденному до температуры минус 3–4 °С прибавляют концентрированный раствор натрия хлорида до ионной силы 0,05–0,07 и начинают осаждение медленным прибавлением, охлажденного до минус 20 °С этилового спирта до конечной концентрации 25 %. Осаждение проводят в течение 3–4 часов. Конечная температура смеси минус 5–6 °С. Обязательным условием является поддержание величины рН на уровне 7,1–7,3. Смесь центрифугируют (температура центрифугата на выходе не выше минус 6 °С). Осадок содержит иммуноглобулины.

6. Осадок подвергают прессованию для удаления остаточного количества спирта, затем растворяют в 0,9 % растворе натрия хлорида и проводят стерилизующую фильтрацию. Стерильный раствор иммуноглобулина выдерживают при комнатной температуре в течение 30–45 суток и при температуре 2–8 °С – 30–45 суток и проводят стерилизующую фильтрацию для отделения выпавших в осадок балластных белков.

7. К полученному раствору прибавляют глюкозу (2 %) и глицин (1 %), охлаждают до 3–5 °С и при помощи 0,1 М раствора хлористоводородной

кислоты доводят величину рН до 3,9–4,0. К раствору добавляют пепсин из расчета 50 мг на 100 грамм белка. Раствор подвергают стерилизующей фильтрации, помещают в термостат при  $37 \pm 0,5$  °С для проведения гидролиза на 16–18 часов. На этом этапе снижаются антикомплементарные свойства иммуноглобулинов.

8. Раствор иммуноглобулина после проведения гидролиза охлаждают до температуры 20–25 °С, доводят величину рН до 4,0–4,5 и прибавляют гель гидроокиси алюминия для удаления пепсина. Смесь перемешивают в течение одного часа. Комплекс пепсина с гидроокисью алюминия удаляют фильтрацией.

9. Раствор иммуноглобулина стабилизируют добавлением 120–150 г глюкозы на литр и прибавляют ПЭГ 4000 в количестве 60–80 грамм на литр при величине рН 6,0–6,2. Смесь выдерживают в течение 1–2 часов. Осадок выпавших полимеров отделяют центрифугированием. К супернатанту прибавляют ПЭГ 4000 до конечной концентрации 130 грамм на литр при величине рН 6,8–7,2. Смесь выдерживают при 4–8 °С в течение 20–24 часов. В осадок выпадают иммуноглобулины, которые отделяют центрифугированием. В супернатанте остаются фрагменты иммуноглобулинов.

10. Осадок иммуноглобулинов растворяют в 0,9 % изотоническом растворе натрия хлорида, подвергают ультрафильтрации, прибавляют глюкозу и глицин до конечных концентраций 12 грамм и 5 грамм на литр, соответственно. Раствор иммуноглобулина подвергают стерилизующей фильтрации.

11. Контроль препарата иммуноглобулина в форме in bulk и разлив в первичную упаковку (флаконы).

12. Контроль готового препарата.

13. Маркировка и упаковка препарата иммуноглобулина для внутривенного введения.

Приведенная схема является одной из первых технологических схем получения иммуноглобулина для внутривенного введения. За последние годы появилось множество дополнительных методик для выделения и очистки иммуноглобулинов, а также способов инактивации вирусов.

Так, для отделения агрегатов использовали растворимость агрегатов в растворах с низкой ионной силой. Для этого осадок иммуноглобулинов, выделенный спиртовым методом, растворяли в воде очищенной. Соотношение осадка и воды составляло 1 : 5. Раствор подвергали осветляющей и стерили-

зующей фильтрации. Агрегаты осаждались при выдерживании раствора препарата в течение 24–48 часов при 8–10 °С. Затем раствор подвергают стерилизующей фильтрации. Введение описанной стадии очистки в растворах с низкой ионной силой позволило снизить содержание агрегатов в 2,7 раза. Так же было показано, что на этапе спиртового фракционирования в процессе отделения IgG от бета-глобулинов при рН не ниже, чем 5,4 происходит удаление IgA из препарата. Содержание IgA снижается с 2,3 мг/мл до 0,41 мг/мл, т.е. в 5,6 раза. При изменении рН готового препарата до 4,1–5,2 происходит диссоциация не только димеров (их количество снижалось в 4 раза), но и основной части агрегатов с  $(0,6 \pm 0,1)$  % до  $(0,18 \pm 0,06)$  %. Одновременно было установлено, что хранение препаратов в течение 3-х лет практически не изменяло первоначальный состав на протяжении всего срока годности.

Хорошо известен препарат Хумаглобин (Human, Венгрия) – иммуноглобулин для внутривенного применения. Препарат содержит общий белок 50 мг/мл, глицина – 15 мг/мл, глюкозы – 15 мг/мл, IgG не менее 99,0 %, IgA не более 50 мкг/мл. Технология данного препарата сводится к следующему:

- ✓ спиртовое фракционирование плазмы на холоду;
- ✓ удаление остаточного этилового спирта путем ультрафильтрации ;
- ✓ проведение вирусной инактивации при 60 °С в течение не менее 10 часов в кислой зоне рН;
- ✓ осаждение иммуноглобулинов полиэтиленгликолем с молекулярной массой 6000. Осадок отделяют центрифугированием. Агрегаты в надосадочной жидкости;
- ✓ осадок иммуноглобулинов растворяют в воде для инъекций, подвергают ультрафильтрации, прибавляют глюкозу и глицин до конечных концентраций 15 и 15 г/л. Раствор иммуноглобулина подвергают стерилизующей фильтрации;
- ✓ проводят контроль препарата in bulk, разлив, маркировку и упаковку.

Сегодня в Украине производителями препаратов крови являются областные станции переливания крови и два предприятия: ЗАО «Биолек» (иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного и внутримышечного введения) и ЗАО «Биофарма» (иммуноглобулины человека для внутримышечного введения: нормальный, противогриппозный, против вируса Эпштейна – Барра, антирезусный, против герпеса простого 1 и 2 типов, про-



тив токсоплазмы, антицитомегаловирусный, антихламидийный, антистафилококковый и иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения – Веноиммун). В то же время в Украине зарегистрированы препараты иммуноглобулинов из плазмы человека зарубежного производства: Rho(D) – иммуноглобулин человека РоГАМ высокоочищенный (Ortho-Clinical Diagnostic Systems Inc., USA). В препарате проводится контроль наличия парвовируса В19 и вируса гепатита С – методом ПЦР; Флебогамма – им-муноглобулин человека нормальный для внутривенного введения (Istituto Grifols); Сандоглобулин – иммуноглобулин человека поливалентный для внутривенного использования (ZIB Bioplasma).

*Крайне важной проблемой, определяющей возможность применения иммуноглобулинов для внутривенного введения, является присутствие в препарате антител против системы групповых факторов крови.* Антиэритроцитарные антитела обнаруживаются у 0,17 % доноров. В соответствии с требованиями Европейской фармакопеи (6 изд., 01/2005:0918) титры анти-А и анти-В геагглютининов в реакции непрямой агглютинации не должны превышать титр 1 : 64. При проведении анализа сертификатов производителей, выпускающих препарат в Украине, не обнаружены результаты данного контроля ни у одного из производителей, что естественно ставит под сомнение безопасность использования таких препаратов в клинике. Применение препарата становится еще более сомнительным учитывая высокие дозы, необходимые для введения. Чем ниже содержание анти-А и анти-В геагглютининов, тем выше очистка препарата. Применение иммуноглобулинов с высоким содержанием указанных антител может приводить к случаям гемолиза эритроцитов человека. Фракционирование плазмы спиртовым методом Кона обеспечивало очистку иммуноглобулинов в 4–32 раза и позволяло получать препараты иммуноглобулинов с титрами геагглютининов 1 : 16–1 : 64. В то же время, в Российской Федерации, производители иммуноглобулина контролируют препарат на наличие вышеуказанных антител, причем их содержание достаточно низкое от 1 : 1 до 1 : 2, что свидетельствует о высокой степени очистки препаратов иммуноглобулинов для внутривенного введения. Так, например, при лечении инфекционных заболеваний у недоношенных детей с группой крови АВ, Rh+ внутривенным иммуноглобулином Venoglobulin (Merieux) в дозе 500 мг (каждые 7 дней) наблюдалось развитие тяжелой анемии, гипербилирубинемии, ретикулоцитоза, лихорадки. Так как

собственный титр анти-А1 антител у новорожденных был низок (1 : 4), то есть предположения, что такие реакции могут быть связаны с повышенным содержанием анти-А1 антител. Кроме того, применение иммуноглобулинов для внутривенного введения у больных с синдромом Кавасаки вызывало развитие анемии, гепатоспленомегалии, тромбоцитопении. Установлено, что титры антител в трех сериях используемых препаратов были достаточно высокими 1 : 16, 1 : 64, 1 : 64, т.е. находились на пределе разрешенного Европейской Фармакопеей содержания. Для удаления антител против антигенов групп крови А и В используются различные сорбенты. Эффективный сорбент предложен российским институтом биоорганической химии. Сорбент построен из матрицы (сефароза FA), гидрофильного покрытия (полимер акрилатного ряда) и аффинного лиганда (олигосахариды).

*Одним из основных вопросов производства препаратов крови, в частности, иммуноглобулинов является входной контроль плазмы крови, используемой для производства препаратов.* Согласно требованиям статей Европейской фармакопеи «Человеческая плазма для фракционирования» (01/2005:0853) и «Человеческая плазма» (01/2005:1646) плазма человека проходит контроль при помощи лабораторных тестов на антитела к вирусу иммунодефицита (ВИЧ 1/2), на антитела к вирусу гепатита С, на поверхностный антиген гепатита В (HBsAg). Пул плазмы дополнительно тестируется на РНК вируса гепатита С (введено с 1999 года после случаев инфицирования иммуноглобулином для внутривенного применения) и ДНК парвовируса В19 методом полимеразной цепной реакции.

Парвовирус В19 может служить причиной острого артрита, апластического кризиса, гемолитической анемии и вызывать болезни плода, ведущие к спонтанному аборт. ДНК парвовируса В19 обнаружена у 0,1–0,6 % доноров. Наряду с капельным распространением инфекции значимым считается и гемотрансмиссионный путь передачи. Одной из эффективных мер по исключению передачи вирусных инфекций при использовании препаратов крови является карантинизация плазмы доноров, с последующим обследованием доноров через определенный период. Только при отрицательных результатах первичного и вторичного обследования замороженная плазма может использоваться для фракционирования. Такой подход вполне оправдан так как срок возможного определения ряда инфекций с момента инфицирования составляет: антитела к ВИЧ – 22 дня, HBsAg – 56 дней, антитела к вирусу

гепатита С – 82 дня. В то же время ряд исследователей определяют длительность инкубационного периода для гепатита В от 40 до 200 суток. Учитывая требования к иммуноглобулинам по концентрированию специфических антител в препарате (в 6–10 раз) по сравнению с их исходным содержанием в плазме, актуальным является вопрос о их стабильности в процессе карантинирования. Нами не обнаружено данных о стабильности противовирусных и антибактериальных антител в процессе карантинирования плазмы. Единственной информацией являются данные о потере содержания антител к цитомегаловирусу на 40 % по сравнению с их исходным содержанием в плазме. По всей видимости, этот факт требует дополнительных исследований. В большинстве стран, в том числе и в Украине, уже введена обязательная карантинизация плазмы до 6 месяцев. Её необходимо проводить с целью исключения из фракционирования порций плазмы от доноров, в которых вирусная инфекция обнаруживается при последующих анализах крови. Кроме того, существует опасность присутствия в плазме крови вирусов гепатита, ВИЧ, вируса Эпштейна – Барра, вирусов лейкоза, герпеса и других. В связи с этим в процессе производства иммуноглобулинов необходимо использовать методы, позволяющие вместе с очисткой препаратов удалять или инактивировать вирусы. Для предотвращения попадания вирусов или продуктов их жизнедеятельности в иммуноглобулины необходимо использовать техно-логические методы, рекомендованные ВОЗ и подробно изложенные в техническом докладе 924.

Накопленный опыт ведущих мировых производителей препаратов крови для инактивации вирусов в иммуноглобулинах с внутривенным способом введения можно определить как *методы инактивации или методы удаления вирусов*:

- пастеризация при 60 °С в присутствии стабилизаторов (сахаров, аминокислот, цитратов) в течение не менее 10 часов при низком значении рН;
- обработка детергентами, например, Твин-80 или Тритон Х-100 при температуре от 4 до 24 °С в течение различного времени;
- обработка при низких значениях рН (около 4,0) в присутствии протеолитических ферментов, например, пепсина;
- обработка органическими растворителями, например, этанолом при различной величине рН и различных концентрациях;

- нанофильтрация на мембранах с величиной пор от 15 до 35 нм;
- обработка метиленовым синим при видимом свете или обработка ультрафиолетом в присутствии псоралена, обработка В-пропиолактоном, октановой кислотой или три-н-бутилфосфатом с последующей фильтрацией.

Бесспорно, все приведенные методы требуют валидационных исследований у конкретного производителя с постоянным постадийным контролем полученных продуктов, используя методы различных видов хроматографий, электрофореза, определения остаточных осадителей и детергентов, молекулярного распределения белковых фракций, концентрации иммуноглобулина и наличия специфических антител. Кроме того, отработка методов инактивации вирусов должна проводиться на модельных системах, включающих ряд вирусов: цитомегаловирус, вирус Эпштейна – Барра, вирус герпеса, полиовирус, вирус иммунодефицита человека, вирус везикулярного стоматита, вирус Сендай и др. Каждый исследователь в зависимости от поставленной задачи самостоятельно обосновывает применение той или иной вирусной модельной системы.

Важным является *вопрос об установлении сроков хранения препаратов крови*. При его определении необходимо учитывать, что в связи с особой природой молекул продукты деградации, выявляющиеся в процессе ускоренных испытаний стабильности, не могут рассматриваться как аналогичные тем, которые выявляются во время долговременных исследований при хранении препарата в обычных температурных условиях. Изучение стабильности иммунобиологических препаратов, в частности препаратов крови, требует иных подходов к изучению стабильности, чем фармацевтические препараты. По всей видимости, только Национальный орган контроля иммунобиологических препаратов в Украине должен определять требования к качеству данной группы препаратов с целью гармонизации их с требованиями, декларируемыми Европейской фармакопеей.

Необходимо учитывать, что побочные действия препарата в значительной степени могут быть связаны с балластными компонентами препарата, что в свою очередь, безусловно, связано с технологией получения иммуноглобулинов и степенью его очистки.

Препараты иммуноглобулинов для внутривенного введения можно разделить на три группы: I группа – препараты иммуноглобулинов нормальной крови человека, преимущественно IgG; II группа – препараты специфических иммуноглобулинов, содержащие высокие титры антител против ви-

русных инфекций, преимущественно IgG; III группа – препараты иммуноглобулинов, содержащие антитела различных классов: IgG, IgA, IgM.

Уменьшение антикомплементарной активности может обеспечиваться различными способами:

- обработка протеолитическими ферментами;
- выдерживанием при температуре 30–37 °С в течение 18–24 часов;
- модификацией иммуноглобулина ацелированием или сульфонируванием;
- обработкой сорбентами, например, гидроокисью алюминия, с последующей температурной обработкой.

Однако подобные виды обработки могут способствовать увеличению агрегации иммуноглобулинов. Кроме этого, обработка ферментами, например, пепсином приводит к повреждению (расщеплению) Fc-фрагмента молекулы иммуноглобулина, что в свою очередь способствует быстрому выведению препарата из организма. В связи с этим в настоящее время при получении иммуноглобулинов для внутривенного применения основное внимание уделяется сохранению нативной структуры белковой молекулы антитела. Предлагаются различные методы выделения и очистки иммуноглобулинов.

Очень важным является тот факт, что во всех четырех препаратах фирмы Biotest (Цитотек, Нео-Цитотек, Пентаглобин, Интраглобин) молекулы антител (Fc-участок) являются функционально неповрежденными. Последнее определяется отсутствием в технологии их выделения и очистки химических и ферментативных модификаций.

На примере двух продуктов фирмы Biotest можно проследить влияние технологии на качество готового препарата. Так, например, производственный процесс обоих препаратов (Цитотек и Нео-Цитотек) начинается с классической технологии Кона со стадии фракционирования плазмы этиловым спиртом при низких температурах до получения фракции II. В дальнейшем, Цитотек для инактивации вирусов обрабатывается бета-пропилактоном с последующей стерилизующей фильтрацией через фильтры с размером 35 нм. Затем препарат Цитотек очищают обработкой коллоидным безводным кремнеземом (аэросил 380) и активированным углем.

Инактивация (элиминирование) вирусов для препарата Нео-Цитотек достигается обработкой октановой кислотой и сольвентом (детергентом) при помощи три-(*n*-бутил)-фосфата (ТНБФ) и полисорбата 80. Продукт очищают катионнообменной хроматографией на SP-сфердексе М-геле при помощи ВЭЖХ. Период полувыведения для Нео-Цитотека и Цитотека составляет около 24 суток.

Пентаглобин за счет наличия фракции IgM обладает антиэндоксинной активностью, которой не обладают стандартные иммуноглобулины. Иммуноглобулин М несет также антитела к капсульным антигенам грамотрицательных бактерий. Пентаглобин используется для лечения тяжелых бактериальных инфекций (в сочетании с антибиотиками), особенно сепсиса. Кроме того, IgM-антитела лучше, чем другие классы иммуноглобулинов фиксируют комплемент и соответственно улучшают опсонизацию, т.е. подготовку бактерий к фагоцитозу.

Интраглобин единственный стандартный иммуноглобулин с 5 степенями вирусной инактивации. Период полувыведения составляет  $21,6 \pm 1,8$  дня.

Все указанные препараты имеют почти 100 % сохранение Fc-фрагментов, в то время как иммуноглобулины для внутривенного введения первых поколений имели сохранность Fc-фрагментов 70–75 %. В указанных препаратах сохранены соотношения между подклассами иммуноглобулинов G, что особенно важно для детей первого года жизни (синтез IgG2 у детей первого года снижен) и IgG3, который в значительной степени определяет нейтрализующие вирус свойства, что обеспечивает высокую эффективность не только при бактериальных, но и при вирусных инфекциях.

Часть молекулы IgG в препаратах иммуноглобулинов для внутривенного введения приобретает дополнительную полиреактивность после воздействия на них низкого pH, что проявляется в нежелательных изменениях энтропии в ходе взаимодействия с антигенами: увеличивается связывающая способность с антигенами клеток печени, тромбоцитов, щитовидной железы. Содержание IgA в препаратах интраглобин – 126–2000 мкг/мл, габриглобин – 100–400 мкг/мл, октагам и иммуновенин – около 300 мкг/мл. Среднее содержание подклассов IgG в плазме крови доноров в иммуноглобулинах для внутривенного введения характеризует качество препаратов, т.е. их соотношение не должно изменяться в зависимости от применяемой технологии: IgG1 – 60 %, IgG2 – 29 %, IgG3 – 7,0 %, IgG4 – 4,0 %.

Габриглобин является первым препаратом в России, имеющим неповрежденные молекулы иммуноглобулинов с периодом полувыведения около 30 суток. При производстве Габриглобин не подвергается химической и ферментативной обработке. Препарат представлен мономерной фракцией IgG, составляющую более 95 %. Содержание белка 50 мг/мл, лиофилизат, величина pH около 4,2. Препарат содержит широкий спектр опсонизирующих и нейтрализующих антител против бактерий и вирусов. Восполняет дефицит антител класса IgG, снижает риск развития инфекции у больных первичным

и вторичным иммунодефицитом. Разработка препарата принадлежит МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Препарат получают путем концентрации ультрафильтрацией фракции III, выделенной по спиртовому методу Кона. Концентрирование проводят при величине pH 3,5–5,0 уменьшая объем раствора до 1/10 первоначального (белок 6–7 %), при этом полностью происходит удаление этилового спирта. Затем проводят восстановление гидратных оболочек иммуноглобулина путем метода молекулярной фильтрации и создания градиента концентрации за счет введения в раствор низкомолекулярных веществ мальтозы или натрия хлорида в концентрации 0,1–0,25 % при величине pH 3,8–4,5. Затем добавляют стабилизатор и устанавливают pH, с последующей стерилизующей фильтрацией (pH – 3,5–5,0). В препарате отсутствуют полимеры; мономеры – 96,5–97,8 %; димеры – до 3,5 %; фрагменты – до 0,45 %.

Обращает на себя факт постоянного увеличения препаратов иммуноглобулинов для внутривенного применения, причем для этого используются различные технологические схемы производства, что, несомненно, связано с развитием биотехнологических исследований.

## 2.2. Препараты моноклональных антител

В 1955 году датский исследователь Нильс Эрне разработал новый теоретический метод, который обеспечивал огромное разнообразие антител, защищающих организм от инородных клеток и молекул. В своей так называемой клонально-селекционной теории (селекционной гипотезе образования антител) он постулировал, что каждая иммунная клетка (лимфоцит) несет информацию, необходимую для образования специфического антитела. В процессе иммунной реакции клетки, производящие соответствующие антитела, усиленно делятся, предохраняя тем самым организм от проникновения чужеродных элементов. Из этого открытия следовало, что если в клеточной культуре вырастить потомство лимфоцита, то можно выделить специфические вещества, например, антитела оказывающее сильное терапевтическое воздействие. Лимфоциты весьма чувствительны и быстро погибают в искусственной среде. С другой стороны, хорошо известно, что раковые клетки способны размножаться на протяжении достаточно долгого времени. Это обстоятельство и было использовано аргентинским иммунологом Ц. Мильштейном и немецким ученым Г. Келером работавшим в Кембридже. Им удалось добиться слияния лимфоцитов со злокачественными клетками миеломы (1975 г). Полученные гибридные клетки (гибридомы) могли произ-

водить антитела, и в то же время их в изобилии можно было выращивать в искусственной среде. Выбор опухолевых клеток не случаен. Плазмцитомы происходят из «юных» плазматических клеток – из тех клеток, которые способны к синтезу антител. Способность вырабатывать, а затем и секретировать в кровь иммуноглобулины сохраняется в опухолях. Кроме того, опухоли возникают из одной мутантной клетки (опухоль развивается как клон), и могут образовывать иммуноглобулины.

*Технология получения моноклональных антител* сводилась к следующему: предварительно в организм мышей вводили антиген, вызывая иммунный ответ; извлекали лимфоидную клетку, продуцирующую соответствующие антитела; лимфоидную клетку объединяли с клеткой опухоли (миеломы); получали непрерывно делящийся клеточный гибрид (гибридома), способный синтезировать антитела с заданной специфичностью. Обычно гибридомы получают путем слияния В-лимфоцита, вырабатывающего антитела с заданной специфичностью и клеток опухоли лимфоидной ткани (плазмцитомы). За свое открытие ученые в 1984 году были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине. Образующие гибридами моноклональные антитела имеют сходное молекулярное строение и обладают одинаковой специфичностью.

Таким образом, с 1975 года начинается эпоха создания и использования моноклональных антител. В настоящее время уже созданы десятки препаратов моноклональных антител успешно применяющиеся в клинике при заболеваниях различной этиологии. Гибридомы, синтезирующие определенные виды антител, отбирают на селективных ростовых средах. Затем отобранные гибридомы помещают на культуральную среду, в которой они размножаются и образуют много родственных клеток (клон). Такие клоны могут синтезировать антитела в неограниченных количествах. Обычно препаративные количества моноклональных антител получают в виде асцитной жидкости, которая вырабатывается в организме мышей в ответ на внутрибрюшинное введение гибридом. Асцитная жидкость содержит гомогенные моноклональные антитела в достаточно высоких концентрациях. После очистки, например, аффинной хроматографией, моноклональные антитела используются либо при конструировании тест-систем в виде конъюгата с ферментом или для непосредственной сорбции на планшете, либо для получения лекарственных препаратов.

Для понимания процесса получения моноклональных антител можно привести одну из методик получения мышинных моноклональных антител против Т-лимфоцитов человека, используемых при производстве препаратов

для предупреждения отторжения трансплантата: получение антигена – выделение Т-лимфоцитов периферической крови человека.

Т-лимфоциты выделяют из пула моноклеарных клеток на основе реакции розетко-образования с эритроцитами барана, обработанными нейраминидазой. Для этого лейкоциты крови человека наслаивают на градиент плотности фicol-верографина и центрифугируют при комнатной температуре в течение 40 минут при 300 g. Моноклеарные клетки отделяют и трижды промывают средой 199 при указанном режиме. Смешивают равные объемы взвеси отмытых моноклеарных клеток, эритроцитов барана и эмбриональной телячьей сыворотки, предварительно адсорбированной эритроцитами барана. Смесь инкубируют в течение 15 минут при 37 °С, центрифугируют в течение 5 минут при 150 g и инкубируют при 4 °С в течение 12–16 часов. Клетки осторожно суспендируют и наслаивают на градиент фicol-верографина, а затем центрифугируют при указанных условиях. Т-клетки, образовавшие розетки, осаждаются на дно пробирки. Розетки разрушают гипотоническим раствором. Выделенные Т-клетки используют для иммунизации животных.

1. *Иммунизация животных и получение клеток селезенки.* Для иммунизации используются инбредные линии мышей, сингенные, по отношению к плазмцитоме. Мышам линии BALB/b вводят в хвостовую вену Т-клетки в количестве около 2000. Иммунизацию проводят 5 раз с интервалом 2 недели. Последнюю иммунизацию проводят за 4–5 дней до извлечения селезенки. Селезенку иммунизированных мышей извлекают в условиях асептики, измельчают гомогенизацией, фильтруют через ткань и отмывают 2–3 раза средой 199.

2. *Линия миеломных клеток.* Для гибридизации используются различные линии миеломы мышей, например, мышьяная миелома P3X6.3Ag.8.653, поддерживаемая в культуральной среде с добавлением 15 % эмбриональной телячьей сыворотки, глутамина (2 мкМ), гентамицина (0,1 мг/мл).

3. *Слияние клеток, получение гибридом.* Клетки миеломы мышей смешивают с клетками селезенки в соотношении 1 : 10. Смесь отмывают средой 199, помещают в среду 199, центрифугируют 3 минуты при 300 g и инкубируют при 37 °С в течение 20 минут. Затем среду удаляют отсасыванием и к клеткам в течение 2–3 минут по каплям прибавляют 50 %-ый раствор полиэтиленгликоля и разводят средой в 5–10 раз. Клетки оставляют на 2–8 часов. После этого клетки разливают по 0,2 мл в лунки микропланшета на 96 ячеек. На следующий день среду меняют на среду ГАТ (культуральная среда с добавлением 13,6 мкг/мл гипоксантина, 19 нг/мл аминоптерина и 3,85 мкг/мл

тимидина). Культуры клеток инкубируют в водонасыщенной атмосфере, содержащей 5 % углекислого газа при 37 °С. Видимые в инвертированном микроскопе колонии появляются через 10–14 дней.

Необходимо остановиться на механизме процесса образования гибридом. Неслившиеся лимфоциты отмирают через несколько дней после гибридизации. Отделение неслившихся плазмцитомных клеток от гибридом возможно только при использовании среды ГАТ. Предпосылкой для ГАТ-зависимой селекции является наличие вариантов плазмцитомных клеток, дефектных по гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазе (ГТФРТ) или по тимидинкиназе (ТК). Эти клетки отмирают в культуральной среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин (ГАТ), поскольку не обладают способностью обойти аминоптериновый белок основного пути биосинтеза ДНК за счет биосинтеза гипоксантина и тимидина. Только гибридные клетки, полученные слиянием ГТФРТ-негативных или ТК-негативных плазмцитомных клеток и нормальных лимфоцитов, выживают в среде ГАТ, преодолевая аминоптериновый белок. Дефектные по ГТФРТ линии плазмцитом получают путем селекции клеток, резистентных к 8-азагуанину. Линии, дефектные по ТК, выделяют по резистентности к 5-бромдезоксигуанидину. Среди растущих на среде ГАТ гибридом выделяют и селекционируют те клоны, которые продуцируют иммуноглобулины нужного класса и определенной специфичности. Для слияния используют полиэтиленгликоль с молекулярной массой 1540 или 4000.

4. *Селекция гибридных клеток на среде ГАТ* – отбор штаммов продуцентов (определение антителопродуцирующей способности гибридом).

Отбор штаммов, продуцирующих моноклональные антитела, осуществляют путем непрямого иммунофлуоресцентного анализа образцов культуральной жидкости с клетками, используемыми для иммунизации.

Клетки в количестве 500 тысяч инкубируют с 20 мкл супернатанта клеток в разведении 1 : 10 раствором натрия хлорида 0,9 %, содержащего 0,1 % азида натрия. Инкубацию проводят при 4 °С в течение 30 минут. Затем клетки дважды промывают фосфатно-солевым буферным раствором, содержащим 2,0 % эмбриональной телячьей сыворотки, 0,1 % азида натрия и 0,01 М NEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-2-этансульфоновая кислота) буфера (буфер А) и инкубируют при 4 °С в течение 30 минут с 20 мкл поликлональных кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с ФИТЦ или пероксидазой хрена. После этого клетки дважды отмывают буфером А и ресуспендируют в 0,9 %-ом растворе натрия хлорида с 1 % формалина. В полученной суспензии анализируют флуоресценцию клеток на

проточном цитофлуориметре. Был отобран штамм для получения моноклональных антител, получивший название ICO-90.

В литературе для определения антителопродуцирующей способности гибридом предлагается ряд высокочувствительных методов в зависимости от используемого антигена: к растворимым антигенам – радиоиммунологический метод; к поверхностным антигенам – либо метод радиоиммунологического связывания, либо использование конъюгированных с ферментами антител для иммунофлюоресцентного анализа; метод локального гемолиза в геле; метод нейтрализации фагов; метод непрямой флюоресценции и ряд других.

5. *Клонирование.* Полученную продуцирующую гибридому дважды клонируют на фидере из клеток селезенки и тимуса мышей BALB/c. Для приготовления фидера кусочки тимуса и селезенки измельчают на гомогенизаторе Поттера в ростовой среде (например, 199 или RPMI-1640), взвесь клеток фильтруют через ткань и полученную суспензию клеток разливают по 0,1 мл в лунки 96 ячейкового микропланшета. Через 3–7 дней эти лунки используют как фидер. Клетки продуцирующего клона снимают пипетированием, подсчитывают в камере Горяева и разводят ростовой средой до конечной концентрации 50 клеток в 10 мл. Полученную взвесь разливают по 0,1 мл в лунки фидера. При этом на 2 лунки приходится 1 клетка. Видимые колонии появляются через 10–14 дней. Клонирование считается эффективным, если колонии вырастают не более, чем в 75 % лунок. Культуры гибридом поддерживают на самках мышей линии BALB/c путем серийного пассажа в асцитической жидкости.

Существует возможность консервирования гибридом при низкой температуре. Гибридомы необходимо замораживать на ранних стадиях во время развития культур, не дожидаясь получения массовой культуры, желательно в середине логарифмической фазы. Таким образом, получают банк культур, что позволяет возобновить культуру в случае её гибели. Стабильные культуры гибридом выдерживают замораживание в течение нескольких раз. Гибридомы суспендируют в среде RPMI 1640 с добавлением 20 % сыворотки плода коровы и диметилсульфоксида в количестве 50–70 г/л. Клетки первоначально охлаждают до 2–4 °С, а затем выдерживают в сосуде Дьюара в течение 1–3 часов и переносят в жидкий азот.

6. *Культивирование гибридом in vivo* (получение моноклональных антител ICO-90).

Моноклональные антитела выделяют из асцитической жидкости мышей, которым внутрибрюшинно инокулируют клетки продуцируемой гибридомы.

6.1. *Получение асцитической жидкости.* За 3–10 дней до инокуляции клеток гибридомами мышам внутрибрюшинно вводят 0,5 мл вазелинового масла (полужидкого парафина или пристана – 2, 6, 10, 14-тетраметилпентадекан) для индукции роста гибридом в асцитной среде;  $10^7$  клеток гибридомы ICO-90 инокулируют мышам внутрибрюшинно и через 7–8 дней, в зависимости от накопления асцита, собирают асцитную жидкость. Асцитную жидкость, полученную от разных мышей, объединяют и центрифугируют в течение 20 минут при 2500 g (при 4 °С). Супернатант асцитической жидкости, содержащий неочищенный раствор моноклональных антител хранят при минус 50 °С. В асцитической жидкости мышей концентрация моноклональных антител может достигать 5–10 мг/мл. На данной стадии необходимо обращать внимание на генотип и пол животных. Мыши линии BALB/c, по данным многих исследователей, высокочувствительны и не всегда хорошо выживают в условиях обычных вивариев после кондиционирования и инокуляции клеток. Поэтому довольно часто используют гибриды мышей первого поколения, например, DBA/2 x BALB/c – DBF1 или BALB/c x C57Bl/6 – CB6F1. Использование гибридов мышей позволяет увеличить выход моноклональных антител в асцитической жидкости. Использование гибридов также позволяет уменьшить время роста опухоли. К увеличению выхода моноклональных антител способствует обработка полостей органов (брюшной, грудной, сердечной) 0,3 М раствором натрия хлорида. Так, например, при получении моноклональных антител для определения групп крови такая обработка позволяла увеличить выход антител на 60–160 % в зависимости от используемого генотипа мышей.

6.2. *Выделение и очистка моноклональных антител.* Выделяют моноклональные антитела путем аффинной хроматографии на сорбенте А-сефароза. Асцитную жидкость размораживают и центрифугируют в течение 20 минут при 2500 g (при 4 °С). Супернатант диализуют против 0,1 М натрий фосфатного буфера (рН 8,0) в течение 12–16 часов при температуре 4 °С. Полученный диализат наносят на колонку с протеин-А-сефарозой предварительно уравновешенную натрий фосфатным буфером (рН 8,0) и промывают этим же раствором до отсутствия белка. После этого связавшиеся с сорбентом иммуноглобулины элюируют 0,1 М натрий-цитратным буфером (рН 3,0). Полученный элюат концентрируют, например, ультрафильтрацией и используют для получения лекарственного препарата.

## 7. Получение готового препарата.

7.1. *Контроль выделенных моноклональных антител.* Моноклональные антитела, полученные по предлагаемому методу, представляют собой иммуноглобулины подкласса IgG2.

Полученный препарат контролируют ВЭЖХ: не менее 95 % моноклональных антител. Подлинность моноклональных антител оценивают методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецил-сульфата натрия. Обнаружено две четких полосы, соответствующих белковым фракциям с 25 и 55 кДа. Специфическую активность определяли методом проточной цитофлуориметрии в непрямой иммунофлуоресценции с лимфоцитами человека. Установлено, что полученные моноклональные антитела специфически связываются с Т-лимфоцитами периферической крови человека и не связываются с другим типом клеток крови человека.

7.2. *Получение готового препарата.* После проведения контроля и подтверждения соответствия раствора моноклональных антител предъявляемым требованиям раствор стабилизируют полисорбатом 80, проводят стерилизующую фильтрацию через мембраны с размером пор 0,22 мкм и разливают в первичную упаковку в асептических условиях.

8. *Контроль готового препарата.* Необходимо отметить, что получение препаративных количеств моноклональных антител возможно не только из асцитической жидкости мышей, но и путем культивирования гибридом в культуральной среде. После отбора гибридомных клеток, синтезирующих интересующие нас антитела, можно приступить к их массовому производству. Гибридомы переносят на ростовую среду и начинают культивирование. При этом особое внимание уделяют плотности посева, так как низкая плотность снижает развитие гибридом и продукцию моноклональных антител. Высокая плотность, например, выше 0,5 млн/мл может быть также губительна для клеток. При росте до предельной плотности клеток наблюдается гибель гибридом. При культивировании можно проводить добавление питательной среды или её отдельных компонентов. Выращивание проводят как в стационарной культуре, так и с использованием роллерных установок или биореакторов. С производством моноклональных антител в ростовой среде непосредственно связан вопрос с отмиранием клеток в зависимости от условий культивирования. Клетки в культуре гибнут, используя два механизма: некроз, связанный с пассивной гибелью клеток под воздействием экстремальных факторов; апоптоз – связан с программированием клеточной гибели. Этот ответ клетки является результатом реализации её генетической информации под влиянием индукторов апоптоза, таких как уровень истощения

в среде глюкозы, аминокислот и витаминов; содержание в среде митогенных факторов и токсинов; pH; химических и физических свойства среды. Так, например, клетки гибридом, культивируемые на бессывороточной среде RPMI-1640, при разведении среды реагируют на снижение питательных веществ резким повышением апоптоза. Добавление в среду аминокислот предотвращало развитие апоптоза. Введение в среду только глутамина оказывало слабо выраженный эффект на уровень апоптоза, однако резко увеличивало продукцию моноклональных антител. При культивировании мышечных гибридом в реакторе объемом 1 литр на 50 % снижалось количество жизнеспособных клеток при выращивании без проведения барботажа. В суспензии была обнаружена субпопуляция клеток уменьшенного размера с наличием редуцированной и конденсированной ДНК, с появлением апоптотических телец, что является типичными признаками апоптоза. Бесспорно, все эти факторы должны учитываться специалистами биотехнологами при разработке оптимальных условий производства моноклональных антител и требуют всесторонней валидации процессов.

Среди моноклональных антител, используемых для терапии, выделяют:

✓ *нативные антитела* – полные молекулы иммуноглобулинов мыши (например, Ортоклон), которые при введении человеку могут вызывать сенсибилизацию и формирование нейтрализующих антител;

✓ *модифицированные антитела*, получаемые путем создания генетически измененных клеток продуцентов. Среди модифицированных выделяют гуманизированные антитела (например, Герцептин), содержащие два домена: мышинный вариабельный – ответственный за специфическое связывание антигена и человеческий константный – предотвращает развитие иммунных реакций против мышинных иммуноглобулинов.

Хорошо известен противоопухолевый препарат *Герцептин (Трастузумаб)*, разработке и использованию которого посвящено значительное количество работ. Трастузумаб – рекомбинантные гуманизированные моноклональные антитела, производные ДНК, которые селективно взаимодействуют с внеклеточным доменом белка, который является рецептором-2 к эпидермальному фактору роста человека (HER2). Антитела принадлежат к классу IgG1 и содержат регионы человека (константные участки тяжелых цепей) и комплементарно-определяющие регионы мышинных участков антител p185 HER2 к HER2.

HER2 (также *neu* или *c-erbB2*) является протоонкогеном семейства рецепторов эпидермального фактора роста – рецепторных тироксинкиназ. HER2 кодируется трансмембранным рецептороподобным белком с молеку-

лярной массой 185 кДа, который структурно подобен другим членам семейства рецепторов эпидермального фактора роста. Амплификация гена HER2 приводит к гиперэкспрессии белка HER2 на мембране клеток опухоли, что, в свою очередь, вызывает постоянную активацию рецептора HER2.

На примере создания препарата Герцептин можно рассмотреть основные принципы разработки гуманизированных моноклональных антител, содержащих два домена. С целью изучения действия мышиных моноклональных антител (мМАт) были получены антитела к различным эпитопам внеклеточного домена рецептора HER2 путем иммунизации мышей клетками человека, гиперэкспрессирующими HER2. Исследователями было установлено, что полученные мМАт эффективно замедляют рост опухоли и трансформирование клеток, гиперэкспрессирующих HER2. Получен ряд мМАт, способных угнетать пролиферацию монослойной культуры клеток HER2-положительных опухолей молочной железы и яичника. Причем обнаружено, что моноклональные антитела не подавляли рост клеток карциномы молочной железы с низкой степенью экспрессии HER2, в то время как линии клеток с высоким уровнем экспрессии HER2 были значительно более чувствительны к ингибирующему рост влиянию антител. Аналогично было показано эффективное угнетение роста HER2-положительных клеток рака яичников, желудка и легких. Из всех полученных моноклональных антител к HER2 наибольшей активностью обладали мМАт-4D5. Эти антитела не влияли на рост опухоли карциномы молочной железы, у которых уровень HER2 не был повышен. При проведении клинических исследований было выявлено, что основным фактором ограничивающим применение мМАт-4D5 у человека является их иммуногенность и способность вызывать выработку антител нейтрализующих мышиные антитела, что, естественно, препятствует повторному введению пациентам моноклональных антител. Это является одной из причин того, что многие мМАт остаются на стадии эксперимента. Именно этот факт заставляет проводить создание гуманизированных или химерных антител, позволяющих их длительное применение.

Для того чтобы свести к минимуму направленный на мМАт иммунный ответ пациента необходимо было гуманизировать мышиные антитела. С помощью методов генной инженерии гуманизирование проводили по следующей схеме: полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой для клонирования либо переменных, либо гипервариабельных регионов антител из мРНК гибридомы и слияние их с константными регионами антител человека. Используя данный подход и выбирая соответствующий регион тяжелой цепи в качестве партнера для клонирования, можно получить антитела

со специфичными эффекторными функциями. Полученные в результате этого клоны можно экспрессировать в культуре клеток для производства больших количеств модифицированных антител. После устранения чужеродных частей МАт их замещают структурами человеческого иммуноглобулина, используя технологию рекомбинантной ДНК, что улучшает специфичность иммунного ответа. Кроме того, получение человеческих моноклональных антител стало возможным благодаря разработке техники трансгеноза (переноса локуса генов или хромосом). В результате были получены химерные мыши, которые содержали в геноме фрагменты хромосом 2, 22 и 14 человека, несущие локусы генов легких (каппа и лямбда) и тяжелых цепей иммуноглобулинов соответственно. Разрушение собственных локусов иммуноглобулинов позволило получить линии животных, экспрессирующих только человеческие антитела с высокой аффинностью и специфичностью. После иммунизации животных соответствующим антигеном получали мышиные гибридомы, продуцирующие человеческие моноклональные антитела.

Таким образом, Герцептин (Трастузумаб, гМАт HER2) представляет собой рекомбинантное человеческое гуманизированное моноклональное антитело к HER2, полученное из мМАт-4D5, т.е. шесть определяющих комплементарность регионов мМАт-4D5 (гипервариабельные антигенсвязывающие регионы) были пересажены в полностью человеческую основу иммуноглобулина без потери специфической реактивности – способности к высокоаффинному распознаванию эпитопа HER2, свойственного мышиным моноклональным антителам. Герцептин представляет собой иммуноглобулин класса G1, в котором 95 % аминокислотной последовательности в молекуле соответствует иммуноглобулину человека и 5 % мышиным иммуноглобулинам. Молекулярная масса Герцептина около 145 кДа. Трастузумаб вырабатывается генно-инженерной культурой клеток яичника китайского хомячка. При помощи известных стандартных методик получения рекомбинантных продуктов последовательность ДНК, кодирующую продукцию, вводят культуру клеток яичника. Культуру выращивают в среде, содержащей гентамицин. Антитела при помощи биотехнологических методов (хроматография, центрифугирование, ультрафильтрация, фильтрация) выделяют и подвергают очистке.

Аналогично получен препарат *Зенапакс (Даклизумаб)* – рекомбинантные гуманизированные (90 % аминокислотной последовательности в молекуле соответствует иммуноглобулину человека и 10 % соответствует иммуноглобулинам мыши) антитела IgG1, действующие как антагонисты рецепторов к интерлейкину-2 (ИЛ-2). Даклизумаб с высокой специфичностью свя-



зывается с альфа-субъединицей высокоаффинного рецепторного комплекса ИЛ-2, который экспрессируется на активированных Т-клетках. По своему назначению Зенапакс угнетает опосредованную ИЛ-2 активацию лимфоцитов (крайне важное звено патогенеза иммунной реакции, лежащей в основе отторжения трансплантата, например, при пересадке почки).

Аналогичным действием обладает препарат *Симулект (Базиликсимаб)* – специфический иммуносупрессор, антагонист рецепторов интерлейкина ИЛ-2. Химерные моноклональные антитела, обладающие, как в случае описанных препаратов, свойствами антител мыши и человека, действие которых направлено против альфа-цепи рецептора интерлейкина ИЛ-2 (антиген CD-25), экспрессируемого на поверхности Т-лимфоцитов в ответ на стимуляцию антигена. Симулект специфически связывается с антигеном CD-25 на активированных Т-лимфоцитах, экспрессирующих высокоаффинный рецептор ИЛ-2, в результате чего предотвращается связывание ИЛ-2, служащее сигналом для пролиферации Т-клеток. Блокада продолжается пока концентрация Базиликсимаба в организме больного более 0,2 мкг/мл.

Особый интерес представляет препарат *Авастин (Бевацизумаб)*, который является первым препаратом моноклональных антител ингибирующих ангиогенез – рост сети кровеносных сосудов, поставляющих опухоли питательные вещества и кислород. Мишенью препарата является белок, называемый фактором роста эндотелия сосудов (VEGF), который является важнейшим фактором ангиогенеза. Авастин представляет собой рекомбинантные гуманизированные (химерные) моноклональные антитела IgG1 с молекулярной массой 149 кДа. Антитела образуют комплекс с VEGF и тем самым блокируют его активность, в результате чего прекращается поставка крови в опухоли. Используют для лечения колотерального рака и лечения женщин с метастатическим раком молочной железы.

Препарат *РеоПро (Абциксимаб)* ингибирует агрегацию тромбоцитов путем связывания с интактным гликопротеиновым рецептором (GP II / IIIa), принимающим активное участие в агрегации тромбоцитов. РеоПро ингибирует агрегацию тромбоцитов путем предупреждения связывания фибриногена, фактора Виллебранда и других адгезивных молекул с рецепторным участком GP II / IIIa на активированных тромбоцитах. Препарат эффективно применяется для предупреждения ишемических осложнений на сердце при проведении чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики, а также при нестабильной стенокардии и остром инфаркте миокарда с

зубцом Q. Проведено изучение ингибирования агрегации тромбоцитов F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов, полученных путем гидролиза пепсином моноклональных антител к гликопротеиновому рецептору и Fab-фрагментов, полученных путем восстановления дисульфидных связей F(ab')<sub>2</sub> с последующим алкилированием. Моноклональные антитела и их фрагменты, связываясь с гликопротеином препятствуют связыванию с ним фибриногена, что препятствует агрегации тромбоцитов. Фрагменты моноклональных антител были исследованы в опытах *in vitro* и на здоровых добровольцах. Более выраженная антиагрегационная активность выявлена у F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов по сравнению с Fab-фрагментами. Препараты моноклональных антител, используемых в клинике

Перечень наиболее часто используемых препаратов моноклональных антител и их назначение приведен в табл. 16.

Таблица 16 – Перечень препаратов моноклональных антител, используемых в клинике

Наименование препарата и производитель	Действующее вещество	Форма выпуска и состав	Назначение препарата, дата начала применения
1	2	3	4
1. <b>Зенапакс</b> , Ф.Хоффманн Ля Рош Лтд, Швейцария	<b>Даклизумаб</b> , гуманизированные, рекомбинантные антитела	Концентрат, 5 мг/мл полисорбат 80, натрия фосфат, вода для инъекций, натрия хлорид	Используется для угнетения опосредованной ИЛ-2 активации лимфоцитов для блокировки отторжения трансплантата, IgG1 анти-CD25, (1997 г.)
2. <b>Герцептин</b> , Ф. Хоффман Ля Рош ЛТД, Швейцария	<b>Трастузумаб</b> , гуманизированные, рекомбинантные антитела	Лиофилизат, 150 и 440 мг во флаконе, L-гистидин, трегало-за, L-гистидина гидрохлорид, полисорбат 20	Лечение больных с метастазирующим раком молочной железы (опухоль с гиперэкспрессией HER2), IgG1, (1998 г.)-

Продолжение таблицы 16

1	2	3	4
3. <b>Мабтера</b> , Ф. Хофманн Ля Рош Лтд, Швейцария	<b>Рутиксимаб</b> , химерные антитела	Концентрат, 10 мг/мл натрия хлорид, твин 80, натрия цитрат, вода для инъекций	Лечение онкогемато- логических больных. Связывается с опреде- ленными антигенами клеточных мембран опухолевых В- лимфоцитов, запуская механизм гибели клетки, IgG1 анти- CD20, (1997 г.)
4. <b>Ортоклон</b> , Ortho Pharmaceuticals, США	<b>Муромонаб</b> , CD3, мышинные антитела	Концентрат, 1 мг/мл	Используется как им- мунодепрессант при пересадке органов. Блокирует рецепторы Т-лимфоцитов, оттор- гающих пересажен- ный трансплантат, IgG2a анти-CD3, (1986 г.)
5. <b>РеоПро</b> , Centocor, Нидерланды	<b>Абсиксамаб</b> , химерные антитела	Раствор для инфузий, 2 мг/мл натрия хлорид, натрия фосфат, Твин-80, вода для инъекций	Используется в каче- стве антиагреганта. Блокирует рецепторы тромбоцитов. Острый инфаркт мио- карда с зубцом Q и при предупреждении осложнений при про- ведении коронарной ангиопла- стики, IgG1 анти-GRПb/Ша, (1994 г.)
6. <b>Ремикейд</b> , Centocor, Нидерланды	<b>Инфликсимаб</b> , химерные антитела	Лиофилизат, 100 мг во флаконе	Применяется для ле- чения ревматоидного артрита и болезни Крона, IgG1 антифак- тор некроза опухолей, (1998 г.)

Продолжение таблицы 16

1	2	3	4
7. <b>Симулект</b> , Novartis Pharma, Швейцария	<b>Базеликсимаб</b> , химерные антитела	Лиофилизат, 20 мг во флаконе	Иммуносупрессор – применяется для профилактики отторжения трансплантата, IgG1 анти-CD25, (1998 г.)
8. <b>Кампат-1Н</b> , Millenium and illex Partners, США	<b>Алемтузубам</b> , гуманизированные антитела	Концентрат, 10 мг/мл натрия фосфаты, твин 80, натрия хлорид, вода для инъекций	При лечении Злокачественных лимфом, IgG1. анти- CD52, (2001 г.)
9. <b>Милотарг</b> , American Home Products, США	<b>Гемтузумаб</b> , конъюгат, гуманизированные антитела	Концентрат, 10 мг/мл калия и натрия хлориды, ЭДТА, калия и натрия фосфаты, твин 80, вода для инъекций	Для лечения больных при реци- дивах хронического миелолейкоза, IgG4 анти-CD3, иммунотоксин, (2000 г.)
10. <b>Авастин</b> , Ф. Хоффман Ля Рош Лтд, Швейцария	<b>Бевацизумаб</b> , гуманизированные антитела	Концентрат по 100 и 400 мг во флаконе, 25 мг/мл трегалоза, твин 20, натрия фосфаты, вода для инъекций	Лечение больных с метастатическим раком молочной железы, IgG1, анти- фактор роста эндо- телиа сосудов, (2004 г.)

Разработка терапевтических препаратов на основе моноклональных антител интенсивно проводится по многим направлениям. На одном из них хотелось бы остановиться. Рецептором фибронектина является  $\alpha 6$ , экспрессирующийся в основном на эпителиальных клетках. В здоровых тканях взрослых редко определяется мРНК и белок  $\alpha 6$ , который экспрессируется во время развития эмбрионов, заживления ран и в некоторых эпителиальных опухолях. Когда  $\alpha 6$ -субъединица экспрессируется в линии клеток карциномы толстой кишки, в которой в норме отсутствует, экспрессия  $\alpha 6$ -субъединицы обуславливает повышенную способность к пролиферации. Экспрессия  $\alpha 6$  ин-

дуцируется в альвеолярных эпителиальных клетках при повреждениях, вызываемых бактериями. Экспрессию  $\nu 6$  наблюдают в участках субклинического воспаления, например, при фиброзе легких и острого повреждения легких. Введение антагониста  $\nu 6$  продемонстрировало ингибирование метастазов в легких на модельных экспериментах на мышах. Возникло предположение, что введение пациенту антагониста  $\nu 6$ , например, моноклональных антител, приведет к терапевтическому эффекту. Для получения моноклональных антител против  $\nu 6$ , мышей иммунизировали рекомбинантным секретиремым человеческим  $\nu 6$ . Мышиные спленоциты выделяют и сливают со штаммами мышинной миеломы Sp 2/0 в соответствии со стандартными методиками. Проводят скрининг полученного супернатанта с помощью проточной цитометрии. Полученные антитела специфичны в отношении рецептора  $\nu 6$ . Используя терапевтическую дозу моноклональных антител специфически связывающих  $\nu 6$  удалось купировать процесс фиброза и повреждения легких в модельных экспериментах.

На примере получения нейтрализующих вирус бешенства моноклональных антител мы рассмотрим *получение гуманизированных моноклональных антител*.

1. *Используемые клетки*. Клетки человека, используемые для гибридизации, получали из периферической крови доноров после иммунизации вакциной против бешенства через 21 день после введения вакцины. Все доноры являлись негативными при тестировании на ВИЧ и гепатиты В и С. Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли из цельной крови центрифугированием в градиенте плотности фикола. Затем отделяли Т-клетки. Клетки обрабатывали магнитными гранулами, покрытыми моноклональными антителами против CD2. Отбирали преимущественно В-клетки негативные по CD2.

Клетки гибридной гетеромиеломы мышь-человек SHM-D33, используемые в качестве гибридных партнеров при слиянии. Лейкоциты мармозетки B95-8, трансформированные вирусом Эпштейна – Барра (EBV), применяемые в качестве источника EBV были получены из ATCC. Клетки B95-8 культивировали в RPMI-1640 с добавлением 10 % фетальной сыворотки теленка. Затем клетки лизировали путем замораживания – оттаивания на сухом льду для выхода внутриклеточного EBV. Смесь подвергали центрифугированию

при 1000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость, содержащую вирус фильтровали через мембраны с размером пор 0,45 мкм.

2. *В-клетки инкубировали при 37 °С* в течение 2-х часов с вирусом EBV, выделенным из клеток B95-8. После инкубирования и инфицирования В-клеток их дважды отмывали культуральной средой без сыворотки, разводили культуральной средой и помещали в 96-луночный плоскодонный планшет для микротитрования в концентрации  $1 \cdot 10^4$  клеток в лунку и культивировали при 37 °С в увлажненной камере в атмосфере 5 % углекислого газа и 95 % воздуха, в течение 4-х недель.

3. После того как было проведено трансформирование клеток EBV, *клетки подвергали центрифугированию*. Надосадочную жидкость собирали и тестировали иммуноферментным методом (ELISA) на предмет наличия антител, специфичных в отношении нейтрализации вируса бешенства.

4. *Клеточные линии*, продуцирующие нейтрализующие антитела *подвергали гибридизации с клетками SHM-D33*. Равные количества SHM-D33 и клеток, трансформированных EBV, добавляли в стерильную пробирку и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 минут. Клетки дважды отмывали культуральной средой без сыворотки и ресуспендировали осадок в 100 мкл среды. Пробирку с материалом нагревали одну минуту до 37 °С, а затем в течение 45 секунд добавляли по каплям 0,5 мл подогретого до 37 °С 50 % раствора полиэтиленгликоля (м.м. 1500) при осторожном встряхивании. Затем реакцию гибридизации останавливали медленным добавлением в течение 30 секунд 3 мл среды, не содержащей сыворотки. Затем в течение 30 секунд добавляли ещё 9 мл среды. Пробирки выдерживали при комнатной температуре в течение 8 минут и инкубировали при 37 °С в течение 2 минут. Затем клетки центрифугировали при 500 об/мин в течение трех минут и осадок ресуспендировали в 30 мкл среды Dulbecco в модификации Iscove с добавлением 10 % фетальной сыворотки теленка, а также 0,04 мкм аминокпертина и 10 мкм убаина для селекции против негибридизовавшихся клеток. Суспензии помещали в 96-луночный планшет для микротитрования и культивировали в увлажненной камере в атмосфере 5 % углекислого газа и 95 % воздуха, около 6-ти недель.

5. После формирования гетерогибридных клеток, *культуру центрифугировали и надосадочную жидкость тестировали* на продукцию антител специфичных в отношении вируса бешенства.

6. *Гены, кодирующие переменный регион тяжелых и легких цепей иммуноглобулина получают из лимфоидных клеток, которые продуцируют моноклональные антитела*, нейтрализующие вирус бешенства. Например, клеточные линии гетерогридомы, продуцирующей моноклональные антитела против гликопротеида вируса бешенства представляют источник переменного региона для настоящих химерных антител. Константные регионы получают из антителопродуцирующих клеток человека стандартными способами клонирования.

7. *Нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую и легкую цепи моноклональных антител, нейтрализующих вирус бешенства, его фрагмент или аналог, встраивают в подходящий экспрессирующий вектор*. Данный вектор содержит элементы, необходимые для транскрипции и трансляции встроенной последовательности, кодирующей белок, так что генерируются рекомбинантные молекулы ДНК, которые направляют экспрессию легкой и тяжелой цепей иммуноглобулинов для образования моноклональных антител, нейтрализующих вирус бешенства. Предпочтительной реципиентной клеточной линией является линия клеток миеломы. Клетки миеломы могут синтезировать, конструировать и секретировать иммуноглобулины, кодируемые трансформированными генами иммуноглобулинов. Кроме того, они обладают механизмом гликозилирования иммуноглобулинов. Наиболее оптимальной клеткой реципиентом является клеточная линия миеломы, которая не продуцирует иммуноглобулины, например, такая как Sp 2/0. Данные клеточные линии Sp 2/0 продуцируют только иммуноглобулины, кодируемые трансформированными генами иммуноглобулинов. Клетки миеломы могут выращиваться в культуре или брюшной полости мышей.

8. *Предпочтительным путем введения ДНК в лимфоидные клетки является введение путем электропорации* (клетки реципиенты подвергают электрическому импульсу в присутствии ДНК, подлежащей включению). Существует способ для введения ДНК в клетки многих типов – преципитацией фосфатом кальция. Интересен путь слияния, заключающийся в обработке лизоцимом. При этом снимается клеточная стенка с бактерий, несущих рекомбинантную плазмиду, содержащую гены иммуноглобулинов. Полученные сферопласты сливаются с клетками миеломы с помощью ПЭГ.

9. *Полученные антитела выделяют и очищают аффинной хроматографией на сорбентах: Protein A Sepharose – IgG1 Protein и на G Sepharose –*

IgG3. Полученные моноклональные антитела подтвердили способность нейтрализовать вирус бешенства, проведены исследования их терапевтического действия. Предложено их использование в качестве лекарственного и профилактического препарата.

Основные *методы контроля препаратов моноклональных антител* позволяют полностью оценить качество предлагаемых препаратов.

1. *Автентичность*. Определение проводят рядом методов в зависимости от исследуемого препарата. Так, используют метод капиллярного электрофореза с интегрированием. Процесс проводят при температуре капилляра ( $20 \pm 2$ ) °С и УФ детекции при 210–220 нм. При проведении контроля в качестве стандарта используют эталонный материал. При этом автентичность определяется путем сравнения времени миграции между основным пиком эталона и основным пиком исследуемого образца. Разница во времени миграции пика эталона и пика образца должна быть меньше 0,1 минуты. В другом случае автентичность может определяться методом изоэлектрического фокусирования. Определение проводят при сравнении с эталонным образцом. Испытания считают позитивными, если образец идентичен эталонному стандарту, а именно, рI диапазона образца и стандарта – равны. Полная идентичность между стандартом и образцом в основных полосах изоэлектрического фокусирования. Возможно также определение автентичности по биологической активности при сравнении с эталонным образцом.

2. *Чистота и примеси*. Определение проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Так, например, для трастузумаба проводят определение размеров молекул и содержания мономеров, количество которых должно быть не менее 98 %, используя изократический режим элюирования. При помощи высокоэффективной ионообменной хроматографии с градиентным режимом элюирования определяют примеси, которых в препарате должно быть не более 20 % (при основном пике не менее 65 %). Возможно также определение молекулярно-массового распределения с идентификацией агрегатов, мономеров, продуктов деструкции.

3. *Активность*. Определение проводят биологическими методами с обязательным использованием стандартного образца. Методики основаны на специфической активности моноклональных антител. Так, например, для контроля трастузумаба используют его свойства снижать пролиферацию линии клеток карциномы протоков человеческой молочной железы. Возможно

также определение индекса стимуляции моноклональных антител на культуре клеток или иммуноферментным методом, например для даклизумаба проводят испытание на взаимодействие рецепторов со стандартным препаратом ИЛ-2.

4. *Гомогенность*. Определение проводят одним из вариантов электрофореза, например, электрофорезом в полиакриламидном геле с додецилсульфатом при сравнении со стандартным образцом и маркерами молекулярной массы. Препарат считают гомогенным, если основные полосы образца и эталона по интенсивности и мобильности идентичны. Степень гомогенности определяют по соотношению суммарного объема легких и тяжелых цепей к суммарному объёму всех полученных полос.

5. *Значение рН*. Определение проводят потенциометрически.

6. *Содержание белка*. Определение проводят Уф-спектрометрией.

7. *Бактериальные эндотоксины*. с применением LAL-теста.

8. *Стерильность*. Определяют по Е. Ф.

9. *Вода*. Определение проводят для лиофилизированных препаратов методом Фишера.

10. *Прозрачность, цветность, осмоляльность, механические включения*. Определение проводят по методам, изложенным в фармакопеях.

Особый интерес представляют *препараты моноклональных антител следующего поколения*, полученные путем конъюгации антител с изотопами: *Зевалин (Ибритумомаб)* – является конъюгатом мышинных моноклональных антител против CD20 с радиоактивным изотопом иттрия 90 ( $^{90}\text{Y}$ ); *Бексар (Тозитумомаб)* – является конъюгатом мышинных моноклональных антител против CD20 антигена с радиоактивным изотопом иода 131 ( $^{131}\text{I}$ ).

Бексар и Зевалин изучаются при множественной миеломе, идиопатической пурпуре, ревматоидном артрите, неходжкинской лимфоме и демонстрируют более высокую терапевтическую эффективность по сравнению с монопрепаратами.

*Милотарг* (антитела к CD33), который обнаруживается в большинстве лейкоэмических клеток, представляет собой конъюгат с токсином калихимидина. Ведутся работы по изучению гуманизированных антител к C5 компоненту комплемента – ингибитору апоптоза.

***Применение моноклональных антител.*** Необходимо отметить, что *моноклональные антитела открывают новый этап в химиотерапии различных заболеваний*, так как позволяют осуществлять направленную биотерапию. Основные сферы применения: онкология, артриты, иммунные (включая иммуносупрессоры при трансплантации органов) и воспалительные процессы.

За последние годы активно развивается *направление исследований по получению набора рекомбинантных фрагментов антител*. Создание минимальных по размерам антител, сохраняющих антигенсвязывающие функции, является одним из основных направлений инженерии в данной области. Наименьшие по размерам антитела (scFv) состоят из переменных доменов легких и тяжелых цепей, связанных гибким пептидным линкером типа Cys4Ser устойчивым к действию протеаз. Под контролем соответствующего промотора такие белки способны со значительным выходом секретироваться в прокариотических клетках, в частности *E. Coli*, что создает условия для создания биотехнологического процесса получения. Мини-антитела могут служить основой для получения мультивалентных антител, а также бифункциональных производных – иммуноконъюгатов. Подобные конструкции получили название *одноцепочечных антител* (single-chain antibodies).

Производством моноклональных антител в настоящее время занимаются около 200 биотехнологических компаний. Из 350 разрабатываемых препаратов 70 находятся на различных стадиях клинического изучения (препараты для лечения диабета 1-го типа, псориаза, сердечно-сосудистых и других заболеваний). Общая продажа препаратов моноклональных антител в 2006 году составила почти 21 млрд долларов. К 2010 году планируется продажа препаратов моноклональных антител на сумму 50 млрд долларов.

Целесообразно остановиться еще на одном аспекте *применения моноклональных антител – их использовании в качестве диагностических систем*. Создание специальных панелей моноклональных антител к различным эпитопам и их применение для определения организации и иммунохимических свойств серологически активных антигенов возбудителей инфекционных заболеваний. Так, например, антителопродуцирующие гибридомы получали слиянием спленоцитов BALB/c иммунизированных пятикратно

внутрибрюшино  $10^7$  микробных клеток *Y.Pseudotuberculosis* с клетками сингенной плазмацитомы Sp 2/0-Ag8. После клонирования отбор гибридов при первичном скрининге проводили методом лимитирующих разведений. На этапе подтверждения направленности моноклональных антител к сероваро-специфическим антигенным детерминантам и изучение их специфической активности осуществляли в непрямом твердофазном иммуоферментном анализе на клетках референтных штаммов. Исследования позволили с помощью панели моноклональных антител определить принадлежность к конкретному серовару. Аналогичные результаты были получены у холерных вибрионов с применением соответствующей панели антител. Несомненным успехом является получение моноклональных антител к прионам, которые были получены путем иммунизации мышей линии BALB/c рекомбинантным бычьим прионным белком. Очищенные антитела класса М были использованы для диагностики и исследования прионных инфекций.

*Моноклональные антитела могут быть использованы с целью выявления пролиферирующих клеток и оценки степени злокачественности неопластического процесса.* Оценка этого параметра предоставляет возможность изучения организации здоровых тканей, нарушения регуляции клеточного деления при патологических процессах, изменения функциональной активности злокачественно трансформированных клеток. Получены гибридомы, секретируемые моноклональные антитела к ядерному антигену, ассоциированному с клеточной пролиферацией. В качестве иммуногена использовали очищенные от примесей клеточные мембраны лизата ядер В-лимфобластоидной линии Daudi, находящейся в логарифмической стадии роста. Слияние сенсibilизированных спленоцитов мыши проводили с клетками мышинной миеломы путем обработки полиэтиленгликолем с молекулярной массой 3000–3700. Полученные моноклональные антитела были представлены IgM. Скрининг гибридом проводили в реакции непрямо́й иммуофлюоресценции. Полученные моноклональные антитела использовали для определения степени злокачественности опухолевых тканей путем выявления пролиферативной активности неопластических клеток.

*Созданы панели моноклональных антител, распознающих антигенные детерминанты, характерные для каждого из подклассов иммуноглобулинов.* На основе моноклональных антител созданы тест системы для определения

групп крови человека. Широкое применение нашли моноклональные антитела в практике судебно-медицинской экспертизы для выявления веществ, находящихся в микроследовых количествах (слюна, сперма и другие биологические жидкости). В настоящее время созданы коллекции гибридом, продуцирующих моноклональные антитела ко многим бактериальным и вирусным антигенам, изотипам иммуноглобулинов человека, к ряду антигенов человека и животных и другим биологически активным соединениям. В настоящее время активно разрабатываются схемы иммуоаффинного выделения очистки биологически активных соединений (антигена гепатита В, фибронектина, анатоксинов и др.) с использованием моноклональных антител.

Производство моноклональных антител является многостадийным биотехнологическим процессом, параметры которого каждый исследователь и производитель в зависимости от получаемого продукта разрабатывает и валидирует под конкретный объект. Требуют разработки практически все этапы производственного процесса, так как вопрос себестоимости продукта, а следовательно, и конкурентоспособности (при равных показателях качества и эффективности) является одним из наиболее актуальных.

### ***Контрольные вопросы***

1. Описать основные методы выделения иммуноглобулинов.
2. Привести примеры использования иммуноглобулинов для внутривенного применения и дать характеристику основным препаратам.
3. Привести основные способы инактивации вирусов в препаратах иммуноглобулинов.
4. Описать характеристику основных методов контроля иммуноглобулинов.
5. Привести данные об основных принципах получения гибридом.
6. Привести схему получения рекомбинантных моноклональных антител.
7. Представить характеристику препаратов моноклональных антител с учетом их фармакологического действия.
8. Описать основные требования к персоналу, производственным помещениям, оборудованию, используемым для получения препаратов иммуноглобулинов.

### Раздел 3. БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

*Кишечный микробиоценоз* – сложная экосистема. В её состав входит более 400 видов микроорганизмов. Пробиотики, восстанавливают пристеночное пищеварение и колонизационную резистентность. В кишечнике человека, млекопитающих и птиц обитает более 400 видов микроорганизмов, которые выполняют различные функции. По численности и физиологической значимости преобладают бифидо- и лактобактерии. *Лактобактерии* – аэротолерантные аэробы, *бифидобактерии* – облигатные анаэробы. В норме они заселяют слой, прилегающий к клеткам ворсинок в нижних отделах тонкого и толстого кишечника. Постоянно находясь там, они участвуют в примембранном пищеварении, создают колонизационную резистентность, закрепляясь на поверхности слизистой, препятствуют её заселению патогенной и условно-патогенной микрофлорой. У женщин лактобациллы и бифидобактерии также колонизируют нижние отделы генитального тракта, причем, у женщин репродуктивного возраста бифидобактерии обнаруживаются сравнительно редко (в 10–15 % случаев) и основной нормобиоценоз составляют ассоциации представителей *Lactobacillus* с сапрофитными стрептококками и каталазопродуцирующими коринобактериями и стафилококками.

Пробиотики можно использовать одновременно с антибиотиками, если пробиотики включают устойчивые к антибиотикам штаммы (например, лактобифидол). Если штаммы, входящие в препарат не устойчивы к антибиотикам, то его применяют после антибиотикотерапии для восстановления нормальной микрофлоры. Антагонизм к патогенной флоре проявляется в разной степени у разных препаратов за счет продукции органических кислот, перекисей, низкомолекулярных пептидов. Существует мнение, что именно бифидобактерии, составляющие 85–98 % микрофлоры кишечника, играют определяющую роль в регуляции нормобиоценоза и его стабильности. Клеточные стенки бифидобактерий содержат большое количество мурамилдипептида, высвобождение которого способствует активации Т- и В-лимфоцитов и макрофагов, играющих роль в создании общей резистентности организма.

К началу XXI века накоплены данные о роли естественных микробиоценозов организма. Симбиотические ассоциации, составляющие нормальную микрофлору человека, сформировались в результате взаимодействия макро-

и микроорганизмов, эволюционирующих параллельно и взаимосвязано. Суммарный микробный геном в кишечнике человека более чем в 100 раз превышает количество генов в геноме человека. По количественным соотношениям выделяют три группы микробов:

- ✓ *главную* (более 90 % всех микробов) – бифидобактерии, бактероиды;
- ✓ *сопутствующую* (около 10 % от общего числа микробов) – лактобактерии, кишечные палочки, энтерококки и др.;
- ✓ *остаточную* (менее 1 % от общего числа микроорганизмов) – протей, энтеробактерии, клостридии, стафилококки и др.

Микробные сообщества в желудочно-кишечном тракте, ротоглотке, легких, на слизистых покровах ограничены от окружающей среды поверхностной пленкой. В образовании биопленок активно участвуют системы надзора. Например, протеазы хозяина (из гранулоцитов) кооперируются с протеазами грамположительных бактерий. Защита биопленки (от хозяина, лекарств и т.д.) реализуется через особенности потребления субстрата, диффузии, роста, миграции клеток, смерти и десорбции пленки. Механизмы защиты биопленки включают: снижение проницаемости для экзоагентов, в том числе за счет оксидазного и альдегидного сшивания межклеточного пространства с вовлечением разветвленных белково-полисахаридных носителей; адаптивные ответы на стресс за счет индукции активности каталаз; физиологическую гетерогенность популяций. В пленочном моно- или гетеромикроконсорциуме имеет место эффективный природный обмен плазмидами, в том числе и межвидовой.

Ещё, начиная с работ Л. Пастера, внимание микробиологов привлекло явление активного угнетения одних микроорганизмов другими – процессы микробного антагонизма. Способность бифидобактерий подавлять патогенные микроорганизмы впервые описал М. Tissier в 1900 году. Основоположник идеи об использовании живых микроорганизмов для восстановления пищеварения И.И. Мечников установил, что с возрастом в нижних отделах кишечника увеличивается число микроорганизмов с протеолитическими ферментами (т.е. гнилостных). Он предложил вытеснять их (1903–1907 г.г.), применяя постоянно обитающие в кишечнике, живые молочнокислые бактерии. И.И. Мечников обнаружил эффект от приема простокваши с живыми лактобактериями, состоящий в улучшении здоровья потребителей в процессе модификации кишечной микрофлоры.

Одним из наиболее длительно используемых в мире пробиотических препаратов является Yakult. Препарат был разработан и выпущен японской компанией Yakult Honsya. История этого продукта берет начало в 30–40 г.г. XX века, когда Минору Широ (доктор медицины департамента микробиологии, школы медицины Киотского имперского университета) выделил и получил производственные штаммы лактобактерий (*Lactobacillus casei*). Препарат Yakult используется по всему миру в количестве 23 млн флаконов ежедневно. В то же время в 2008 году появились сообщения о побочном действии препарата. Ученые из Медицинского центра Утрехтского университета (Голландия) обнаружили информацию о смерти 24 человек в период с 2004 по 2007 годы в ходе исследования воздействия пробиотиков на больных панкреатитом, в котором принимали участие 296 человек. По мнению исследователей, некоторые из умерших могли бы быть живы до сих пор, если бы не принимали пробиотик. Ученые предупредили, что тяжелобольным следует избегать употребления пробиотических продуктов. Производители утверждают, что напиток Yakult является продуктом питания, а не лекарственным препаратом. Они объяснили, что исследователи вводили препарат непосредственно в кишечник зондом, а это не соответствует обычному пути введения, описанному в рекомендациях. Нидерландским докторам было дано указание не прописывать пробиотик пациентам с болезнями внутренних органов, находящихся в отделениях интенсивной терапии или получающим питание через капельницу.

Левон Ерзюкян в Армении, по мнению армянских ученых, первым в мире предложил использовать живые лактобактерии (штамм Нарине) как пробиотический препарат.

На сегодняшний день известны десятки препаратов пробиотиков. Технологии их получения достаточно близки, поэтому нет смысла, да и возможности описывать все препараты. Будут рассмотрены несколько препаратов, представляющих бактерии разных видов.

### 3.1. Характеристика и отбор штаммов

При отборе штаммов, прежде всего, необходимо ориентироваться на состав биоценозной системы человека, которая в свою очередь зависит от периода онтогенетического развития, пола человека, окружающей экологии, используемых продуктов питания и географической зоны. В Украине исполь-

зуются лактобациллярные, бифидумбактериальные и бациллярные пробиотические штаммы. Аналогичные варианты используются и в России. В Японии применяют преимущественно *L.casei*. В США многие пробиотические продукты создаются с использованием лактобацилл (*L.acidophilus*). Перспективными для создания новых пробиотических препаратов являются штаммы энтерококков и лактококков человека, а также пробиотических ассоциатов бактерий, например, лактобацилл с грибами *Aspergillus* и дрожжами *Saccharomyces* или *Candida*. Несомненный интерес представляют препараты на основе кефирных зерен, включающих *Kluuveromyces*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Pichia*, лактобациллы и стрептококки.

Схема отбора штамма для включения в состав препарата пробиотика должна опираться на:

- функциональные аспекты (антагонистическая активность к патогенной микрофлоре;
- адгезивные свойства к эпителию кишечного тракта или эпителию других тканей, для которых предназначен препарат;
- стимуляцию иммунного ответа;
- общие аспекты (определение источника выделения, изучение биологической безопасности, стойкость к рН желудочного сока, желчи, панкреатического сока, антибиотиков).

Система белковых адгезинов пробиотика реализуется с вовлечением не менее пяти механизмов адгезии, включающих связывание муцина, фибронектина, акцепторов белков поверхностного слоя лактобацилл с участием набора лектинов и лектиноподобных соединений. Грамотрицательные бактерии сорбируются на гидрофильных поверхностях с помощью собственных липополисахаридов. Жирные кислоты (экзогенные в микроокружении бактерий) могут дополнительно использоваться лактобациллами для адгезии на мукоиды, что приводит к пробиотическому эффекту. Полисахаридные адгезины вносят решающий вклад в коаггуляционную сборку биопленок и процесс колонизации тканей. Бифидобактерии используют белково-полисахаридные комплексы для агрегации клеток в дискретные микроколонии и образования мицелиальных колоний, а также кислые и бактериоциноподобные наборы лектинов и лектиноподобных веществ. Пилевые и непилевые адгезины микробных компонентов консорциума взаимодействуют практически со всеми компонентами внеклеточного матрикса хозяина. Таким образом,



у лактобацилл в адгезии преимущественно участвуют белки, а у бифидобактерий и стрептококков – полисахариды.

*Наиболее часто в составе препаратов, содержащих штаммы пробиотиков, используют: Lactobacillus (acidophilus, paracasei, plantarum, reuteri, rhamnosus); Bifidobacterium (breve, adolescentis, bifidum, infantis, lactis, longum); Enterococcus (faecium, faecalis); Pediococcus (acidilactici); Saccharomyces (boulardii) и ряд других.*

**Бифидобактерии** – грамположительные полиморфные палочки с раздвоением на одном или двух концах, неспорообразующие, каталазонегативные, в большинстве случаев строгие анаэробы, отличаются высоким процентным содержанием GC-пар, принадлежат к классу *Actinobacteria*. Бифидобактерии составляют существенную часть облигатной микрофлоры кишечника здорового человека.

Оптимальная температура роста бифидобактерий 37–38 °С, pH – 7,2–7,4. Ферментируют лактозу с образованием уксусной и молочной кислот, не ферментируют арабинозу, ксилозу, маннозу, целлобиозу, манит, сорбит, инулин.

Кислотообразующая активность:

✓ на печеночной среде Блаурокка: к 24 часам – 70 °Т (Тернера), к 72 часам – 90–100 °Т;

✓ на гидролизатно-молочной среде: к 24 часам – 100 °Т, к 72 часам – 200 °Т.

Обладают газообразующей активностью. Желатин не разжижают. Проявляют антагонистическую активность по отношению к шигеллам Зоне, Флекснера, энтеропатогенным кишечным палочкам, стафилококкам и другим патогенным микроорганизмам.

За счет продуцируемых бифидобактериями при сбраживании углеводов, молочной и уксусной кислот, вырабатываемых ими бактериоциноподобных белковых субстанций, способности конкурировать с другими микроорганизмами за питательные субстраты и сайты прикрепления на кишечном эпителии эти бактерии обладают высокой антагонистической активностью в отношении патогенной и условно-патогенной микрофлоры, что препятствует их проникновению в верхние отделы желудочно-кишечного тракта, а также запрещают их транслокацию из просвета кишечника во внутренние органы. Молочная и уксусная кислоты, продуцируемые бифидобактериями, способ-

ствуют усилению процессов всасывания в стенке кишечника ионов кальция, железа, витамина D. Эти бактерии синтезируют аминокислоты, витамины группы К, тиамин, рибофлавин, никотиновую, пантотеновую, фолиевые кислоты, пиридоксин и цианокобаламин, которые всасываются в кишечнике, участвуют в расщеплении солей желчных кислот, оказывают выраженное иммуностимулирующее действие на систему местного иммунитета кишечника. Экспериментально показано, что бифидобактерии обладают способностью ингибировать процессы канцерогенеза в кишечнике, печени и молочных железах, индуцированные мутагенами пищевого происхождения. С помощью молекулярно-генетических методов провели классификацию рода *Bifidobacterium* – обнаружено 32 вида. В составе препаратов пробиотиков могут использоваться виды: *B.longum*, *B.infantis*, *B.bifidum* и др.

**Промоторы бифидобактерий.** При рассмотрении биотехнологических процессов производства препаратов пробиотиков, в частности бифидобактерий, нельзя не остановиться на промоторах этих микроорганизмов. В кишечнике животных и человека, особенно в его нижних отделах, микроорганизмы находятся в условиях дефицита питательных веществ, поэтому правильным подбором пищи можно регулировать развитие микрофлоры. *Промоторами бифидобактерий могут быть те компоненты пищи, которые не всасываются из кишечника в кровь* и поэтому проникают в нижние отделы кишечника и потребляются преимущественно бифидобактериями, оставаясь малодоступными для других видов микроорганизмов. Углеводные промоторы выполняют двойную функцию: во-первых, они служат источником энергии для бифидобактерий; во-вторых, они сбраживаются до уксусной, молочной и других кислот, что ведет к снижению величины pH внутри кишечника, т.е. созданию неблагоприятных условий для развития других родов бактерий, а сами кислоты и другие метаболиты подавляют развитие гнилостной микрофлоры. *К числу наиболее известных промоторов бифидобактерий относится лактулоза.* Её получают из лактозы, в которой при нагревании остаток глюкозы подвергается изомеризации во фруктозу. В отличие от лактозы лактулоза совсем не расщепляется ферментами человека и не всасывается в его кишечнике. Лактулоза может использоваться самостоятельно в качестве промотора, но также и в смеси с препаратами бифидобактерий для пролонгирования их действия. Показана возможность снизить или полностью устра-

нить поступление аммиака в кровь из кишечника благодаря препаратам лактулозы. Лактулоза, производя коррекцию микрофлоры в кишечнике человека, приводит к подавлению тех её видов, которые продуцируют аммиак. В качестве промотора бифидобактерий известна также изомальтулоза, получаемая биотехнологическим способом из крахмала. Процесс получения изомальтулозы осуществляется одновременным действием, по крайней мере, трех ферментов: альфа-амилазы, пуллулазы и альфа-глюкозидазы. Первые два фермента расщепляют крахмал преимущественно до мальтоолигосахаридов, последний трансформирует их в изомальтосахариды. Обнаружена селективность действия на бифидобактерии промоторов – трансгалактозилированных олигосахаридов. Они стимулируют практически все штаммы этих микроорганизмов. Трансгалактозилированные олигосахариды получают путем обработки лактозы бета-галактозидазой. При этом может образовываться до 20 олигосахаридов, причем их количество и типы образовавшихся гликозидных связей зависят от источника фермента. Олигосахариды являются промежуточными продуктами реакции, что предусматривает остановку ферментативного процесса на какой-то промежуточной, оптимальной для синтеза стадии. Для этого реакцию доводят до оптимальной степени конверсии лактозы регулированием режима потока через колонку с иммобилизованным ферментом бета-галактозидозой *Aspergillus oryzae*, далее конверсию продолжают с помощью другого биокатализатора – бета-галактозидазы *Streptococcus thermophilus*, способной гидролизовать лактозу, не гидролизуя трансгалактозилированные олигосахариды.

Сегодня широко используют препараты пробиотиков на основе штаммов бифидобактерий видов *B.bifidum*, *B.ongum*, *B.breve*, *B.adolescentis*, *B.infantis*. Различные штаммы бифидобактерий входят в высокоэффективные препараты пробиотиков.

**Лактобациллы** относятся к семейству *Lactobacillaceae Lactobacillus*. Сегодня выделено и охарактеризовано 96 штаммов лактобактерий. В составе препаратов пробиотиков используют штаммы: *L.acidophilus*, *L.plantarum*, *L.fermentum*, *L.casei* и др. В Украине в составе препаратов пробиотиков используют лактобациллы штамма 8P-A3 *Plantarum*, представляющего собой неподвижные грамположительные палочки длиной от 0,7 до 3,0 мкм. Жгутиков не имеют, капсул и спор не образуют. Штамм лактобацилл – факультативный анаэроб.

Штамм *L.plantarum* 8P-A3 ферментирует глюкозу с образованием кислоты без газа; разлагает целобиозу, галактозу, сахарозу; слабо ферментирует сорбит, мальтозу, манит, лактозу. Рамнозу не ферментирует. Оптимальная температура роста ( $37 \pm 1$ ) °C.

Механизм действия пробиотиков на основе лактобактерий можно представить следующим образом:

1. Лактобактерии, попавшие в организм в составе пробиотического препарата, адгезируют к эпителиоцитам кишечника и создают дополнительный барьер на их поверхности, препятствующий транслокации патогенной и условно-патогенной микрофлоры кишечника во внутреннюю среду организма.

2. Лактобактерии, попавшие в организм, начинают активное размножение в просвете толстого кишечника. При этом накапливающиеся в среде культивирования бактериоцины, металлопротеиназы, специфические адгезины блокируют и дезинтегрируют условно-патогенную и патогенную микрофлору, защищая организм от их проникновения. Показано, что *L.fermentum* штамма RC-14 сбрасывает молочную кислоту, перекиси, ферменты, а также поверхностные адгезины, блокирующие фиксацию *S.dublin* на кишечном эпителии. Одновременно на *L.johnsoni* штамма La-1 показано, что попадающий в среду культивирования адгезин, защищающий эпителиальные клетки линии Сасо-2 от фиксации на них *Listeria monocytogenes*, *E.coli* и отдельных видов рода *Salmonella*, представляет собой белково-липотейховый комплекс. Аналогичный комплекс обнаруживается и в культуральной жидкости и других лактобацилл, например, *L.fermentum*.

Сегодня различные штаммы лактобацилл входят в хорошо зарекомендовавшие себя препараты пробиотиков.

**Аэрококки** являются весьма перспективными штаммами для производства пробиотиков. В состав одного из оригинальных пробиотических препаратов входит штамм, выделенный из грудного молока – *Aerococcus viridans* 167, относящийся к роду *Aerococcus*. Штамм представляет собой грампозитивные полиморфные кокки, расположенные попарно, скоплениями, реже поодиночно, неподвижные. Спор и капсул не образуют. Оптимальная температура роста составляет ( $36 \pm 1$ ) °C. Штамм не сворачивает молоко, желатин не разжижает, сахарозу и мальтозу не ферментирует. Продуцирует перекись. На основе аэрококков хорошо известен препарат А-Бактерин.

***E. Coli.*** В состав ряда препаратов входят бактерии *рода E. Coli*, в частности, штамм *E. Coli* M17. Штамм представляет собой грамтрицательную палочку длиной 1,5–4 мкм, шириной 0,3–0,8 мкм, со слегка закругленными концами. Галактозу, лактозу, манит, глюкозу ферментирует с образованием кислоты и газа. Штамм *E. Coli* M17, в отличие от других штаммов *E. Coli*, ферментирует сахарозу, что используется как отличительный признак штамма при определении степени приживления его в кишечнике. Штамм является гетеротрофным факультативным аэробом, в условиях аэрации активно дезаминирует аминокислоты и способен к переключению брожения на дыхание с активацией энергообеспечения культуры. Оптимальная температура роста ( $37 \pm 1$ ) °С. В медицинской практике известны такие препараты пробиотиков (на основе штаммов *E. Coli*) как Бификол, Колибактерин.

***Bacillus.*** Перспективным направлением разработки новых биопрепаратов является использование бактерий *рода Bacillus*. Эти бактерии благодаря высоким адаптационным возможностям, широко распространены в природе, в частности, в тех объектах, с которыми человек контактирует наиболее часто (пищевые продукты, вода, воздух и др.). Благодаря этому бациллы постоянно и в значительных количествах поступают в организм человека, и поскольку являются стойкими к литическим и пищеварительным ферментам, сохраняют свою жизнеспособность на всем протяжении желудочно-кишечного тракта. Таким образом, аэробные спорообразующие бактерии *рода Bacillus* являются одним из важнейших компонентов экзогенной микрофлоры человека. Среди других представителей экзогенной микрофлоры бациллы обладают рядом преимуществ, позволяющих их использовать для создания биопрепаратов, а именно:

- ✓ бациллы (кроме *B.anthraxis* и *B.cereus*) безвредны для организма человека и животных;
- ✓ ряд штаммов обладают высокой антагонистической активностью;
- ✓ характеризуются высокой ферментативной активностью в процессах пищеварения;
- ✓ стабильны при хранении;
- ✓ экологически безвредны.

Способность спорообразующих бактерий оказывать пробиотическое действие привело к разработке на их основе препаратов, отнесенных к поколению «самоэлиминирующихся антагонистов». Сегодня в мире создано бо-

лее 50 лечебных препаратов, которые полностью или частично составлены на основе бацилл. Биопрепараты на основе бактерий *рода Bacillus* – Биоспорин (Украина, Россия); Споробактерин (Россия), Бактиспорин (Россия), Энтергермин (Италия) – *B.subtilis*; Бактисубтил (Франция) – *B.cereus* IP 5832; Лакбон (Япония) – *B.coagulans*; Флора-баланс (США) – *Brevibacillus laterosporus*, Натурис (США) – из 42 штаммов в том числе: *B.polymyxa*, *B.subtillis*, *B.pumulis*, *Br.laterosporus*.

### 3.2. Биотехнологические методы получения препаратов пробиотиков и методы испытаний

При культивировании штаммов пробиотиков необходимо создавать условия максимально приближенные к природным.

Одной из важнейших задач промышленности является обеспечение практического здравоохранения высокоэффективными и доступными пробиотическими препаратами. Организация массового производства пробиотиков в виде порошков, таблеток, капсул, суппозиториев, лиофильно высушенной массы или жидких суспензий *требует решения ряда технологических вопросов:*

- ✓ сохранение адгезивных свойств штаммов;
- ✓ подбор штаммов устойчивых к антибиотикам;
- ✓ подбор оптимального состава штаммов, дополняющих друг друга и

обеспечивающих максимальную биологическую активность препарата, высокую выживаемость микроорганизмов и их антагонистическую активность в отношении патогенной микрофлоры.

**Фруктоолигосахариды (ФОС)** – это короткоцепочные полисахариды, которые являются необходимым питательным субстратом (источником углерода), улучшают рост сапрофитной микрофлоры, подавляя рост патогенных микроорганизмов. Кроме того, ФОС улучшают синтез жирных кислот с короткой цепочкой, нормализуют функцию печени, снижают уровень холестерина в плазме, улучшают элиминацию токсических соединений. Рекомендуемая доза очищенных ФОС – 2000–3000 мг в сутки. Естественными пищевыми источниками ФОС являются иерусалимский артишок, репчатый лук, чеснок и спаржа. Однако рассчитанное количество ФОС, потребляемое с этими источниками составляет около 800 мг. Таким образом, обогащение продук-

тов питания, БАД фруктоолигосахаридами могут восполнить требуемое количество.

*Лактулоза* (способствует размножению нормальной микрофлоры кишечника) – полусинтетический дисахарид, состоящий из галактозы и фруктозы, который не расщепляется в кишечнике, поскольку у человека отсутствует лактулаза – фермент, необходимый для расщепления лактулозы, и в неизменном виде достигает поперечно-ободочной кишки.

Продукты с пробиотиками способствуют расщеплению лактулозы в кишечнике с образованием основных метаболитов: низкомолекулярных жирных кислот (молочной, уксусной, масляной и пропионовой), водорода, диоксида углерода. Результатом этого является сдвиг pH кишечного содержимого в кислую сторону и усиление перистальтики. Кроме того, лактулоза, расщепляясь в толстой кишке, высвобождает ионы водорода, связывает аммиак, уменьшает образование токсических азотсодержащих веществ в проксимальном отделе толстого кишечника и их абсорбцию, увеличивает диффузию аммиака из крови в кишечник и соответственно его выведение из организма. В качестве примера можно привести работу о изучении действия лактулозы на модели острого токсического гепатита и острой гипераммониемии, вызванных подкожным введением крысам 50 % масляного раствора тетрахлорметана (CCl<sub>4</sub>). Лактулозу вводили внутривентрикулярно 1 раз в день в течение 14 дней в дозе 1 грамм на килограмм массы. Лактулоза проявляет выраженные фармакотерапевтические эффекты: обладает значительной аммиакнейтрализующей и антиэндотоксической активностью, снижая в крови концентрацию свободного аммиака в 1,84 раза и уменьшает уровень бактериальных эндотоксинов в 7 раз по сравнению с нелеченым патологическим контролем. Эффект лактулозы может быть связан существенным улучшением микроэкологии кишечника.

Для выращивания смешанных культур для бифидобактерий необходима полидекстроза и олигоалгинаты. Для смешанных культур лактобацилл с бифидобактериями важной является устойчивость бифидобактерий к кислым условиям в культуре. Фруктоолигосахаридами, инулин и маннитол предпочтительны для продукции лактобациллами молочной, бутиловой или муравьиной кислот соответственно. Бычий лактоферрин является потенциальным стимулятором роста смешанных культур лактобацилл и бифидобактерий, а трансферриновые белки теплокровных избирательно стимулируют рост

*B.bifidum*, *B.infantis*, *B.breve*, но не *B.longum*. Трансглутаминазы актиномицетов в аэробных условиях до 12 раз увеличивают биомассу пробиотических лактококков. Олигосахаридами из-за бета-глюканов высокой вязкости являются стимуляторами роста лактобацилл в тонкой кишке. Имеются данные об эффективности добавления в среды избирательного выращивания лактобацилл стерилизованных путем фильтрования овощных соков и экстрактов чеснока, обладающих фунгицидным действием. Повышение оксидантного потенциала пробиотика значительно увеличивает выживаемость лактобацилл в кишечнике, фунгицидные свойства лактобацилл и устойчивость к стрессу. Существует предположение, что пробиотический штамм с высоким оксидантным потенциалом будет защищать и весь консорциум от резких сдвигов метаболизма в организме хозяина, например, лактобациллярный или лактобациллярно-бифидобактериальный консорциум.

Приобретение микроорганизмом капсулы (обычно полисахаридной, реже муцинового типа или полиаминокислотной желированной) приводит не только к маскированию клеточного аппарата, но и резкому снижению клеточной гидрофобности и потере способности к адгезии.

Гарантией высокого качества препаратов, содержащих пробиотики, является технология их производства, соответствующая требованиям, предъявляемым к производству биотехнологических продуктов.

#### ***Технология получения препаратов, содержащих бифидобактерии.***

Производство препаратов пробиотиков состоит из следующих операций:

1. *Подготовка производственных помещений, персонала, оборудования, инвентаря и первичной упаковки.*
2. *Получение питательных сред, растворов, криопротекторов.*

Для культивирования бифидобактерий, как и для выращивания других штаммов пробиотиков, используются различные питательные среды, к конструированию которых предъявляют следующие требования:

- ✓ предварительный выбор питательных субстратов с учетом критериев биологической ценности, доступности и экономичности;
- ✓ балансировка питательных сред;
- ✓ получение питательных основ и оценка их эффективности на модели регламентированных питательных сред;

✓ разработка и оценка способов получения питательных основ с учетом критерия технологичности и трудоемкости.

Для культивирования бифидобактерий будут использованы две среды: среда Блаурокка и казеиново-дрожжевая среда.

**Среда Блаурокка.** Для изготовления питательной среды используют экстракт говяжьей печени, полученный путем экстракции печени очищенной водой (при соотношении 1 : 1) с последующим кипячением в течение одного часа и стерилизацией при температуре  $(120 \pm 1)$  °С в течение 20 минут при давлении 0,1 МПа. К экстракту печени прибавляют пептон (1,0 %), натрия хлорид (0,5 %), лактозу (1,0 %), агар-агар (0,2 %), цистеин (0,01 %); устанавливают рН таким образом, чтобы после стерилизации значение рН составляло  $(6,8 \pm 0,3)$ ; кипятят, фильтруют и стерилизуют при 112 °С 30 минут при давлении 0,05 МПа. Среду хранят при температуре  $(6 \pm 2)$  °С не более 2-х месяцев.

**Казеиново-дрожжевая среда.** Выбор казеиново-дрожжевой среды, прежде всего, связан с тем, что эта среда в значительной степени отвечает требованиям массового производства по совокупности биологических, технологических и экономических параметров. Для изготовления казеиново-дрожжевой среды необходимы ферментативный гидролизат казеина и аутолизат пекарских дрожжей.

*Гидролизата казеина* получают путем проведения ферментативного гидролиза казеина поджелудочной железой при рН 8,0–8,2 и температуре  $(58–62)$  °С в течение 5–7 суток. В течение всего указанного срока значение рН поддерживается на указанном уровне. Начиная с 4-го дня, проводят определение аминного азота. Прекращение его нарастания свидетельствует о том, что процесс ферментативного гидролиза окончен. Содержание аминного азота в гидролизате казеина должно быть от 450 до 600 мг %. Прозрачную надосадочную жидкость отделяют и подвергают фильтрации. Гидролизат казеина подвергают стерилизации при температуре  $(120 \pm 1)$  °С в течение 30 минут и давлении 0,11 МПа. Хранят гидролизат при температуре 2–10 °С.

*Приготовление аутолизата пекарских дрожжей* проводят путем лизирования дрожжевых клеток при температуре 56–58 °С в течение 48 часов. К дрожжам прибавляют воду (в соотношении 1 : 4) и смесь стерилизуют при температуре 119–121 °С и давлении 0,11 МПа в течение 30 минут. Содержа-

ние аминного азота в аутолизате составляет 150–180 мг %. Хранят при температуре 4–10 °С не более 1,5 месяцев.

*Приготовление казеиново-дрожжевой среды:* ферментативный гидролизат казеина, разведенный очищенной водой до содержания аминного азота  $(150 \pm 10)$  мг % смешивают с дрожжевым аутолизатом (соотношение 1 : 2); прибавляют натрия хлорид (0,5 %); устанавливают рН таким образом, чтобы после стерилизации значение рН составляло  $(7,0 \pm 0,2)$ ; кипятят, добавляют лактозу, агар-агар и цистеин. Смесь фильтруют и стерилизуют при температуре 119–121 °С и давлении 0,11 МПа в течение 30 минут.

### 3. Получение инокулята бифидобактерий.

Флакон или ампулу с лифилизированным штаммом бифидобактерий вскрывают в асептических условиях, вносят 2–5 мл среды Блаурокка. Растворяют содержимое флакона и осуществляют пересев на 2 пробирки, содержащие среду Блаурокка. Посевы инкубируют в термостате при температуре  $(38 \pm 0,5)$  °С в течение 24–48 часов.

На всех этапах производственного процесса проводят контроль стерильности материала, используя питательные среды для контроля бактерий и грибов.

Выросшую культуру бифидобактерий из пробирок пересевают в бутылки, содержащие 500–550 мл среды Блаурокка. Посевы второй генерации инкубируют при температуре  $(38 \pm 0,5)$  °С в течение 20–24 часов. Далее, убедившись в чистоте культуры, производят пересев бифидобактерий из бутылок в биореактор, содержащий 9,0–9,5 л среды Блаурокка. Посевы инкубируют при температуре  $(38 \pm 0,5)$  °С в течение 24–48 часов. Внешний вид выросшей культуры – рыхлый зернистый осадок. При микроскопии мазков, окрашенных по Грамму, видны характерные микробные клетки в виде беспорядочных скоплений.

По окончании контроля маточную культуру используют для производственного посева и получения жидкого полуфабриката бифидобактерий.

### 4. Получение жидкого полуфабриката бифидобактерий.

Производственную культуру выращивают методом глубинного культивирования в реакторах. Реакторы должны быть оснащены паровой рубашкой. В реакторе производят стерилизацию питательной среды. Биореактор оборуду-

дован устройствами для измерения и регулирования температуры, pH среды, концентрации растворенного кислорода в культуральной жидкости. Кроме этого, биореактор обязательно должен быть снабжен специальными опциями для подачи питательной среды и углеводов, введения инокулята, подачи растворов, например, раствора аммиака и пробоотборника. Производственный посев осуществляется в реакторе (материал для изготовления – высококачественная сталь 316 L), объем которого варьирует у разных производителей от 50 литров до 500 литров. Для перемешивания культивируемой биомассы реактор должен быть обязательно снабжен механической мешалкой со скоростью вращения 200–1000 об/мин. Тщательное перемешивание культуры необходимо, во-первых, для равномерной доставки питательных веществ к клеткам и, во-вторых, для предотвращения накопления токсических продуктов метаболизма в каком-нибудь одном отсеке реактора. Кроме того, реактор должен быть обеспечен опцией, позволяющей производить разлив препарата во флаконы или специальные контейнеры для проведения последующей лиофилизации.

В асептических условиях в реактор, содержащий 50 литров казеиново-дрожжевой среды, переносят 10 литров микробной взвеси (20 % от объема среды). В реактор со смесью питательной среды и инокулята прибавляют 8–9 литров 40 % стерильного раствора лактозы. Выращивание биомассы бифидобактерий в реакторе проводят при температуре ( $38 \pm 0,5$ ) °С в течение 72 часов при периодическом перемешивании. В процессе культивирования проводят корректировку величины pH при помощи 10 % раствора аммиака до значения pH ( $6,6 \pm 0,5$ ). Стабилизация величины pH указывает на прекращение роста бактерий.

Производят добавление к жидкому полуфабрикату бифидобактерий криопротекторов. В реактор последовательно добавляют защитную среду (сахарозно (от 5 до 10 %) – желатиновую (до 3 %)), обезжиренное молоко (от 5 до 10 %), раствор лактозы (от 5 до 7 %) и др. Содержимое реактора перемешивают и проводят взятие образца для проверки подлинности и чистоты культуры.

В контрольной пробе после добавления среды высушивания определяют:

- стерильность – отсутствие посторонней микрофлоры (бактерий и грибов);
- количество живых бифидобактерий – в одной дозе препарата должно содержаться не менее  $10^7$  живых бактерий;
- активность кислотообразования – одна доза препарата бифидобактерий должна образовывать кислоту не ниже 90 °Т;
- микроскопическое исследование – в мазках окрашенных по Граму должны быть типичные неподвижные грамположительные полиморфные палочки с бифуркациями на одном или двух концах, длиной 4–5 мкм.

##### 5. *Разлив жидкого полуфабриката бифидобактерий.*

Способ заполнения флаконов шприцевой. Разлив препарата идет при непрерывном перемешивании. В процессе разлива производится контроль на наличие посторонней микрофлоры. При получении сухой субстанции бифидобактерий для получения капсул, суппозитория или других форм препаратов бифидобактерий, полуфабрикат разливают в контейнеры, которые также как и флаконы передают на лиофилизацию.

##### 6. *Лиофилизация и герметизация препарата.*

Кассеты с флаконами и контейнеры с препаратом загружают в аппарат для лиофилизации и доводят температуру продукта до минус 50–60 °С. Замораживают препарат в течение 48 часов при указанной температуре. При этом существенное значение имеет количество клеток в бактериальной суспензии, её эвтектические параметры, а также характер температур воздействия при замораживании и обезвоживании. Время и режим высушивания определяется в зависимости от марки сублимационного оборудования, толщины слоя биомассы, используемых криопротекторов и других факторов. Полученный после лиофилизации препарат подвергают герметизации. Хранение препаратов бифидобактерий проводят при температуре 2–8 °С.

##### 7. *Маркировка и упаковка препарата.*

##### 8. *Контроль качества готового препарата.*

На рис. 12 приведена схема получения различных форм препаратов, содержащих живые бифидобактерии.

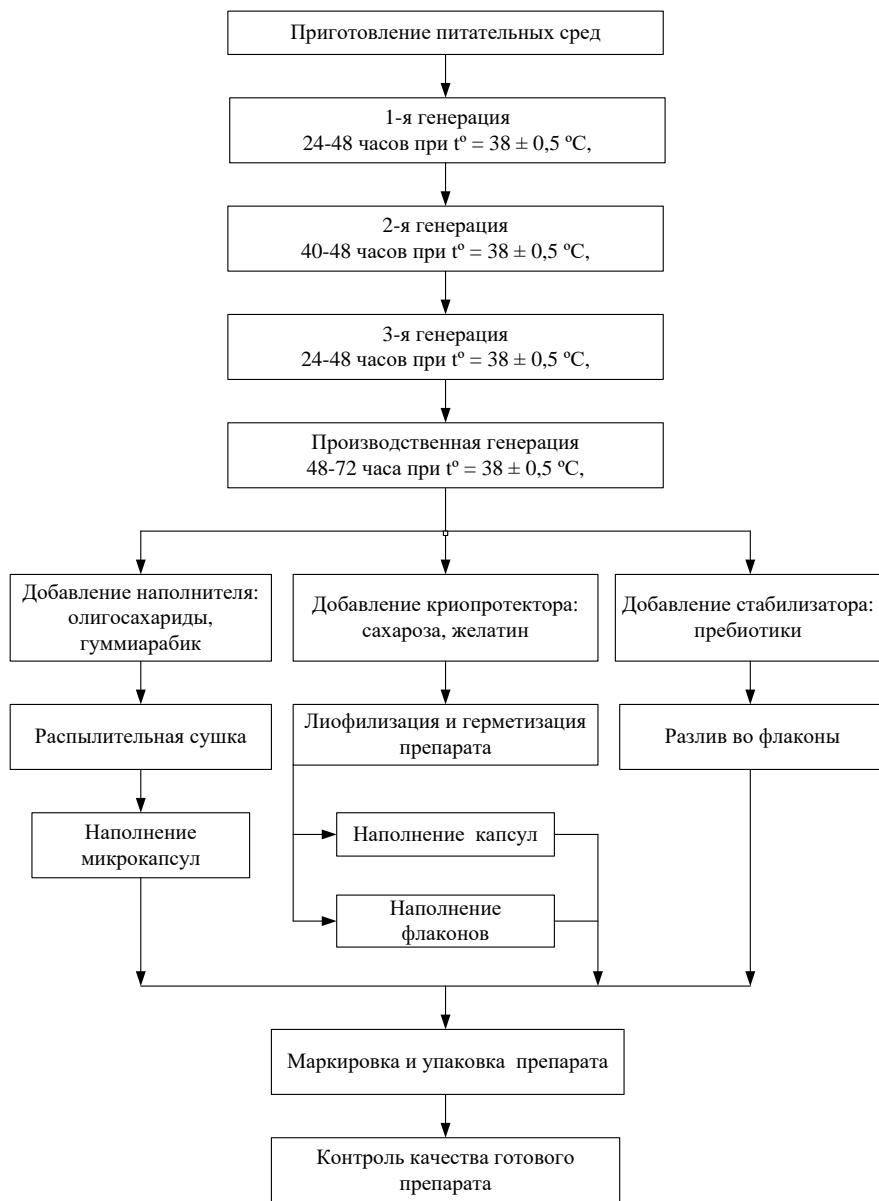


Рисунок 12 – Схема получения различных форм препаратов, содержащих живые бифидобактерии

**Испытания лиофилизированного препарата бифидобактерий** проводят, используя следующие тесты:

1. *Описание* – кристаллическая или пористая масса различных оттенков бежевого или бело-серого цвета.

2. *Растворимость* – при растворении в 0,9 % растворе натрия хлорида из расчета 1 мл на одну дозу препарат должен раствориться в течение 5 минут с образованием непрозрачной гомогенной суспензии.

3. *pH* –  $6,0 \pm 0,5$ .

4. *Потеря в массе при высушивании* – не более 3,5 %.

5. *Микробиологическая чистота* – при микроскопии мазков, окрашенных по Граму должны обнаруживаться грампозитивные полиморфные палочки с бифуркацией на одном или двух концах. При посеве на средах не должен обнаруживаться рост грибов и бактерий.

6. *Аномальная токсичность* – контроль проводят пероральным введением белым мышам 1 дозы препарата.

7. *Количество живых бифидобактерий в одной дозе* – в одной дозе препарата не менее  $10^7$  живых бифидобактерий.

8. *Активность кислотообразования бактерий* – не менее  $90^\circ\text{T}$ .

Необходимо отметить, что большинство препаратов, содержащих пробиотики, производят по аналогичной технологической схеме (см. рис. 12) с учетом определенных изменений: может варьироваться состав сред и условия культивирования, время и температура выращивания, состав криопротекторов и ряд других факторов. Методы контроля могут быть различны, но определяемые показатели достаточно близки. Мы считаем целесообразным привести несколько методов контроля препаратов пробиотиков, характеризующих специфическую активность препаратов: количество живых бактерий, активность кислотообразования и антагонистическую активность штаммов продуцентов. Приводим **методы контроля ряда выпускаемых в Украине пробиотических препаратов**, например, бифидобактерий, лактобактерий и аэрококков.

1. *Количество живых лактобактерий в одной дозе.*

Для определения количества живых лактобактерий в одной дозе препарата содержимое каждого флакона растворяют раствором 0,9 % натрия хло-

рида из расчета 1мл на 1 дозу. Полученную суспензию лактобактерий в объеме 1 мл переносят в пробирку с 9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, тщательно перемешивают, получая 1 дозу лактобактерий в 10 мл суспензии. Из этой пробирки получают последующие десятикратные разведения от  $10^{-1}$  до  $10^{-9}$ . Из полученных разведений  $10^{-6}$  и  $10^{-7}$  высевают по 0,1 мл микробной суспензии на две чашки Петри со средой МРС-4. Биомассу втирают шпателем в питательную среду. После инкубирования при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение  $(44 \pm 4)$  часов производят подсчет колоний живых лактобактерий. Проводят подсчет колоний для каждого разведения и вычисляют среднее арифметическое.

Пример расчета:  $(60 \times 10^7 + 600 \times 10^6) : 2 \times 10 = 5,3$  млрд (10 – учет степени разведения, т.к. высевали на чашку 0,1 мл). В одной дозе препарата должно быть не менее 4-х миллиардов живых лактобактерий.

#### 2. Количество живых бифидобактерий в одной дозе.

Для определения количества живых бифидобактерий в одной дозе препарата содержимое каждого флакона растворяют раствором 0,9 % натрия хлорида из расчета 1мл на 1 дозу. Полученную суспензию бифидобактерий в объеме 1 мл переносят в пробирку с 9 мл среды Блаурокка, тщательно перемешивают, получая 1 дозу бифидобактерий в 10 мл среды. Из этой пробирки получают последующие десятикратные разведения от  $10^{-1}$  до  $10^{-9}$ . Указанные пробирки инкубируют при температуре  $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 2–4 дней в зависимости от используемого штамма бифидобактерий. После окончания инкубации определяют разведение, в котором наблюдается рост колоний бифидобактерий в виде «зерен», «гвоздиков» и др. Препарат считается соответствующим, если рост бифидобактерий в серии десятикратных разведений определяется не менее чем в пробирке с разведением  $10^{-7}$ , что соответствует содержанию  $10^7$  живых бифидобактерий в одной дозе.

#### 3. Определение активности кислотообразования бактерий.

Определение проводят титрометрическим методом при выращивании бактерий в соответствующих питательных средах. К высушенному препарату пробиотика прибавляют культуральную среду (среду МРС-1 для лактобактерий или среду Блаурокка для бифидобактерий) из расчета 1 мл среды на одну дозу препарата.

Для лактобактерий: в 2-е пробирки с 25 мл среды МРС-1 вносят по 2,5 мл суспензии препарата. Смесь перемешивают и инкубируют в течение 48 часов при температуре  $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ . После окончания инкубирования определяют кислотность в каждой пробирке путем титрования 10 мл образца 0,1 моль/л раствором натрия гидроксида в присутствии индикатора фенолфталеина до величины рН –  $(8,5 \pm 0,1)$ . Вычисляют средний показатель из двух определений.

Для бифидобактерий: в 2-е пробирки с 25 мл среды Блаурокка вносят по 2,5 мл суспензии препарата. Смесь перемешивают и инкубируют в течение 72 часов при температуре  $(38 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ . После окончания инкубирования определяют кислотность в каждой пробирке путем титрования 10 мл образца 0,1 моль/л раствором натрия гидроксида в присутствии индикатора фенолфталеина до величины рН –  $(8,5 \pm 0,1)$ . Вычисляют средний показатель из двух определений.

Кислотность в градусах Тернера ( $^\circ\text{T}$ ) определяют по формуле:

$$^\circ\text{T} = A \cdot k \cdot 10,$$

где А – количество мл раствора натрия гидроксида, израсходованное на титрование;

к – поправка к титру раствора натрия гидроксида.

Активность кислотообразования для лактобактерий – не менее 200  $^\circ\text{T}$ , для бифидобактерий – не менее 90  $^\circ\text{T}$ .

4. Определение антагонистической активности штаммов пробиотиков.

Для определения антагонистической активности препаратов пробиотиков используют соответствующие каждому препарату тест-штаммы. Тест-штаммы должны обладать типичными морфологическими, серологическими, ферментативными свойствами и вирулентностью. Наиболее часто при контроле препаратов используют тест-штаммы следующих микроорганизмов: *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* и ряд других.



Антагонистическую активность штаммов пробиотиков проводят против тест-штаммов. Одним из методов является метод перпендикулярных штрихов на питательной среде в чашках Петри. На дно чашки Петри приливают молочно-растительную среду № 5 и петлей по диаметру чашки наносят культуру пробиотика (в случае контроля бифидобактерий для создания анаэробных условий можно использовать штамм *B.seraceum marescens*, посеянный на мясо-пептонный агар, налитый в крышку чашки Петри). Чашки с образцами бифидобактерий инкубируют при температуре  $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 72 часов. Затем осуществляют посев тест-штаммов в направлении от зоны роста бифидобактерий, не касаясь культуры и перпендикулярно к ней. Чашки инкубируют в течение 24 часов при температуре  $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Через 24 часа проводят учет антагонистической активности, который учитывается по величине зоны отсутствия роста тест-штаммов. Для каждого штамма пробиотика и каждой культуры тест-штамма устанавливается зона отсутствия роста, выраженная в мм.

#### 5. Определение оксидазной активности аэрококков.

Оксидазная активность препаратов аэрококков определяется способностью бактерий в процессе роста окислять калия иодид до иода.

Лиофилизированный препарат разводят 0,9 % раствором натрия хлорида и проводят посев штрихом по диаметру чашки Петри, заполненной калия иодид-крахмальным мясо-пептонным агаром. Ширина штриха при посеве петлей должна быть 5–7 мм. После инкубирования посева при температуре  $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 48 часов поверхность питательной среды обрабатывается раствором серной кислоты. Через 30 минут проводят измерение диаметра зоны темно-синего цвета, появившейся около штриха растущих бактерий. Диаметр зоны должен быть не менее 25 мм.

В табл. 17 приведены характеристики готовых препаратов «Бифидумбактерина», «Лактобактерина», «Колибактерина», «Бификола», «А-Бактерина».

Таблица 17 – Характеристика готовых лекарственных форм препаратов, содержащих пробиотики

Показатели качества	Наименование препарата				
	«Бифидум-бактерин»	«Лакто-бактерин»	«Коли-бактерин»	«Бификол»	«А-Бактерин»
<b>Описание</b>	Кристаллическая или пористая масса желтоватого цвета				
<b>Растворимость</b>	При растворении в воде из расчета 1 мл на одну дозу должен растворяться в течение 3–5 минут с образованием гомогенной суспензии				
<b>pH</b>	6,0 ± 0,7	5,5 ± 0,7	–	–	5,75 ± 0,75
<b>Вода</b>	Препараты содержат не более 3,5 % воды				
<b>Микро-биологическая чистота</b>	Препараты не должны содержать посторонней микрофлоры				
<b>Специфическая активность:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ количество живых бактерий в одной дозе;</li> <li>▪ активность кислото-образования;</li> <li>▪ оксидазная активность</li> </ul>	>10 <sup>7</sup>  не ниже 90 °Т  –	>10 <sup>9</sup>  не ниже 200 °Т  –	>10 <sup>10</sup>  –  –	>10 <sup>8</sup>  –  –	>10 <sup>8</sup>  –  >25 мм

Производство ряда других препаратов пробиотиков из различных бактерий осуществляется по вышеприведенной схеме. Так, например, для производства «Биоспорина» использована общепринятая схема получения препаратов пробиотиков: получение инокулятов культур; получение нативной биомассы; добавление криопротекторов и получение жидкой формы препарата; разлив препарата и его лиофилизация; герметизация готового препарата и его контроль в соответствии с нормативной документацией. Необходимо отметить, что использование двух технологических схем при получении «Биоспорина»: выращивание бактериальных культур на агаризованных питательных средах и выращивание глубинным культивированием на жидких питательных средах продемонстрировало идентичные результаты при сравнении образцов, полученных по двум схемам производства.

### 3.3. Препараты, содержащие штаммы пробиотиков и форма их выпуска

Прежде, чем перейти к описанию конкретных препаратов, содержащих пробиотики, необходимо отметить, что все препараты можно классифицировать как:

✓ I поколение – монокомпонентные препараты, состоящие из одного штамма микроорганизмов – типичных обитателей кишечника (Бифидумбактерин, Лактобактерин, Колибактерин и др.);

✓ II поколение – самоэлиминирующие антагонисты (Бактисубтил – *B.cereus* IP 5832), Лакбон – *(B.coagulans)*, Флора-баланс – *(Brevibacillus 1)*, Энтерол – *(Saccharomyces boulardii)* и др.;

✓ III поколение – поликомпонентные препараты (симбиотики), состоящие из нескольких (от 2 до 30) штаммов бактерий (Бифилонг – 2 вида бифидобактерий *B.bifidum* и *B.longum*) или из нескольких видов бактерий (Линекс – *L.acidophilus*, *B.bifidum*, *Enterococcus faecalis*; Бификол – *E.coli* M-17, *B.bifidum* 1) и др.;

✓ IV поколение – комбинированные препараты (синбиотики), состоящие из штамма бактерий и ингредиентов, способствующих их росту, размножению и метаболической активности (Бифилиз – *B.bifidum* и лизоцим, Кипацид – *L.acidophilus* и комплексный иммуноглобулин, Биофлор – *E.coli* M-17, экстракты сои, овощей, прополиса) и др.;

✓ V поколение – поликомпонентные комбинированные препараты, состоящие из нескольких видов бактерий и ингредиентов, способствующих их росту, размножению и метаболической активности (Бифиформ – *B.longum*, *Enterococcus faecium* SF68) и др.

При конструировании лекарственной формы пробиотика необходимо учитывать форму его применения (оральную, энтеральную, ректальную, вагинальную, подкожную, накожную, на слизистую) и доставку в нужную зону организма (желудок, поджелудочная железа, тонкая, толстая или прямая кишка и др.), а также вид лекарственной формы (таблетки, капсулы, мази, спреи, суппозитории и др.). Конечный терапевтический эффект может быть усилен за счет количества клеток пробиотического штамма, выбор матрикса (носителя), увеличения реакционной площади контактной фазы локального и фазового депонирования. В качестве макроосновы препаратов целесообразно

использовать только биосовместимые, биodeградируемые, нетоксичные в процессе хранения материалы с крайне низкой иммуномодулирующей активностью. За последние годы наметился сдвиг в сторону создания аэрозольных препаратов, содержащих штаммы пробиотиков. На основе совершенствования технологических процессов активно внедряются в практику сорбированные пробиотики, в которых составляющие их основу бактериальные штаммы размещены на специальных субстанциях – сорбентах, способствующих транспортировке активного начала к месту назначения и усиливающих биологическую активность препаратов.

Необходимо отметить, что кроме традиционных форм выпуска пробиотиков на рынке появились микрокапсулы этих препаратов. Проводят выращивание, например, бифидо- или лактобактерий по известным схемам. Затем при температуре 8–16 °С проводят смешивание с наполнителем, в качестве которого используют гуммиарабик и олигосахариды. Дополнительно, в качестве наполнителя, можно вводить гидроксипатит и лактозу. Полученную суспензию подвергают высушиванию в распылительной сушке при температуре 60–80 °С. Получают препарат в виде микрокапсул размером от 30 до 50 мкм. Микрокапсулы помещают в жесткие желатиновые капсулы.

Гуммиарабик – смола акации Сенегал, натуральный полисахарид. Это натуральное растворимое в воде волокно, не усваиваемое верхними отделами желудочно-кишечного тракта человека, в кишечнике полностью ферментируется бактериями, является субстратом для ацидо- и бифидобактерий. В процессе ферментации гуммиарабик вырабатывает органические кислоты (короткоцепочечные жирные кислоты), которые окисляют содержимое толстой кишки. Снижение pH подавляет размножение гнилостных и патогенных бактерий. Помимо этого короткоцепочечные жирные кислоты обладают целым рядом других биологических эффектов, таких как стимуляция абсорбции воды и минералов, увеличение кишечной моторики или стимуляции механизма удаления поврежденных клеток. Стимулируя микробную сахаролитическую активность и окисляя содержимое ободочной кишки, гуммиарабик стимулирует процесс бактериальной детоксикации и снижает производство токсинов и веществ, являющихся потенциально канцерогенными. Гуммиарабик улучшает моторику желудочно-кишечного тракта человека за счет эффекта увеличения биомассы.

За последние годы *препараты пробиотиков* приобрели *новую форму выпуска – капсульную*. Применяются биосовместимые и биodeградируемые полисахаридные и другие полимеры для защитного инкапсулирования пробиотиков и их структурно-функциональных компонентов, а также в качестве носителя. При попадании в желудок кислотоустойчивых капсул сохраняются фармацевтические свойства бактерий, то есть капсулы способны защищать бактерии от влияния желудочного сока на протяжении 4 часов при кислых значениях pH. В 12-перстной кишке капсулы растворяются, бактерии регидратируются и начинают размножаться благодаря наличию в капсулах питательных веществ. Бактерии подавляют рост патогенных микроорганизмов за счет выработки антибактериальных субстанций, в том числе молочной, уксусной и других кислот.

Возможна естественная ковалентная иммобилизация пробиотиков на носителях с использованием собственных внутриклеточных поперечно-сшивающих метаболитов: оксиредуктаз, альдегидных и перекисных продуктов. Наиболее часто используются полимеры полимолочной кислоты, альгинатные гели, хитозаны и их комбинации с полимолочной кислотой. Получены сухие синбиотические микрокапсулярные (диаметр частиц 15–20 мкм) конструкции, защищающие штамм пробиотика в эмульсии и способные быстро высвободить бактерии в условиях желудочно-кишечного тракта. В качестве стабилизирующих компонентов при микрокапсулировании используют лактозу (от 17 до 24 %), пептон (0,6–0,7 %), обезжиренное молоко.

Как показано на рис. 13, получение микрокапсул с живыми бактериями пробиотиков можно продемонстрировать на примере производства капсул с альгинатом натрия по экструзионной и эмульсионной технологиям. Альгинатные полисахариды, полученные из морских водорослей, превращаются в гель в присутствии поливалентных катионов, например, кальция, и поэтому применяются для мягкой иммобилизации бактерий.

Использование двух методов получения микрокапсул, содержащих бактерии, имеет как положительные, так и отрицательные характеристики. Так, экструзионная технология – более трудоемкий процесс, но менее затратный, чем использование эмульсионного способа. Выживаемость бактерий в обоих случаях составляет 80–95 %. Размер частиц при получении путем экструзии – 2–5 мм, а эмульсионным способом составляет 25 мкм – 2 мм.

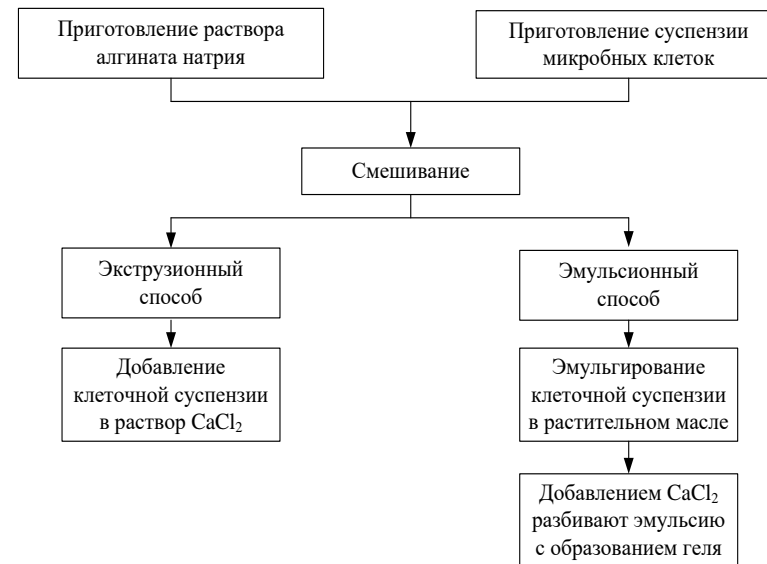


Рисунок 13 – Схема получения микрокапсул, содержащих штаммы пробиотиков

Необходимо остановиться еще на одной форме выпуска препаратов пробиотиков. Последнее время достаточно широко представлены *препараты пробиотиков*, в частности, лактобактерий и бифидобактерий *в жидком виде*. Данная форма бифидобактерий имеет ряд несомненных преимуществ: в более короткие сроки комплекс бактерий подавляет активность патогенной микрофлоры; препятствует проникновению в организм эндотоксинов, восстанавливая защитную биопленку на всех слизистых. Эффект связан прежде всего с тем, что бифидобактерии и лактобактерии попадают в организм человека в «нативном» состоянии и не подвергнуты изменениям в процессе технологической обработки, например, лиофильного высушивания. Бактерии пробиотиков при сушке значительно изменяют свою активность, находясь в состоянии анабиоза, и восстановление активности наступает только после 3–5 делений, попадая в благоприятную для размножения среду. Довольно часто бактерии просто не успевают это сделать, попав, будучи сухими, в кишечник, и выводятся с каловыми массами. Им требуется 8–10 часов для пе-

рехода к активному физиологическому состоянию, что не требуется при использовании жидких форм пробиотиков. К недостаткам таких препаратов можно отнести короткий срок хранения – от 40 до 90 суток.

Обычно при приеме бифидобактерий в сквашенном молоке они сохраняют жизнеспособность, проходя через желудок в кишечник, и определяются через 8 часов после приема в дистальных отделах подвздошной кишки в количестве, составляющем 34–37 % от общего количества бифидобактерий. Принятые перорально однократно бифидобактерии появляются в фекалиях на второй день, достигая стабильного уровня на третий день. При многократном приеме бифидобактерий их выделение с фекалиями увеличивается примерно в 30 раз. Примером жидкой формы препаратов, содержащих штаммы пробиотиков, может быть Нормофлорин–Д. В составе препарата – культуры лактобактерий (*Lactobacillus casei*) и бифидобактерий (*Bifidobacterium longum* и *Bifidobacterium bifidum*), пребиотик – лактит. Содержание живых пробиотических микроорганизмов составляет не менее  $10^8$ – $10^9$  КОЕ/мл.

Сегодня нельзя обойти вниманием ещё одно направление – *создание препаратов на основе бесклеточных компонентов пробиотиков*. Некоторые производители препаратов пробиотиков предусматривают очистку от среды культивирования и метаболитов, что позволяет устранить неприятные вкус и запах, присущий пробиотикам, а также значительно уменьшить риск аллергических реакций. Однако высокая концентрация биологически активных компонентов, в число которых входят бактериоцины, протеазы и т.д., позволяют рассматривать культуральную жидкость пробиотиков как перспективный материал для разработки на его основе лекарственных препаратов. Бесклеточные продукты на основе пробиотических бактерий можно оценивать как разновидность пробиотических препаратов. Бесклеточный микробный пробиотический продукт – новое поколение пробиотических препаратов на основе метаболитов и структур пробиотических штаммов и изолятов. Разрабатываются принципиально новые метаболиты для пробиотиков, например, при одновременном участии лактобацилл, бифидобактерий и хозяина человека. Является перспективным использование бацилл и лактобацилл для получения белков и мощных ферментных систем. При конструировании пробиотического препарата возможен выбор эффекторных доминант: либо уникальных полифункциональных природных компонентов (например, надмолекулярных, микро- и наночастичковых), либо более низкомолекулярных

химически или генно-инженерно синтезированных компонентов без побочных эффектов, а также их сочетание. К низкомолекулярным эффекторам относятся антимикробные, антиоксидантные и стимулирующие олигопептиды, летучие жирные кислоты, олигосахариды и пептидогликановые фрагменты. Монокультуры лактобацилл лучше продуцируют бактериоцины, чем в смешанной культуре. Летучие жирные кислоты сигнальной природы усиливают эмульгирование, диспергирование, растворение и усвоение пищи в желудочно-кишечном тракте, что важно при дисфункции желчного пузыря. Универсальная функция бифидобактериальных и лактобациллярных гидролаз солей желчи способствует выживанию пробиотиков в желудочно-кишечном тракте. Супернананты культуральных жидкостей лактобацилл могут использоваться как антиаллергенные, например, в составе лекарственных мазей и кремов. В смешанной культуре бацилл и гриба возможно образование антидиабетических олигосахаридов из бетаглюканов гриба. Хорошо известным препаратом, содержащим продукты метаболизма бактерий, является препарат Хилак-форте. Это комбинированный препарат, содержащий продукты жизнедеятельности молочнокислых бактерий, грамотрицательных и грамположительных симбионтов тонкого и толстого кишечника, а именно *Escherichia coli* DSM 4087, *Streptococcus faecalis* DSM 4086, *Lactobacillus acidophilus* DSM 4149, *Lactobacillus helveticus* DSM 4183. Продукты Хилак-форте оказывают благоприятное влияние на функцию слизистой оболочки кишечника и способствуют восстановлению нормальной микрофлоры кишечника. Жирные кислоты, содержащиеся в препарате, оказывают лечебно-профилактическое действие при инфекциях пищеварительного тракта, способствует всасыванию в кишечнике воды и электролитов.

Вместе с тем в последние годы *при применении пробиотиков* достаточно часто наблюдаются *негативные реакции*. Это выражается в снижении терапевтической активности при лечении больных, нестабильности результатов лечения, росте числа побочных эффектов, особенно в сенсibilизированном организме, поскольку гетерогенная микробная масса может оказывать значительную антигенную нагрузку на организм так же, как вещества, входящие в препарат. Помимо этого, имеют место сложности со стандартизацией этих препаратов, а также недостаточная их защищенность при приеме во внутрь от агрессивного воздействия защитных барьеров человека, в частности, содержимого желудка и 12-перстной кишки и даже самой кишечной

микрофлоры хозяина, видовой состав которой при болезни сильно изменен и проявляет агрессивность.

В настоящее время наметился поворот от использования пробиотиков преимущественно с профилактической целью к активному их использованию в лечении инфекций желудочно-кишечного тракта, аллергических заболеваний и вирусных инфекций.

В табл. 18 приведены наиболее часто применяемые препараты, содержащие штаммы пробиотиков.

Таблица 18 – Характеристика наиболее часто применяемых препаратов, содержащих штаммы пробиотиков

Наименование препарата	Общая характеристика
1	2
А-БАКТЕРИН	Представляет собой препарат, содержащий штамм <i>Aerococcus viridans</i> 167, выделенный из грудного женского молока. Препарат был предложен группой ученых Днепропетровского медицинского института. Хорошо зарекомендовал себя при применении в гинекологии для лечения вагинитов (восстанавливает нормальную микрофлору вагины в послеоперационном и послеродовом периодах), снимает воспалительные процессы различной этиологии. Применяют перорально для лечения кишечных инфекций, хронических колитов, коррекции микрофлоры кишечника, при дисбактериозах различной этиологии. Препарат является эффективным при лечении язвы желудка и 12-перстной кишки. Помимо антибактериального действия, пероральное применение препарата ведет к снижению уровня холестерина в крови и уровня свободных радикалов, нормализации функции печени, повышению уровня местного и гуморального иммунитета. Кроме того, А-Бактерин является единственным известным пробиотиком, который применяется наружно и используется для лечения острых гнойных раневых инфекций стафилококковой и стрептококковой этиологии, а также инфекций, вызванных условно-патогенными бактериями (протеем, эшерихиями). Препарат применяется для обработки ран в послеоперационном периоде. В отличие от известных пробиотиков, А-Бактерин воздействует на патогенную микрофлору за счет продуцирования <i>Aerococcus</i> перекиси водорода.

Продолжение таблицы 18

1	2
БИОСПОРИН	Содержит <i>B. Subtilis</i> 3 и <i>B. Licheniformis</i> 31 по $10^9$ живых микробных клеток каждой культуры в лиофильно-высушенной форме. Биоспорин содержит споры бактерий. Споры устойчивы к действию желудочного сока и их развитие в вегетативные формы бактерий происходит в кишечнике. Вегетативные формы бактерий высвобождают ферменты, которые расщепляют белки, углеводы, липиды. В результате этих процессов образуется кислая среда, препятствующая процессу гниения. При сочетании этих двух культур в составе препарата суммарная антагонистическая активность больше выражена к широкому спектру патогенных и условно-патогенных микроорганизмов – возбудителей желудочно-кишечных инфекций. Биоспорин обладает ярко выраженной антагонистической активностью к штаммам резистентным к антибиотикам, в том числе и к кампилобактерам, иерсениям, а также к грибам рода <i>Candida</i> . Исследования показали, что Биоспорин не подавляет микроорганизмы, представляющие нормальную микрофлору кишечника. При изучении Биоспорина на лабораторных животных, приматах (макаки-резус) и на людях установлена безвредность препарата. Введение препарата животным, даже в дозах значительно превышающие для применения человеком, не вызывает каких-либо патологических изменений, что доказано как при макроскопическом изучении, так и при гистологических исследованиях.
БИФИДУМБАКТЕРИН	Представляет собой лиофилизированную микробную массу живых бифидобактерий штаммов <i>Bifidobacterium bifidum</i> 1. 791, ЛВА-3 или других штаммов бифидобактерий. Одна доза препарата содержит не менее $10^7$ живых микроорганизмов. Высокий количественный уровень бифидобактерий и их преобладание в микробиоценозе нормализует деятельность желудочно-кишечного тракта, улучшает обменные процессы, предупреждает развитие затяжных форм кишечных заболеваний, повышает неспецифическую резистентность организма.
БИФИКОЛ	Представляет собой лиофильно-высушенную в среде культивирования микробную массу совместно выращенных антагонистически активных штаммов бифидобактерий ( <i>B. bifidum</i> 1) и кишечной палочки ( <i>E. coli</i> М-17).

Продолжение таблицы 18

1	2
БИФИФОРМ	<i>Bifidobacterium longum</i> и <i>Enterococcus faecium</i> – капсулы по 10 млн антибиотико-резистентных бактерий.
БИФИФОРМ – малыш	<i>Lactobacillus GG</i> и <i>Bifidobacterium lactis</i> – порошок по 10 <sup>9</sup> каждого вида.
КОЛИБАКТЕРИН	Представляет собой лиофилизированную в культуральной жидкости живую культуру. В одной дозе содержится 10 <sup>10</sup> живых клеток <i>E.Coli</i> М 17. <i>Лечебное действие обусловлено антагонистической активностью кишечной палочки в отношении патогенной и условно-патогенной микрофлоры</i> (шигеллы, сальмонеллы, протей и др.).
ЛАКТОБАКТЕРИН	Представляет собой лиофилизированную микробную массу живых лактобацилл штаммов: <i>L.acidophilus</i> , <i>L.plantarum</i> , <i>L.fermentum</i> , <i>L.casei</i> или других штаммов. Одна доза препарата содержит не менее 10 <sup>7</sup> живых бактерий. Высокий количественный уровень лактобактерий и их преобладание в микробиоценозе <i>нормализует деятельность желудочно-кишечного тракта, улучшает обменные процессы, предупреждает развитие затяжных форм кишечных заболеваний, повышает неспецифическую резистентность организма.</i>
ЛАКТОВИТ ФОРТЕ	Комбинированный препарат, в состав которого входят <i>Lactobacillus sporogenes</i> , <i>Vacillus coagulans</i> , фолиевая кислота и витамин В <sub>12</sub> . <i>Терапевтический эффект обусловлен наличием бактерий, продуцирующих молочную кислоту и обладающих антагонистической активностью в отношении патогенной и условно-патогенной микрофлоры.</i> Бактерии осуществляют ферментативное расщепление белков, жиров и углеводов (в том числе и при дефиците лактазы у детей) и способствуют процессам репарации слизистой оболочки кишечника. Фолиевая кислота (витамин В <sub>9</sub> ) необходима для нормального лейко- и эритропоэза, синтеза нуклеиновых и аминокислот, пуринов и пиримидинов. Витамин В <sub>12</sub> активизирует обмен углеводов, белков и липидов, стимулирует эритропоэз, нормализует функцию печени и нервной системы.
ЛАКТОКАПС	Представляет собой микробную массу живых, лиофилизированных в среде культивирования лактобактерий <i>L.plantarum</i> или <i>L.fermentum</i> . Препарат выпускается в твердых желатиновых капсулах и содержит в одной дозе 2 млрд живых бактерий.

Продолжение таблицы 18

1	2
ЛИНЕКС	Комбинированный препарат, содержащий 3 компонента естественной микрофлоры из разных отделов кишечника. Одна капсула содержит не менее чем. 10 <sup>7</sup> живых лиофилизированных бактерий <i>Lactobacillus acidophilus</i> (sp. <i>L.gasseri</i> ), <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , стойких к антибиотикам и химиотерапевтическим средствам, что позволяет принимать Линекс с антибиотиками и химиотерапевтическими средствами.
НАРИНЕ-БАЛАНС	Представляет собой ферментную вытяжку из живых биологически активных молочнокислых бактерий ( <i>Lactobacterium acidophilum</i> ) штамм 317/402. Бактерии выделяют ацидофилин, обладающий <i>высокой активностью против ряда патогенных микроорганизмов</i> (синегнойной палочки, золотистого стафилококка, сальмонеллы, клебсиелл и др.). Кроме того, <i>препарата приводит к усилению выработки в организме человека эндогенного альфа- и гамма-интерферонов.</i>
ЭНТЕРОЛ 250	Содержит дрожжи <i>Saccharomyces boulardii</i> . При прохождении через кишечно-желудочный тракт дрожжи проявляют биологическое защитное действие в отношении нормальной кишечной микрофлоры. <i>Saccharomyces boulardii</i> проявляют <i>прямой антагонизм по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, грибам</i> , таких как <i>Clostridium pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Shigella</i> и др. Обладает антитоксинным действием за счет синтеза протеаз, расщепляющих токсины; ферментативной активностью за счет повышения активности дисахаридаз тонкого кишечника (лактазы, сахаразы, мальтазы). После приема Энтерола 250 быстро достигается высокая концентрация <i>Saccharomyces boulardii</i> в толстом кишечнике, которая поддерживается на протяжении суток. <i>Saccharomyces boulardii</i> не проникают в системный кровоток и мезентериальные лимфатические узлы. После окончания лечения <i>Saccharomyces boulardii</i> полностью выводятся с калом в течение 3–5 дней.

### 3.4. Рекомбинантные пробиотики

Весьма перспективным направлением биотехнологических исследований является создание рекомбинантных препаратов на основе пробиотиков. После того как было установлено, что ряд бактерий способны проявлять пробиотические свойства и благотворно влиять на здоровье человека, началось использование технологии рекомбинантных ДНК с целью получения генетически измененных штаммов и создание пробиотических или производственных культур с заданными уникальными свойствами.

Несомненный интерес представляет *один из первых рекомбинантных пробиотиков*, разработанных специалистами Украины и России – *Субалин*. Предложен препарат, который помимо высокой антагонистической активности по отношению к патогенным и условно-патогенным бактериям проявлял антивирусную активность благодаря введению генетической информации, которая кодирует продукцию антивирусной субстанции – альфа-2-интерферона. Для этой цели были отобраны несколько штаммов *B.subtilis*. Трансформацию отобранных бактериальных культур проводили плазмидами рВМВ, которые кодируют синтез секреторного (рВМВ 105) и внутриклеточного (рВМВ 104) интерферона. Указанные плазмиды содержат ген интерферона в виде химически-синтезированного аналога гена человеческого лейкоцитарного альфа-2-интерферона. В структуре плазмиды рВМВ 105 ген интерферона связан с «геном» сигнального пептида, гомологического последовательности гена альфа-амилазы, который обеспечивает эффективную секрецию из клеток гетерологичного белка. Плазмида рВМВ 104 не имеет в своей структуре такой последовательности нуклеотидов в связи с чем продуцируемый белок остается внутри клетки. При изучении стабильности плазмид в разных штаммах бацилл установлено, что максимальной стабильностью обладает плазмида рВМВ 105 в штамме *B.subtilis* 3. Даже через 10 пассажей обнаруживалось 100 % сохранность плазмиды. На разных экспериментальных инфекциях животных изучена и подтверждена эффективность и

безопасность препарата Субалин при пероральном введении. Альфа-2-интерферон человека был обнаружен во всех тестируемых органах лабораторных животных. Максимальное количество интерферона зарегистрировано в печени, легких и кишечнике. Интерес представляют данные, которые говорят о влиянии Биоспорина и Субалина на иммунный ответ при вакцинации. Установлено, что даже однократное пероральное введение препаратов перед вакцинацией обуславливает более длительный и высокий уровень специфического иммунного ответа на дифтерийный и столбнячный антигены вакцины АКДС.

*Применение плазмидных векторов используют для создания рекомбинантных штаммов бифидобактерий*. Так, например, в Японии в настоящее время осуществляются интенсивные исследования по использованию модифицированных генно-инженерными методами штаммов бифидобактерий для терапии онкологических заболеваний. Основанием для этого является тот факт, что штаммы бифидобактерий после системного введения способны селективно локализоваться и быстро пролиферировать в границах солидных опухолей. Используя анаэробные и непатогенные бактерии *B.longum* в экспериментах, удалось доставить в опухоль определенные терапевтические гетерологичные гены, в том числе компоненты системы пролекарство-фермент-лекарство. Для этой цели была сконструирована плазмида рBLES100-S-eCD, включающая ген цитозиндезаминазы. Трансформированные этой плазмидой *B.longum*, были способны продуцировать цитозиндезаминазу в гипоксических опухолях, что приводило к локальной конверсии системно вводимого нетоксичного 5-фторцитозина в токсичное для тканей соединение 5-фторурацил. Противоопухолевый эффект от применения этого продукта был продемонстрирован на модели крыс с опухолями молочных желез при введении трансформированных *B.longum* непосредственно в область опухоли или внутривенно. При этом анаэробная *B.longum* накапливается в гипоксических солидных опухолях (анаэробная среда опухоли). В настоящее время проходит испытания противоопухолевый препарат рекомбинантных би-

фидобактерий (продуцирует цитозиндезаминазу) под кодовым названием APS001 селективно накапливающийся в гипоксической среде опухоли.

В работах биотехнологов из Китая для проведения терапии опухолей в *B.longum* была встроена плаزمида pBV22210 для поставки при помощи вектора эндостатина. Указанные плазмиды в *B.longum* показали сильное тормозящее действие на рост перевитой опухоли в печени крыс. Полученными результатами авторы подтвердили, что плазмиды могут достаточно стабильным вектором, причем, наличие плазмиды не влияет на биологические характеристики *B.longum*. Интенсивно проводится скрининг плазмид, полученных для бифидобактерий. Так, например, плазмида pBC1 *Bifidobacteria catenulatum* L48 содержит 2540 пар оснований с содержанием G+C (64,0 %), а плазмида pMG1 *Bifidobacteria longum* содержит 3682 пары оснований с содержанием G+C (65,1 %).

Следует отметить, что специалисты, занимающиеся штаммами пробиотиков, озабочены проблемой, связанной с возможной ролью молочно-кислых бактерий в распространении генов лекарственной устойчивости. Так, R. Temmerman при изучении 187 культур, выделенных из различных йогуртов, производимых в 8-ми странах Европейского союза, обнаружена устойчивость к канамицину у 79 % изолятов, к ванкомицину у 65 %, к тетрациклину у 26 %, к пенициллину у 23 %, к эритромицину у 16 %, к хлорамфениколу у 11 %. При этом большая часть культур (68,4 %) характеризовалась множественной лекарственной устойчивостью. Кроме того, в опытах *in vitro* показана возможность передачи R-плазмид от диких культур *Lactobacillus sp.* различным видам грампозитивных бактерий. Продемонстрирована передача плазмиды pAM-b от *L.reuteri* к *E. Faecflis* в процессе приготовления молочной продукции.

Рассматриваются возможности создания рекомбинантных бифидобактерий – продуцентов ферментов: альфа-амилазы и глутаматдегидрогеназы. Несомненный интерес представляют работы по созданию штамма *B.longum* – продуцента бактериоцина из *Pediococcus spp.*, активного

в отношении *Listeria monocytogenes*. При получении указанных рекомбинантных штаммов пробиотиков наиболее часто используют репликон, полученный непосредственно из бифидобактерий.

Шведские ученые разработали систему пассивной иммунотерапии, в которой рекомбинантные лактобактерии экспрессируют нейтрализующие фрагменты варибельного домена тяжелых цепей антител против ротавирусов, вызывающих диарею. Тяжелые цепи экспрессировались *Lactobaccillus paracasei* как в свободной форме, так и связанной с клеткой. Авторы указывают на возможность использования рекомбинантных пробиотиков для борьбы с вирусной формой диареи.

Таким образом, рекомбинантные бактерии на основе различных форм пробиотиков позволяет расширить применение этой группы препаратов: создание противоопухолевых лечебных препаратов; включение в пробиотики векторов, позволяющих создавать противовирусные и антибактериальные продукты, в том числе, и создание оральных вакцинных препаратов.

Пробиотики с полным основанием можно отнести к разряду перспективных разработок препаратов будущего. Не вызывая побочных эффектов и осложнений, что неминуемо при применении любых химиопрепаратов и антибиотиков, пробиотики обладают высокой терапевтической активностью и безопасностью применения. По разным данным только в США в 2010 году рынок пробиотиков (препаратов и продуктов питания) составит 1,1 млрд долларов.

Сегодня можно с уверенностью говорить о том, что в ближайшее время на мировом фармацевтическом рынке появятся новые бактериальные препараты для лечения дисбактериозов различной этиологии, представленные пробиотиками, пребиотиками и комплексными препаратами-симбиотиками, содержащими как пробиотические, так и пребиотические компоненты. Терапия пробиотиками высокофизиологична, поскольку осуществляет регулирующее влияние на симбионтные отношения хозяина и его микрофлоры и практически сводит к минимуму возможность побочных эффектов от проводимого



лечения. Поэтому препараты, действующие на основе стимуляции роста кишечной микрофлоры организма хозяина, справедливо можно отнести к средствам нового поколения управления флорой толстой кишки.

Только простой перечень эффектов, к которым приводит применение пробиотиков доказывает оправданность их использования в терапии: восстановление нормобиоценоза; продукция аминокислот, лизоцима, бактериоцинов, протеаз, липаз, амилаз и других биологически активных соединений; активация макрофагов; усиление синтеза иммуноглобулинов; индукция эндогенного интерферона; обладают высокой антагонистической активностью по отношению к условно-патогенной и патогенной микрофлоре; активизируют рост естественной нормальной микрофлоры кишечника человека; обладают выраженным противоязвенным действием; стимулируют иммунную систему (противоопухолевая и противовирусная активность); повышают всасывание железа, кальция, витамина Д и других соединений. Бурное развитие исследований по разработке новых биопрепаратов и дальнейшее изучение механизма их лечебно-профилактического действия дает основание утверждать, что в XXI веке пробиотики в значительной степени потеснят на рынке традиционные препараты.

### ***Контрольные вопросы***

1. Привести характеристику основных штаммов пробиотиков. Роль пробиотиков в консорциуме бактерий.
2. Привести схему получения препаратов пробиотиков на основе бифидобактерий.
3. Особенности лиофилизации препаратов пробиотиков.
4. Перечислить основные требования к питательным средам, используемых при производстве препаратов пробиотиков.
5. Описать принципы создания пробиотиков на основе рекомбинантных штаммов бактерий.

## **Раздел 4. ИНТЕРФЕРОНЫ**

*Интерферон* был открыт в 1957 году Н. Isaacs и J. Lindenmann. Авторами обнаружено интересное явление – заражение клеток крови вирусом приводит к выделению ими белка, который обладает противовирусной активностью. Этот белок получил название интерферона (интерференция – отталкивание). Интерес к этому феномену был огромен.

*Интерфероны* – низкомолекулярные белки с молекулярной массой 20–40 кДа.

Синтез интерферона осуществляется клетками в ответ на проникновение в них вируса, в результате чего прекращается развитие и размножение вируса в тканях. Биологическое действие интерферона характеризуется следующими факторами:

- ✓ универсальность – интерферон активен против большинства ДНК- и РНК-содержащих вирусов;
- ✓ выраженная тканевая специфичность;
- ✓ последствие – после удаления интерферона в обработанных клетках сохраняется способность подавлять размножение вирусов;
- ✓ внутриклеточная активность с дистанционным характером действия (интерферон действует на вирусы лишь в процессе их размножения, через цитоплазматическую мембрану клетки, а не непосредственно на геном);
- ✓ нечувствительность к антителам против вирусов, их индуцирующим.

Общие эффекты в действии интерферонов могут проявляться как противовирусные, антипролиферативные и иммуномодулирующие. Антипролиферативное действие интерферонов обусловлено множеством эффектов: ингибированием трансляции, подавлением экспрессии клеточных протоонкогенов и других ростовых факторов клетки.

В зависимости от вида индуктора и типа клеток-продуцентов интерфероны разделяют на альфа, бета и гамма типа: альфа-интерферон или лейкоцитарный интерферон продуцирует лейкоциты, которые обработаны вирусами или другими агентами (вирусы, бактерии и их токсины, полисахариды и синтетические вещества); бета-интерферон или фибробластный интерферон продуцируется фибробластами, обработанными вирусами или другими аген-

тами; гамма-интерферон или иммунный интерферон. Существует несколько подтипов интерферонов. Молекулы интерферона имеют различия в аминокислотном составе.

По своим структурным и функциональным свойствам интерфероны подразделяют на две группы:

- интерфероны I типа – альфа, бета, омега, капа, эпсилон, тау, дельта;
- интерфероны II типа – гамма.

Все интерфероны I типа имеют очень много общего в аминокислотных, и соответственно, в нуклеотидных последовательностях и структуре соответствующих генов. Интерферон-альфа у всех видов животных состоит из многих индивидуальных представителей (около 20 подвидов), гомологичность между которыми на уровне нуклеотидных последовательностей составляет около 80 %. Все гены этого семейства формируют кластер, сгруппированный преимущественно на одной хромосоме (у человека – хромосома 9). В отличие от интерферона-альфа у большинства видов животных интерферон-бета существует в виде только одного представителя. Кроме того, в отличие от интерферона-альфа, интерфероны-бета представляют собой гликопротеины. Интерфероны-омега, которые были открыты при анализе библиотеки ДНК, присутствуют не у всех видов животных, а у человека из 6 представителей этого семейства только один существует в функциональной форме, а остальные представлены псевдогенами. Интерферон-тау был обнаружен только у коров и овец в эпителии эмбрионов на ранних стадиях эмбрионального развития.

Интерферон-гамма не имеет структурной гомологичности с интерферонами I типа. В отличие от генов интерферона I типа, гены интерферона II типа содержат интроны. Интерфероны-гамма, как и интерфероны-бета, представляют собой гликопротеины. Интерфероны I и II типов объединены только по основной функции, а именно по противовирусной активности. Интерфероны типа II выполняют важные функции регуляторов иммунной системы.

Как правило, в норме клетки не продуцируют заметного количества интерферонов до тех пор, пока не состоится его индукция. Однако очень небольшие количества иРНК интерферона можно определить при помощи высокочувствительных методов анализа и без какой-либо явной индукции интерферона. Можно говорить о том, что при нормальных условиях постоянной продукции интерферона не наблюдается.

Необходимо остановиться на механизме действия интерферонов. Сами по себе молекулы интерферона не влияют непосредственно на внутриклеточные процессы. Подобно гормонам, факторам роста и другим медиаторам межклеточного взаимодействия интерфероны взаимодействуют лишь с рецепторами, расположенными на поверхности клеточных мембран. Эндогенные интерфероны для проявления своей биологической активности должны сначала секретироваться клетками, в которых они синтезируются, а затем взаимодействуют с поверхностными рецепторами. После связывания интерферона с рецепторами инициируется цепь сложных внутриклеточных реакций, которые начинаются передачей сигнала к ядру и активацией транскрипции генов, которые отвечают на интерфероны. Транскрипция соответствующих генов и синтез соответствующих белковых продуктов приводит к выработке эффекторных внутриклеточных механизмов, что и является специфическим действием интерферонов. В конечном счете, мы наблюдаем цепочку многочисленных эффектов интерферона, как на клеточном уровне, так и на уровне организма в целом, главным из которых является ингибирование репликации вируса в инфицированных клетках. Рецепторы интерферона I и II типа различны, хотя и имеют определенную структурную общность. Все интерфероны I типа (как альфа, так и бета) конкурируют за одни и те же рецепторы, в то время как взаимодействие интерферона-гамма с клетками осуществляется при участии других рецепторов. Под действием интерферонов наблюдается продукция других цитокинов, индукция специфических ферментов, подавление пролиферации клеток, иммуномодуляция (усиление фагоцитарной активности макрофагов, специфической цитотоксичности лимфоцитов по отношению к клеткам-мишеням) и т.д.

Сегодня в Украине зарегистрирован ряд препаратов интерферона:

- ✓ природные:
  - ❖ альфа-интерфероны: человеческий лейкоцитарный интерферон (ЗАО «Биолек», ОАО «Биофарма»);
  - ❖ бета-интерфероны: человеческий фибробластный интерферон-бета 1b (Бетаферон – «Schering AG»);
  - ✓ рекомбинантные (Роферон-альфа 2a – «Roche», Интрон-А – альфа 2b – «Schering-Plough», Лаферон – альфа 2b – «ФармБиотек»).

Мы рассмотрим методы биотехнологического получения ряда фармацевтических препаратов, содержащих интерфероны различных типов.

#### 4.1. Получение лейкоцитарного альфа-интерферона

Лейкоцитарный интерферон относится к интерферонам первого поколения и его производство до сих пор существует в ряде стран (Финляндия, Украина, Россия и др.) Мы рассмотрим основные этапы получения интерферона из лейкоцитов крови человека под воздействием вируса – интерферогена.

Прежде всего, остановимся на культивировании вирусов при помощи куриных эмбрионов и контроле вирусов на культуре клеток в реакции гемагглютинации или определения цитопатического действия.

Начало применения развивающихся куриных эмбрионов для выращивания вирусов приходится на 1928–1935 гг. Этот период австрийский ученый Бернет назвал «первой золотой эпохой» развития вирусологии, поскольку она открыла возможность культивирования вирусов на довольно удобной лабораторной модели, как правило, интактной в отношении многих возбудителей инфекционных заболеваний. По сути, это был первый биотехнологический процесс накопления вирусов, пригодный для промышленного и массового производства вирусной биомассы.

Развивающиеся куриные эмбрионы являются универсальным и простым для манипуляций объектом. Это объясняется тем, что куриный эмбрион содержит четыре различных естественных питательных субстрата для накопления вирусов: амниотическую и аллантоисную жидкость, хорионаллантоисную оболочку и желточный мешок, клетки которых, как и клетки самого эмбриона, являются высокочувствительными к различным вирусам. Для получения куриных эмбрионов используют яйца от белых леггорнов, имеющих тонкую скорлупу. Они могут быть использованы только в течение 10 дней после снесения. В противном случае развитие зародыша, несмотря на оплодотворение, сильно задерживается. Инкубацию проводят в обычных инкубаторах с автоматическим приспособлением для переворачивания яиц, вентилятором, термометром и гигрометром, при температуре 37,2–37,8 °С и влажности 60–70 %. Работу по заражению куриных эмбрионов проводят в асептических условиях. В настоящее время, согласно международным требованиям (GMP), работу с вирусосодержащим материалом проводят в ламинарных бок-

сах, обеспеченных избыточным потоком стерильного воздуха, прошедшего через мембранные фильтры. Для получения вируса, используемого при производстве интерферона, заражение проводят в аллантоисную полость. Заражение осуществляют на 10–11 сутки развития эмбриона. В области воздушной камеры скорлупу дезинфицируют спиртовым раствором йода и прожигают. Затем прокалывают её зондом и в образовавшееся отверстие вносят 0,1–0,2 мл инокулята с оттитрованным вирусом. При этом инъекционную иглу вводят на 1–2 мм ниже границы. Заражение проводят вирусом в определенном титре. Чтобы иметь стерильную суспензию вируса к вирусному материалу добавляют по 100–1000 мг стрептомицина и 100–1000 ЕД пенициллина. После заражения эмбриона отверстие в скорлупе заливают парафином и яйца помещают в инкубатор. Яйца с эмбрионами выдерживают в течение 48 часов. Затем их охлаждают в течение 3–4 часов при температуре 2–4 °С и подвергают овоскопии. При обнаружении погибших эмбрионов яйца выбраковывают. Перед получением вируса скорлупу дезинфицируют над воздушной камерой и отделяют пинцетом. Аллантоисную жидкость отсасывают пипеткой или с помощью специального аппарата. Из одного эмбриона, в зависимости от его возраста, можно собрать до 8–10 мл аллантоисной жидкости. Аллантоисную жидкость можно получить без эритроцитов, подвергнув её центрифугированию при 3000 об/мин в течение 20–30 минут при температуре 2–6 °С. После получения аллантоисной жидкости её проверяют на стерильность, а также на содержание вируса и его количества путем титрования, например, в реакции гемагглютинации или определения цитопатического действия.

*Для критерия оценки биологической активности вирусов используют титрование на клеточной культуре – обнаруживают дозу, вызывающую цитопатический эффект в 50 % зараженных культур (ЦПД 50) или определяют гемагглютинирующие единицы вируса.*

*Одним из методов контроля активности вируса является реакция гемагглютинации, основанная на способности вируса склеивать эритроциты.*

Для проведения реакции готовят ряд последовательных двукратных разведений вируса и прибавляют к ним определенное количество эритроцитов (например, куриных). В тех образцах, где количество вируса было достаточно для полной агглютинации, наблюдается образование конгломератов из эритроцитов, которые быстро оседают на дно, образуя на всей поверхности красную пленку. При отсутствии вируса эритроциты оседают на дно в виде компактного осадка. За титр принимают предельное разведение вирусосодержащей жидкости, вызвавшее агглютинацию эритроцитов на 50 %.

Цитопатическое действие вируса (ЦПД 50) используемого при производстве лейкоцитарного интерферона должно быть от  $10^8$  до  $10^9$  ЦПД 50. Титрование вирусов проводят на культуре клеток, например, фибробластов. Жидкость, содержащую вирус разводят методом последовательных разведений (на среде Игла, среде 199 и др.) от  $10^1$  до  $10^{10}$ . Образцы разведений вируса  $10^8$ – $10^{10}$  в необходимом количестве переносят в лунки плашек, содержащих культуру клеток. Плашки с культурой клеток, зараженных вирусом, помещают в термостат при температуре  $(37 \pm 1)$  °С на 72 часа. Затем проводят учет биологической активности вируса по эффекту цитопатического действия. *Титром вируса считается* максимальное разведение вируса при котором эффект цитопатического действия выражен в образцах с одинаковым разведением.

*Технология получения лейкоцитарного альфа-интерферона* состоит из следующих стадий:

1. Для получения лейкоцитарной пленки используют кровь или плазму доноров из специализированных центров (в Украине это центры переливания крови), утвержденных национальным органом контроля иммунобиологических препаратов. Доноры проходят контроль на контаминацию вирусными (гепатиты В и С, ВИЧ и др.) и бактериальными агентами. Кровь или плазму центрифугируют при 1000–1500 об/мин в течение 20–25 минут при температуре 2–8 °С. Отделяют слой лейкоцитов со значительным содержанием эритроцитов. В ряде методов предлагается использовать поливиниловый спирт

для лучшего разделения компонентов крови. Количество живых лейкоцитов в полученной пленке должно быть не менее 97 %. Определение нежизнеспособных лейкоцитов проводят окрашиванием эозинамом натрия.

2. Эритроциты лизируют с помощью хлорида аммония (0,83 %-ый раствор при значении pH –  $7,0 \pm 0,5$ ) согласно методике Кэнтелла (1981 г.).

3. Обработанную хлоридом аммония лейкоцитарную пленку ресуспендируют в среде Игла MEM, содержащую бикарбонат натрия, антибиотик и сыворотку крови человека, очищенную от иммуноглобулинов.

4. В качестве праймера добавляют 20 ЕД/мл сырого альфа-интерферона (*сырой альфа-интерферон* – это продукт, полученный в результате процесса индукции, но не подвергшийся очистке и обработке хлористоводородной кислотой при pH 2,0 в течение 5 дней с целью инактивации вирусных агентов).

5. Полученную суспензию инкубируют в стерильных стеклянных емкостях. Лейкоциты праймируют в течение 2–3 часов при температуре  $(36 \pm 0,5)$  °С и периодическом перемешивании (50–200 об/мин), а затем добавляют вирус-индуктор (вирус Сендай или вирус болезни Ньюкасла и др.) до конечной концентрации 150–250 мл гемагглютинационных единиц. Используется аллантоисная жидкость с титром вируса не менее  $10^8$  мл ЦПД 50. После 1 часа инкубации для прикрепления вируса лейкоциты разводят до  $4 \cdot 10^6$  кл/мл (в 2,5 раза) той же средой. Затем культуру инкубируют 15–20 часов при  $(36 \pm 0,5)$  °С, удаляют клетки и дебрис при 500–1000 об/мин в течение 15–20 минут при температуре 2–8 °С. В полученном растворе определяют титр интерферона.

6. Раствор интерферона концентрируют в 50 раз, используя фильтрующую систему с тангенциальным потоком, через которую проходят соединения с молекулярной массой 10 кДа и менее. Процесс проводят при температуре 2–8 °С. Концентрированный раствор интерферона центрифугируют при 9000 g в течение 30 минут при температуре 2–8 °С. Возможно хранение раствора при температуре минус 60–70 °С.

7. Затем проводят очистку интерферона при помощи аффинной хроматографии. Данный метод очистки предусматривает использование моноклональных антител, специфических к альфа-интерферону человека, например, антител NK2 коммерческого производства (Celltech Limited, Englan). Моноклональные антитела соединяют с активированной CNBr сефарозой 4В.

Концентрированный сырой интерферон размораживают и очищают центрифугированием 15000–18000 g в течение 60 минут при температуре 2–8 °С. Прозрачный раствор интерферона фильтруют через фильтры с размером пор 0,22–0,45 мкм и наносят на колонку с моноклональными антителами. Интерферон элюируют с колонки раствором, содержащим 0,1 М лимонной кислоты и 0,3 М хлористого натрия (рН – 2,0).

8. Кислотную инкубацию и нейтрализацию вирусов при рН 2,0 проводят при 4 °С в течение 5 суток (не менее). За этот период происходит необходимая инкубация посторонних агентов, включая вирусы.

9. После 5 дней инкубации рН раствора доводят до значения 7,2–7,4 и стандартизуют раствор до содержания белка 1–3 мг/мл.

10. Проводят гель-фильтрационную хроматографию интерферона. Раствор интерферона наносят на колонку с препаративной гранулированной сефарозой в количестве 5 % от объема колонки. Элюирование проводят фосфатным буфером. Все фракции, содержащие основное количество интерферона объединяют и подвергают стерилизующей фильтрации через мембраны с размером пор 0,22 мкм. Раствор хранят при температуре минус 60–70 °С.

11. При получении интраназального интерферона проводят очистку ультрафильтрацией через мембраны с порогом отсечения 300 кДа (без проведения стадии аффинной хроматографии). К раствору интерферона добавляют криопротекторы, препарат разливают во флаконы и подвергают лиофилизации.

Таким образом, проведя анализ материалов, посвященных технологии получения лейкоцитарного альфа-интерферона можно предложить следующую технологическую схему его изготовления, которая показана на рис. 14.

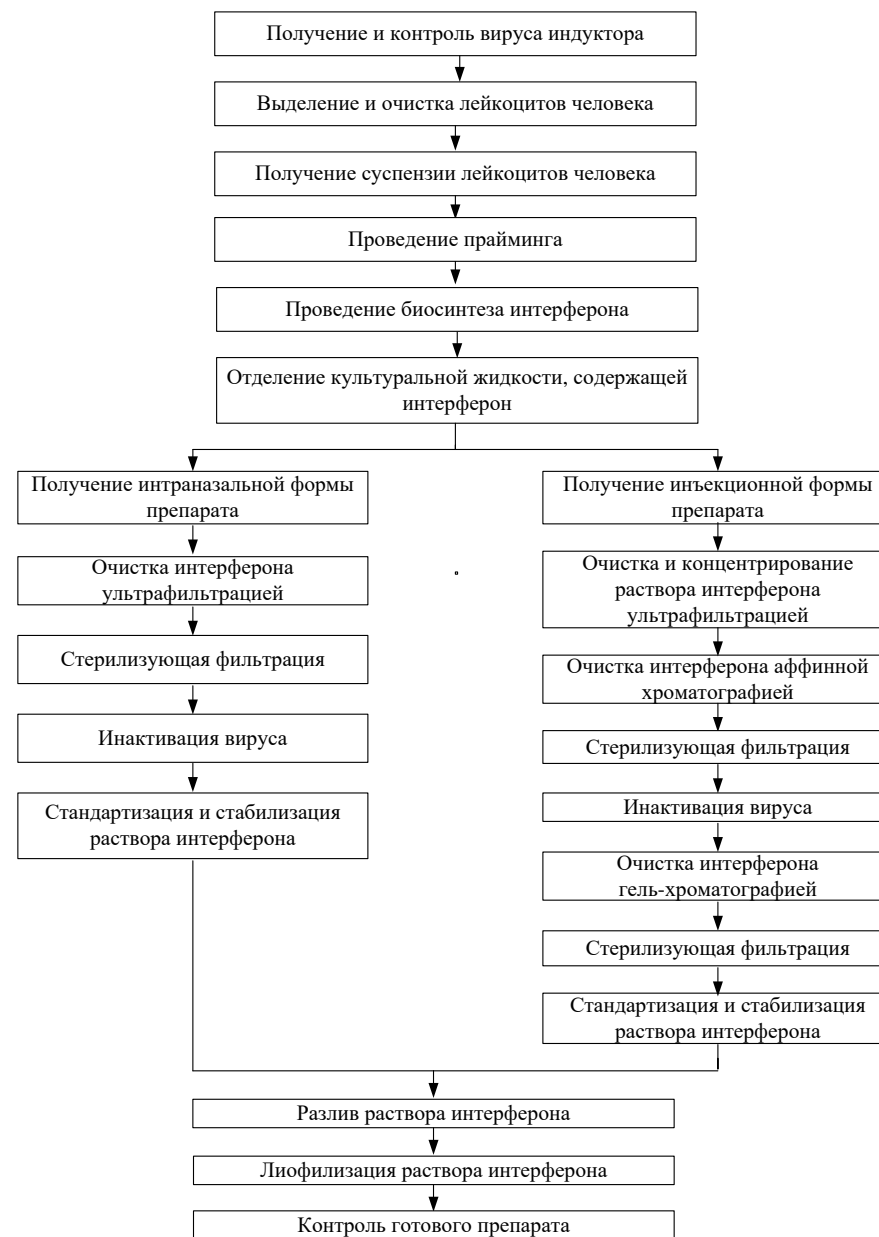


Рисунок 14 – Схема получения лейкоцитарного интерферона

Существует мнение, что природные интерфероны, которые являются смесью разных подклассов и видов, имеют более высокую терапевтическую эффективность в сравнении с рекомбинантными интерферонами. Так, природный интерферон-альфа может использоваться для лечения кондилом с одинаковой эффективностью в дозах в 4 раза меньших по сравнению с рекомбинантным интерфероном.

#### 4.2. Получение рекомбинантного интерферона

В настоящее время большинство препаратов интерферона получено методами генной инженерии. Применение рекомбинантного интерферона позволило расширить арсенал лекарственных средств для лечения очень многих тяжелых заболеваний: новообразований лимфатической системы и системы кроветворения (хронический миелолейкоз, кожная Т-клеточная лимфома, неходжкинская лимфома низкой степени злокачественности и др.); солидные опухоли (саркома Капоши у больных СПИДом, метастазирующая меланома, меланома после хирургической резекции и др.); вирусные заболевания (хронический активный гепатит В и гепатит С и др.).

Первым этапом создания рекомбинантного интерферона является выделение кДНК интерферонов. Для выделения генов или кДНК белков человека используют разные подходы. В ряде случаев выделяют нужный белок и определяют аминокислотную последовательность соответствующего участка молекулы. Исходя из этого находят кодирующую его нуклеотидную последовательность, синтезируют соответствующий олигонуклеотид и используют его в качестве гибридизационного зонда для выделения нужного гена или кДНК из геномных или кДНК-библиотек. Другой подход состоит в выработке антител к очищенному белку и использовании их для скрининга библиотек, в которых происходит экспрессия определенных генов. Для белков человека, синтезируемых преимущественно в какой-то одной ткани, кДНК-библиотека, полученная на основе мРНК, выделенная из этой ткани, будет обогащена последовательностью ДНК-мишени. Например, основным белком, синтезируемым клетками островков Лангерганса поджелудочной железы, является инсулин, и 70 % мРНК, выделенных из этих клеток, кодируют именно его.

Однако принцип обогащения кДНК неприменим для тех белков человека, количество которых очень мало или место синтеза которых неизвестно. В этом случае понадобится использовать другие экспериментальные подходы. Интерфероны (альфа, бета, гамма) – это природные белки, каждый из которых может найти свое терапевтическое применение. При выделении их кДНК пришлось разработать новый подход, позволяющий преодолеть трудности, связанные с недостаточным содержанием соответствующих мРНК и белков. Процедура выделения кДНК интерферонов состояла в следующем:

1. Из лейкоцитов человека выделили мРНК и фракционировали её по размерам; провели обратную транскрипцию и встроили в сайт PstI плазмиды pBR322.

2. Полученным продуктом трансформировали *Escherichia coli*. Образовавшиеся 6000 клонов подразделили на 12 групп: по 512 клонов в каждой. Тестирование проводили на группе клонов, что позволило ускорить процесс их идентификации.

3. Каждую группу клонов гибридизовали с неочищенным препаратом интерферон-мРНК.

4. Из образовавшихся гибридов, содержащих клонированную ДНК и мРНК, выделили мРНК и провели её трансляцию в бесклеточной системе синтеза белка.

5. Определили интерферонную противовирусную активность каждой смеси, полученной в результате трансляции. Группы, проявившие интерферонную активность, содержали клон с кДНК, гибридизованной с интерферон-мРНК;

6. Позитивные группы разбили на 8 подгрупп, содержащих по 64 клон, и вновь провели тестирование. Разбиение на подгруппы повторяли до тех пор, пока не идентифицировали клон, содержащий полноразмерную интерферон-кДНК человека.

Одним из первых рекомбинантных препаратов интерферона является Роферон-А, (альфа-2а) Hoffman la Roche – высокоочищенный белок, который содержит 165 аминокислот с молекулярной массой около 19 кДа. Препарат получают по технологии рекомбинантной ДНК с использованием генно-инженерного штамма *E. Coli* с включенной плазмидой, содержащей ген интерферона лейкоцитов человека.

Показано экспериментально, что уровень экспрессии генов интерферона действительно увеличивается пропорционально числу tandemных копий гена, по крайней мере, до четырех копий на плазмиду. Однако tandemные повторы иногда оказываются нестабильными и со временем некоторые из них или даже все утрачиваются плазмидой.

Плазмидозависимые технологии являются высоко производительными, тем не менее, имеют серьезный недостаток. Целевой продукт, как правило, образует в клетке не растворимые в воде кристаллообразные формы, так называемого «тельца включения». *Процесс изготовления и очистки интерферона при использовании плазмидной технологии* состоит из таких стадий: сборка клеточной биомассы, её дезинтеграция; растворение «тельца включения» путем денатурации белковых структур с помощью мочевины или гуанин-дихлорида; ренатурация денатурированных молекул интерферона; очистка интерферона от балластных компонентов. В процессе ренатурации молекул интерферона наблюдается образование некорректных внутримолекулярных и межмолекулярных связей. Это приводит к частичному образованию неправильных мономерных форм рекомбинантного интерферона, конформация которых отличается от таковой у естественного интерферона, и возникновению его олигомерных структур, которые отсутствуют в естественном интерфероне.

Предложен оригинальный способ получения рекомбинантного интерферона с использованием встроенного в бактериофаг гена интерферона. Бактериофаг, заражая бактериальную клетку, размножается в ней, копируя многократно свою ДНК и встроенный в неё ген интерферона, синтезирует свои белки, в том числе и интерферон. На определенной стадии развития бактериофаг лизирует бактериальную клетку. Интерферон выходит в культуральную жидкость, причем, в водорастворимом состоянии, не образуя нерастворимых форм. Синтез организован таким образом, что интерферон накапливается вне клетки, в культуральной среде, поэтому не образует «тельца включения», как это имеет место в плазмидной технологии получения интерферона (Intron-A, Roferon-A и др.). Накопление интерферона в культуральной жидкости позволяет очищать его по упрощенной схеме: отсутствие необходимости сбора биомассы, её дезинтеграции, денатурации белков с целью растворения «тельца включения» и ренатурации молекул интерферона. Отсутствие стадии концентрирования клеток (сбор биомассы), а также и кле-

точных белков, позволяет получить высокоочищенный препарат интерферона менее сложным методом, чем тот который используется при «плазмидной» технологии. Очищение осуществляется ионообменной хроматографией. По предложенной технологии был получен рекомбинантный интерферон «Лаферон». В полученном препарате обнаруживается не менее 95 % белка интерферона.

Первый ген интерферона был выделен в начале 80-х гг. С тех пор было обнаружено несколько разных интерферонов. Исходя из химических и биологических свойств, их можно подразделить на три группы: интерферон-альфа, интерферон-бета, интерферон-гамма. Интерферон-альфа и интерферон-бета синтезируются клетками, обработанными препаратами вирусов или вирусной РНК, а интерферон-гамма вырабатывается в ответ на действие веществ, стимулирующих рост клеток. Интерферон-альфа кодируется семейством генов, включающим как минимум 15 неаллельных генов, в то время как интерферон-бета и интерферон-гамма кодируются одним геном каждый. Подтипы интерферона-альфа проявляют разную специфичность. Например, при проверке эффективности интерферона-альфа-1 и интерферона-альфа-2 на обработанной вирусом линии клеток быка эти интерфероны проявляют сходную противовирусную активность, в случае же обработанных вирусом клеток человека интерферон-альфа-2 оказывается в семь раз активнее, чем интерферон-альфа-1. Если противовирусная активность проверяется на клетках мыши, то интерферон-альфа-2 оказывается в 30 раз менее эффективным, чем интерферон-альфа-1.

Было предпринято несколько попыток создать интерфероны с комбинированными свойствами, используя тот факт, что члены семейства интерферона-альфа различаются по степени и специфичности своей противовирусной активности. Теоретически этого можно достичь, соединив части последовательности генов разных интерферонов-альфа. Это приведет к образованию гибридного белка с другими свойствами, чем у каждого из исходных белков. Сравнение последовательностей кДНК интерферона-альфа-1 и интерферона-альфа-2 показало, что они содержат одинаковые сайты рестрикции в позициях 60, 92 и 150. После расщепления обеих кДНК в этих сайтах и последующего лигирования фрагментов было получено несколько гибридных генов. Эти гены экспрессировали в *E. coli*, синтезированные белки

очистили и исследовали их биологические функции. Проверка защитных свойств гибридных интерферонов на культуре клеток млекопитающих показала, что некоторые из них проявляют большую активность, чем родительские молекулы. Кроме того, многие гибридные интерфероны индуцировали образование 2'-5'-олигоизо-аденилат-синтетазы в контрольных клетках. Этот фермент участвует в синтезе 2'-5'-связанных олигонуклеотидов, которые в свою очередь активируют латентную клеточную эндорибонуклеазу, расщепляющую вирусную мРНК. Другие гибридные интерфероны проявляли большую, чем родительские молекулы, антипролиферативную активность в культурах различных раковых клеток человека.

Кроме рекомбинантных интерферонов-альфа, которые относятся к конкретной разновидности этого типа интерферонов, начат также выпуск так называемых «консенсусных» интерферонов. К ним относятся, в частности, интерферон «Альфакон-1» или «Инферген» («Амген»). Интерфероны с такими последовательностями вообще не существуют в природе, а представляют собой новые заданные комбинации аминокислотных последовательностей известных субтипов. Такие комбинированные интерфероны являются более эффективными, чем рекомбинантные интерфероны на основе природных субтипов.

Генно-инженерные интерфероны представлены белками только одной определенной формы, которая не подвергается посттрансляционной модификации и не идентична природным интерферонам, что может ограничить биологическую активность соответствующей композиции. Intron (альфа-2b) – Schering Plough; Roferon A (альфа-2a) – Hoffman la Roche; Лаферон (альфа-2b) – Украина представляют собой исключительно форму альфа-интерферона-2. Интерфероны, полученные с помощью природных источников, таких как лимфобластоидная клеточная линия человека или лейкоциты периферической крови человека представлены многими формами. По имеющимся данным препараты, полученные из природных источников, могут содержать более 15 белков с молекулярной массой от 18 до 25 кДа, обладающих антивирусной, антиростовой иммунорегуляторной активностью.

Таким образом, проанализировав материалы, посвященные технологиям получения рекомбинантных интерферонов можно предложить следующую технологическую схему изготовления интерферонов-альфа-2 (см. рис. 15).

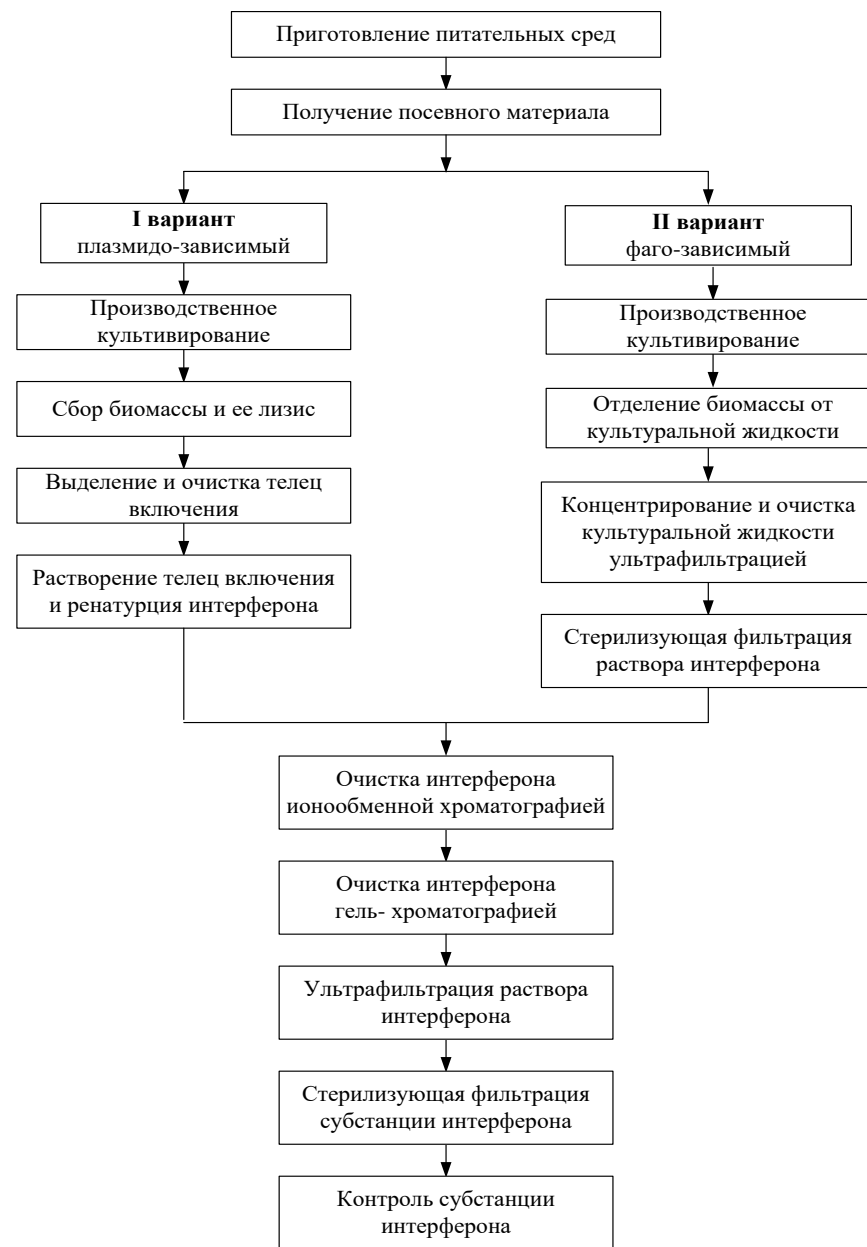


Рисунок 15 – Схема получения рекомбинантного интерферона



### 4.3. Методы контроля препаратов интерферона

*Основными методами контроля препаратов интерферона* являются определение специфической противовирусной активности интерферона; определение электрофоретической чистоты и молекулярных масс; стерильность; бактериальные эндотоксины и др.

*Определение специфической активности* проводят с использованием перевиваемой культуры различных клеток (перевиваемые клетки человека, клетки почек быка (MDBK), тестикул поросят), чувствительных к интерферону-альфа-2 против вируса везикулярного стоматита.

*Культивирование перевиваемых линий клеток.* Перевиваемые линии клеток выращивают в матрацах на питательной среде для культивирования клеток (Игла, среда 199, MEM, 10 % фетальная сыворотка телят, антибиотики). К монослою клеток после удаления питательной среды добавляют смесь 0,02 % раствора Версена и 0,25 % раствор трипсина в соотношении 1 : 1. Через 5–10 мин раствор сливают, а матрац с клетками помещают в термостат при  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  на 10–20 минут до начала отслоения клеток от стекла, после чего прибавляют питательную среду для культивирования клеток. Клетки суспендируют, осаждают центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 минут, растворяют в среде для культивирования и проводят подсчет в камере Горяева. Суспензию клеток  $5 \cdot 10^5$  кл/мл разливают в планшеты по 100 мкл.

*Культивирование вируса везикулярного стоматита (ВВС).* Для определения противовирусной активности интерферона в качестве индикаторного вируса используют вирус ВВС, штамм «Индиана». Первоначально в качестве источника вируса служит лиофилизированный вирус, а затем аллантоисная жидкость, которая содержит вирус с титром не менее  $10^5$  ТЦД 50 на 0,1 мл (титр цитопатического действия). ВВС культивируют на 9–10-дневных куриных эмбрионах. Для заражения эмбрионов используют аллантоисную жидкость с инфекционным титром ВВС  $10^5$ – $10^6$  ТЦД 50 на 0,1 мл. Аллантоисную жидкость разводят раствором Хенкса с антибиотиками (100 ЕД/мл гентамицина) до разведения  $10^3$ – $10^4$  ТЦД 50 на 0,1 мл и по 0,1 мл вводят в эмбрионы, которые инкубируют при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 48 часов. После инкубирования эмбрионы охлаждают при температуре  $2$ – $4^\circ\text{C}$  в течение 3–4 часов. Отбирают аллантоисную жидкость, содержащую вирус и повторяют

пассирование на эмбрионах еще 4–5 раз. Полученные образцы вируса хранят при минус  $60$ – $70^\circ\text{C}$ .

*Определение инфекционного титра ВВС.* Для определения инфекционного титра ВВС используют перевиваемую культуру, которую применяют для титрования интерферона. Перед титрованием лунки планшетов с культурой микроскопируют. Монослой клеток должен быть цельным и содержать клетки типичной морфологии. Разведения вируса проводят из аллантоисной жидкости путем добавления культуральной среды следующего состава: среда 199, 2–5 % сыворотки крупного рогатого скота, антибиотики. Проводят десятикратные разведения ВВС от  $10^1$  до  $10^7$ . В лунки планшета с культурой (по 100 мкл питательной среды в каждую лунку) вносят по 50 мкл каждого разведения ВВС. На каждое разведение используют не менее двух рядов лунок с культурой. Столько же рядов лунок оставляют для контроля культуры.

Все планшеты инкубируют при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в атмосфере с 4–6 % углекислого газа в течение 48 часов. Учет проводят по титру цитопатического действия (ТЦД) вируса на клетки. ТЦД вируса проявляется в изменении морфологии и в нарушении целостности монослоя. Наблюдения ТЦД проводятся микроскопически и оцениваются в «крестах» (+).

(++++) – обнаруживаются отдельные клетки, участки цельного монослоя отсутствуют.

(+++) – сохраняются изолированные участки монослоя (около 25 % всей площади). На остальной поверхности одиночные клетки.

(++) – монослой частично сохранен.

(+) – монослой цельный, клетки типичны, встречаются одиночные нетипичные клетки.

(-) – монослой цельный, клетки типичны.

Учет проводят только при полном сохранении монослоя в лунках культуры (-). За инфекционный титр ВВС принимают максимальное его разведение, которое приводит к ТЦД не менее, чем на (++) в 50 % лунок с культурой ТЦД 50. Для проведения контроля используют вирус с титром  $10^5$ – $10^6$  в 0,1 мл.

*Проведение контроля.* Титр противовирусной активности определяют по степени защиты, который создается интерферонами от цитопатического

действия ВВС в культуре клеток. Определение активности интерферона проводят в сравнении с Международным стандартным образцом интерферона человеческого рекомбинантного альфа-2b (NIBSC). Реакцию проводят в 96-луночных планшетах. Культуру клеток инкубируют при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  на среде 199 или среде Игла с сывороткой крупного рогатого скота. Из монослоя клеток в 100 мкл питательной среды готовят двукратные разведения исследуемых препаратов и стандартных образцов. Каждое разведение готовят в 4-х повторях. В лунки вносят по 100 мкл питательной среды. Используют 4 лунки на каждое разведение ВВС штамма «Индиана», начиная с разведения, которое соответствует 100 ТЦД 50 до 0,1 ТЦД 50 с десятикратным коэффициентом разведения. Культуру клеток инкубируют 24 часа при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  и атмосфере 5 % углекислого газа. После чего в каждую лунку вносят установленную дозу ВВС, которая составляет 100 ТЦД 50 на 100 мкл и продолжают инкубацию при указанных условиях.

*Учет результатов контроля.* Учет результатов проводят через 24–48 часов. За титр интерферона принимают величину, обратную разведению препарата, при котором культура клеток в 50 % лунок полностью защищена от цитопатического действия.

Перерасчет активности в МЕ/мл проводят при сравнении результатов, полученных в опыте: разведений испытуемого и стандартного образцов.

**Определение электрофоретической чистоты и молекулярной массы.** Для определения чистоты, гомогенности и молекулярной массы применяют *метод вертикального электрофореза* в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS) в редуцирующих и нередуцирующих условиях с последующей окраской геля, например, Кумасси ярко-голубым R-250 или нитратом. Образование комплекса SDS с белком устраняет различия между белками, связанные с их зарядом, и переводит молекулы белков в конформацию, при которой радиус Стокса является функцией молекулярной массы белка. При соблюдении этих условий подвижность белков отражает их молекулярные массы. Электрофорез проводят в редуцирующих (в присутствии бета-меркаптоэтанола) и нередуцирующих (в отсутствие бета-меркаптоэтанола) условиях.

Требования, предъявляемые к качеству лейкоцитарного и рекомбинантного интерферонов, приведены в табл. 19.

Таблица 19 – Требования к качеству лейкоцитарного и рекомбинантного интерферонов

Показатели качества	Интерферон рекомбинантный	Интерферон лейкоцитарный
1	2	3
<b>Описание</b>	Прозрачный раствор, бесцветный или слегка желтоватого цвета	Аморфная масса светло-желтого цвета
<b>pH</b>	4,7–5,3	6,0–7,0
<b>Механические включения</b>	$\geq 10$ мкм – не более 6000/шприц $\geq 25$ мкм – не более 600/шприц	-
<b>Автентичность</b>	1. Основная полоса в геле с исследуемым препаратом должна иметь интенсивность и подвижность сравнимую с интенсивностью и подвижностью стандарта интерферона-альфа-2а (метод SDS-PAGE). 2. Время удерживания основного пика на хроматограмме исследуемого препарата должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме стандарта интерферона-альфа-2а (метод обращенно-фазовой ВЭЖХ).	Специфическое противовирусное действие
<b>Чистота</b>	1. На геле с исследуемым препаратом не должны обнаруживаться новые полосы по сравнению с 15 мкл стандартного образца (метод SDS-PAGE). 2. Количество каждой примеси не более 5 %. Общее количество примесей не более 15 % (метод обратно-фазовой ВЭЖХ).	Отсутствие яичного альбумина
<b>Содержание интерферона</b>	3 млн / 0,5 мл 19,3–23,6 мкг/мл 6 млн на 0,5 мл 38,6–47,2 мкг/мл 9 млн на 0,5 мл 57,8–70,7 мкг/мл	-
<b>Противовирусная активность</b>	3 млн / 0,5 мл 4,3–7,7 МЕ/мл 6 млн / 0,5 мл 8,5–15,5 МЕ/мл 9 млн / 0,5 мл 12,8–23,2 МЕ/мл	Не менее 1000 МЕ в ампуле (флаконе)
<b>Стерильность</b>	Стерилен	Стерилен

## ГЛОССАРИЙ

Продолжение таблицы 19

1	2	3
<b>Бактериальные эндотоксины</b>	Не более 9,7 ОЕ/1 млн. МЕ	–
<b>Вода, %</b>	–	2,0
<b>Токсичность</b>	–	Не токсичен

В заключение необходимо отметить, что в настоящее время созданы препараты интерферона природного и генно-инженерного происхождения направленные для лечения ряда заболеваний человека. Применение интерферонов основано на совокупности их биологического действия, а именно: противовирусного, антипролиферативного и иммуномодулирующего. Антипролиферативное действие интерферонов позволило использовать их для лечения многих онкологических заболеваний. Продолжаются работы по созданию новых высокоэффективных препаратов, содержащих интерфероны. Специалисты многих стран активно разрабатывают новые лекарственные формы: суппозитории, растворы для инъекций, глазные капли, аэрозоли и др. Весьма перспективны липосомальные формы интерферона. В Украине зарегистрирована единственная липосомальная форма рекомбинантного интерферона для перорального применения – препарат Липоферон (ЗАО Вектор – Медика, Новосибирск). Использование препарата в клинике подтвердило отсутствие побочных эффектов и высокую эффективность при пероральном способе введения. Не останавливаются работы по совершенствованию традиционных форм препаратов. Развитие биотехнологических исследований в этом направлении позволит уже в ближайшие годы расширить арсенал противовирусных и противоопухолевых лекарственных препаратов на основе интерферонов.

### *Контрольные вопросы*

1. Классификация природных интерферонов и их функции.
2. Привести технологическую схему производства интерферона из лейкоцитов человека.
3. Привести технологическую схему производства рекомбинантного интерферона.
4. Формы выпуска препаратов, содержащих интерферон.

**АВИДНОСТЬ** – степень сродства (мера прочности связывания) антител с антигеном. Определяется аффинностью взаимодействия между всеми антигенными детерминантами (эпитопами) и активными антигенсвязывающими участками антител (паратопами) при образовании комплекса антиген-антитело.

**АДАПТАЦИЯ** – процесс приспособления организмов к конкретным условиям окружающей среды.

**АДЬЮВАНТЫ** – вещества, которые усиливают иммунный ответ на антиген при совместном с ним введении в организм. Наиболее вероятно, что они улучшают и пролонгируют представление антигена. В число адьювантов входят эмульсии минеральных масел, соли металлов (например,  $Al(OH)_3$ ), липидные везикулы – липосомы, производные сапонина. В настоящее время проводится интенсивный поиск новых адьювантов: различные фракции клеточных стенок микобактерий (например, мурамилдипептид), растительные вещества, полиоины и др.

**АКТИВНЫЙ УЧАСТОК АНТИГЕНА** – участок, находящийся на поверхности антигена, способный вступать во взаимодействие с активным центром специфического антитела.

**АНАЭРОБНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ** – микроорганизмы, растущие в отсутствие кислорода.

**АНИОННО/КАТИОННО - ОБМЕННЫЕ СМОЛЫ** – нерастворимый полимер с фиксированными на нем группами катионов (анионов), применяются для хроматографического разделения.

**АНТИГЕН** – вещество, стимулирующее любую форму адаптивного иммунного ответа. Обычно в роли антигенов выступают чужеродные частицы (клетки, бактерии, вирусы и др.) или крупные молекулы (белки, полисахариды и др.) чужого организма, но в ряде случаев мелкие молекулы (гаптены) и даже «свои» компоненты могут быть антигенными. Основное, но далеко не единственное условие антигенности, – наличие поверхностных структур, генетически отличных от тканей организма-хозяина.

**АНТИТЕЛА** – сывороточные глобулины с широким спектром специфичности к различным антигенам. Обладают свойством специфически связываться с антигеном, активировать комплемент, усиливать фагоцитарную активность макрофагов и нейтрализовать бактериальные токсины и вирусы.

**АТТЕНУИРОВАННАЯ ВАКЦИНА (ОСЛАБЛЕННАЯ)** – вакцина, приготовленная с использованием ослабленных тем или иным способом бактерий или вирусов.

**АУТОИММУНИТЕТ** – в норме ряд механизмов постоянно поддерживает иммунную систему в состоянии толерантности к тканям своего организма, и иммунного ответа на них не происходит. Аутоиммунитетом, или аутоиммунным заболеванием, называется состояние, при котором иммунная система начинает воспринимать «свои» ткани как чужеродные и атакует их.

**АЭРОБНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ** – микроорганизмы, растущие только в присутствии кислорода.

**БИОМАССА** – клеточная масса, образующаяся в результате жизнедеятельности живых организмов.

**БИОРЕАКТОР (ФЕРМЕНТЕР)** – устройство (сосуд), в котором протекают биохимические процессы при участии живых микроорганизмов, клеточных культур или ферментов.

**В-КЛЕТКИ** – лимфоциты, продуцирующие антитела и происходящие из клеток костного мозга.

**ВАКЦИНАЦИЯ** – метод, позволяющий стимулировать иммунный ответ и создавать иммунитет к возбудителю в отсутствие заболевания. Название произошло от препарата vaccine (коровья оспа – variola vaccina).

**ВАРИАБЕЛЬНЫЕ ДОМЕНЫ** – участки полипептидных цепей антител, имеющие неодинаковую аминокислотную последовательность у молекул разных антител. Отвечают за антигенную специфичность антител.

**ВЕКТОР** – самореплицирующаяся молекула ДНК (например, бактериальная плаزمид), используемая в генной инженерии для переноса генов от организма донора в организм-реципиент, а также для клонирования нуклеотидных последовательностей.

**ВИРИОН** – инертные формы, в которые превращается вирус при переходе из одной клетки хозяина в другую.

**ВИРУЛЕНТНОСТЬ** – характеристика патогенности микроорганизма.

**ВСТАВКА** – сегмент ДНК, встроенный в клонирующий вектор.

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД** – система записи генетической информации в виде последовательности нуклеотидов, в которой каждые три нуклеотида, составляющие кодон, кодируют одну аминокислоту. Состоит из 64 кодонов, кодирующих все 20 аминокислот и три терминирующих кодона.

**ГЕННАЯ ИММУНИЗАЦИЯ** – индукция у организма иммунного ответа без введения антигена путем включения в клетки гена, кодирующего белок-антиген.

**ГИБРИДИЗАЦИЯ** – отжиг двух полинуклеотидных цепей, часто из разных источников, образованием ДНК/РНК – или ДНК/ДНК- гибридов, стабилизируемых водородными связями.

**ГИБРИДОМА** – гибридная клеточная линия, полученная при слиянии нормальных антителообразующих клеток (лимфоцитов) и миеломных клеток. Обладает способностью к неограниченному росту и синтезу моноклональных антител.

**ГИПЕРВАРИАБЕЛЬНЫЙ УЧАСТОК** – сайт вариабельной части тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина, характеризующийся большей изменчивостью у антител разной специфичности по сравнению с другими её сегментами – каркасными участками.

**ГЛАВНЫЙ КОМПЛЕКС ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ (МНС – major histocompatibility complex)** – группа генов и кодируемых ими антигенов клеточной поверхности, которые играют важную роль в распознавании чужеродных агентов и развитии иммунного ответа. Главный комплекс гистосовместимости человека получил название HLA. Антигены HLA представляют собой гликопротеиды, находящиеся на поверхности клеток и кодируемые группой тесно сцепленных генов 6-ой хромосомы. Антигены HLA играют важнейшую роль в реакциях иммунного ответа на чужеродные антигены и сами являются сильными антигенами. Являясь сильными антигенами, они проявляют антигенность только в случае, когда распознаются иммунной системой не собственного, генетически иного организма, например, при трансплантации. Антигены HLA подразделяются на антигены класса I и антигены класса II. Антигены HLA класса I необходимы для распознавания трансформированных клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами. Антигены HLA класса II обеспечивают взаимодействие между Т-лимфоцитами и макрофагами в процессе иммунного ответа. Т-хелперы распознают чужеродный антиген лишь после его переработки макрофагами, соединения с антигенами HLA класса II и появления этого комплекса на поверхности макрофага.

**ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ** – ковалентное присоединение сахарного остатка к белковой молекуле.

**ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ** – синтез антител В-клетками иммунной системы в ответ на присутствие в организме чужеродных антител.

**ДВОЙНОЙ КРОССИНГОВЕР** – кроссинговер, происходящий одновременно в двух точках пары гомологичных хромосом.

**ДЕНАТУРАЦИЯ** – нарушение нативной структуры биологических макромолекул в результате разрушения водородных связей.

**ДИАЛИЗ** – удаление молекул малого размера из раствора макромолекул за счет диффузии первых в водную фазу через полупроницаемую мембрану.

**ДИСУЛЬФИДНАЯ СВЯЗЬ** – ковалентная связь между двумя атомами серы, входящими в молекулу цистеина. Стабилизирует третичную структуру полипептидных цепей.

**ДНК-ЗОНД** – фрагмент ДНК, меченый тем или иным образом и использующийся для гибридизации со специфическим участком ДНК. Позволяет идентифицировать комплементарные ему нуклеотидные последовательности.

**ДНК-ЛИГАЗА** – фермент, катализирующий образование фосфодиэфирной связи между 3'-гидроксильной группой и 5'-фосфатом соседних нуклеотидов в месте одноцепочечного разрыва молекулы ДНК.

**ДНК-ПОЛИМЕРАЗА** – фермент, катализирующий синтез полинуклеотидной цепи из отдельных нуклеотидов, с использованием другой цепи в качестве матрицы и ДНК-затравки со свободной 3'-ОН-группой.

**ДНК-ПОЛИМЕРАЗА Tag** – термостабильная ДНК-полимераза (сохраняет активность при 95 °С) бактерии *Thermus aquaticus*. Применяется в методе ПЦР.

**ЕСТЕСТВЕННЫЕ КИЛЛЕРЫ** – лимфоцитоподобные клетки, способные уничтожать некоторые мишени, в основном, инфицированные клетки, но без рецепторов и узкой специализации, характерных для истинных лимфоцитов.

**ИММУНИЗАЦИЯ:**

*Активная* – введение в организм вакцин, приводящее к стимулированию выработки антител и/или клеток иммунной системы, обладающих функцией памяти и эффекторными функциями, например, цитотоксические Т-клетки.

*Пассивная* – введение в организм препаратов антител, когда имеется необходимость в экстренной защите человека вследствие инфицирования вирусами и бактериями.

В ряде случаев применяют одновременно активную и пассивную иммунизацию. Так, например, при укусе животными с подозрением на бешенство вводят антирабическую вакцину и антирабический иммуноглобулин или при профилактике столбнячной инфекции применяют противостолбнячную сыворотку и адсорбированный столбнячный анатоксин.

**ИММУННАЯ ПАМЯТЬ** – это способность организма реагировать по вторичному типу, т.е. ускоренно и усиленно вырабатывать антитела при повторном введении антигена, которым индивидуум был иммунизирован ранее, при этом синтез антител осуществляется быстрее, иногда уже через 48 часов. К сохранению иммунной памяти причастны оба типа стимулированных антигеном лимфоцитов, то есть В- и Т-клетки. Иммунологическая перестройка лимфатической системы после первого контакта с антигеном может сохраняться в организме в течение длительного времени и даже пожизненно. Поэтому в ряде случаев через много лет после первичного введения антигена в ответ на его повторное введение происходит быстрое образование соответствующих антител в высоком титре.

**ИММУННЫЙ ОТВЕТ** – совокупность физиологических процессов в организме, индуцируемых при попадании в него чужеродных антигенов.

**ИММУННЫЙ ОТВЕТ ГУМОРАЛЬНЫЙ** – продукция специфических антител в ответ на воздействие чужеродного антигена. Основную роль в реализации гуморального ответа играют В-лимфоциты, которые под влиянием антигенного стимула дифференцируются в антителопродуцирующие клетки. В-лимфоциты, как правило, нуждаются в помощи Т-хелперов и антигенпрезентирующих клеток.

**ИММУННЫЙ ОТВЕТ КЛЕТОЧНЫЙ** – накопление в организме клона Т-лимфоцитов (цитотоксических лимфоцитов), несущих специфические для данного антигена антигенраспознающие рецепторы и отвечающие за клеточные реакции (распознавание и разрушение клеток мишеней). Например, разновидностью клеточного иммунного ответа является реакция гиперчувствительности замедленного типа.

**ИММУНОАФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ** – метод очистки и выделения, при котором фиксированное на матрице антитело связывает специфический белок (антиген), находящийся в смеси других белков.

**ИММУНОСУПРЕССИЯ** – потеря способности иммунной системы организма к иммунному ответу на антиген.

**ИНДУКТОР** – небольшая молекула, связывающаяся с регуляторным белком-репрессором, что приводит к дерепрессии соответствующих генов.

**ИНДУКЦИЯ** – дерепрессия гена или группы генов под действием индуктора.

**ИНИЦИАЦИЯ** – начало синтеза биополимера.

**ИНТЕГРАЦИЯ** – встраивание чужеродной ДНК (обычно с помощью гомологичной рекомбинации) в хромосому хозяйской клетки.

**ИНТЕГРИРУЮЩИЙ ВЕКТОР** – вектор, специально сконструированный для того, чтобы с его помощью можно было встраивать (интегрировать) клонированную ДНК в геном клетки-хозяина.

**ИНТЕРФЕРОНЫ** – группа низкомолекулярных белков (20–40 кДа), продуцируемых в ответ на вирусную инфекцию. Продуцируются макрофагами (ИФ-альфа), фибробластами (ИФ-бета) и Т-клетками (ИФ-гамма). Интерфероны стимулируют клетки к выделению белков, блокирующих транскрипцию информационной РНК вируса. Интерфероны блокируют фундаментальные процессы репродукции нуклеиновых кислот. К действию интерферонов чувствительны практически все вирусы. Интерфероны влияют на деление нормальных клеток. Интерфероны проявляют противовирусные и противоопухолевые лечебные свойства.

**ИММУНОГЛОБУЛИНЫ** – растворимые сывороточные белки, которые выполняют функцию антител, защищающих организм от инфекции. Молекула иммуноглобулина состоит из двух идентичных, более длинных «тяжелых» цепей, связанных друг с другом дисульфидными связями, и связанных с ними двух идентичных, но более коротких «легких» цепей. Так, например, иммуноглобулин G состоит из тяжелых цепей с молекулярной массой 53 кДа и легких цепей с молекулярной массой 23 кДа. С-концевые участки как легких, так и тяжелых цепей практически не отличаются по структуре в иммуноглобулинах одного типа и называются постоянными участками. Область Fc, представляющая собой остов молекулы антитела, построена из С-концевых последовательностей постоянных участков тяжелых цепей. Дифференциация антител в пределах одного типа осуществляется в N-концевых участках цепей, называемых переменными. Связывающий антиген активный центр антитела образуется из переменных участков легких и тяжелых цепей. Физические, антигенные и функциональные различия между константными облас-

тями определяют 5 основных классов тяжелых цепей – M, G, A, E и D и соответствующие им 5 классов иммуноглобулинов (Ig). IgM (м.м. 900 кДа) первыми синтезируются в ответ на первичную антигенную стимуляцию. Так как они имеют пентамерную структуру с 10 активными центрами, то они эффективны в связывании и агглютинации микроорганизмов, вызывают нейтрализацию вирусов; IgG (М.м 150 кДа) при иммунном ответе появляются в сыворотке вслед за IgM. Обладают способностью активно связываться своим Fc-участком с C1q (первый компонент классического пути активации комплемента), активируя комплемент, и рецепторами фагоцитов. Антитела класса IgG играют основную роль в гуморальном иммунитете при инфекционных заболеваниях, участвуют во многих иммунологических реакциях; IgA (м.м. 385 кДа) – основные антитела, содержащиеся в секрете (слюна, пот), в легких, кишечнике, молоке, молозиве, желчи и моче. Основная функция – предотвращать проникновение антигенов с внешних поверхностей в ткани, участвуют в механизмах развития местного иммунитета, нейтрализуют энтеротоксин, активируют комплемент и процесс фагоцитоза; IgE (м.м 200 кДа) – способны через Fc-фрагмент связываться с тучными клетками и стимулировать их дегрануляцию. К ним относится основная масса аллергических антител (реагинов); IgD (м.м. 185 кДа) – действуют на поверхности В-клеток, выполняя регулирующие функции. Антитела класса Ig D принимают участие в развитии местного иммунитета, обладают антивирусной активностью. Участвуют в развитии аутоиммунных процессов.

**КАПСИД** – белковая оболочка вирусной частицы.

**КЛЕТКИ КРОВИ:**

- *Нейтрофил* – самый распространенный лейкоцит крови. Гранулы этой короткоживущей фагоцитарной клетки содержат большое количество бактерицидных веществ;
- *Эозинофил* – лейкоцит с крупными преломляющими гранулами, в которых содержится значительное количество основных, или катионных, белков, возможно, важных для уничтожения больших паразитов, включая червей;
- *Базофил* – лейкоцит с крупными базофильными гранулами, в которых содержится гепарин и вазоактивные амины, важные для воспалительного процесса. Нейтрофилы, эозинофилы и базофилы объединяют под общим названием «Гранулоциты»;
- *Моноцит* – самая большая ядродержащая клетка крови, образуется в костном мозге. Проникая в ткани, созревает в МАКРОФАГ;
- *Макрофаг* – основной оседлый тканевой фагоцит в тканях и серозных жидкостях брюшины, плевры и др. Тканевые макрофаги – основные продуценты цитокинов ИЛ-1, ИЛ-6, и др., которые вызывают острую фазу ответа, изменения сосудистого эндотелия, а затем процессы репарации в тканях,

Макрофаги могут находиться в свободном состоянии в тканях или закрепляться на стенках кровеносных синусов, где отслеживают в крови чужеродные частицы, ослабленные эритроциты и др. Эта способность наиболее сильно выражена в печени, где макрофаги называют клетками Купфера. Подобные функции альвеолярные макрофаги выполняют в легких, где очищают альвеолы от свободных частиц и микробов. Макрофаги (как и полиморфно-ядерные лейкоциты) обладают ценной способностью распознавать не только чужеродный материал, но и связанные с ним антитела и/или комплемент, что существенно ускоряет процесс фагоцитоза. МАКРОФАГИ секретируют многие естественные гуморальные факторы: интерфероны, некоторые компоненты комплемента, цитотоксические факторы, лизоцим (мурамидаза, важный бактерицидный фермент, атакующий клеточные мембраны бактерий, присутствующий в крови в количестве 1 мг/мл). Лизирует многие сапрофиты, некоторые патогенные бактерии, поврежденные антителами и /или комплементом;

- *Мегакариоцит* – клетка-предшественник тромбоцита;
- *Тромбоцит* – небольшая клетка, участвующая в гемостазе и выделяющая многие медиаторы воспалительных процессов. Помимо активного участия в свертывании крови, способен фагоцитировать комплексы антиген – антитело.

КЛЕТОЧНАЯ ЛИНИЯ – группа клеток, поддерживаемая в культуре пересевов.

КЛОН – популяция клеток или молекул, идентичных одной родоначальной клетке или молекуле.

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ – система методов, использующаяся для получения клонированных ДНК: выделение нужного гена из какого-либо организма, встраивание его в плазмиду (вектор), введение в клетку организма-хозяина, многократная репликация.

КОМПЛЕМЕНТ – группа сывороточных белков, которые при активации вызывают широко распространенные воспалительные эффекты, а также ЛИЗИС бактерий и др. Комплемент может быть активирован непосредственно бактериями, но обычно для этого необходимо присутствие антител.

КОНСТАНТНЫЙ ДОМЕН – неизменная для данного класса иммуноглобулинов часть тяжелой или легкой полипептидной цепи.

КОНЪЮГАТИВНЫЕ ПЛАЗМИДЫ – плазмиды, способные передаваться от одной клетки к другой во время конъюгации.

КРОССИНГОВЕР – взаимный обмен участками гомологичных хромосом, основанный на разрыве-соединении хроматид и приводящий к новой комбинации аллелей. Называется также рекомбинацией.

КУЛЬТУРА – популяция клеток или микроорганизмов, выращиваемых и контролируемых в условиях *in vitro*.

ЛАЛ-ТЕСТ – используется для определения бактериальных эндотоксинов в инъекционных препаратах. В основе лежит процесс физико-химического взаимодействия эндотоксинов с лизатом клеток (амебоцитов) крови мечехвостов, в результате которого происходит образование геля. Поскольку первые исследования проводились на мечехвостах *Limulus polyphemus*, реактив, приготовленный из их крови, был назван Лизат Амебоцитов Лимулюс, или сокращенно ЛАЛ-реактив, а метод, в котором он используется, получил название ЛАЛ-тест. Положительная реакция характеризуется образованием плотного геля, который не разрушается при переворачивании пробирки на 180 °. При отрицательной реакции такой гель не образуется.

ЛИЗИС – разрушение клеточных стенок под действием ферментов, содержащихся в лизосомах, или других агентов, распад клетки, необратимое истечение её содержимого через поврежденную мембрану.

ЛИМФОЦИТ – мелкая клетка крови, из которой она рециркулирует через ткани и обратно (через лимфу) в поисках чужеродных веществ. Её способность распознавать индивидуальные антигены с помощью специализированных поверхностных рецепторов и продуцировать большие клоны подобных клеток с идеальной специфичностью и длительным жизненным сроком отвечает задачам адаптивного иммунитета. Различают Т- и В-лимфоциты:

- *В-лимфоциты* (В-клетки, от лат. bursa). Участвуют в выработке антител – гуморальных факторов адаптивного иммунитета;
- *Т-лимфоциты* (Т-клетки, от лат. thymus). Делятся на несколько субпопуляций, которые взаимодействуют с В-лимфоцитами, убивают зараженные вирусом клетки, активируют макрофаги и выполняют ряд других функций. Т-лимфоцит, стимулированный антигеном, переходит в бластную форму и выделяет цитокины (например, интерферон-гамма), повышающие активность макрофагов.

CD8 – молекула на поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов. Распознает молекулу ГКГС (главного комплекса гистосовместимости) класса I, что необходимо до того, как цитотоксическая Т-клетка убьет клетку, инфицированную вирусом.

CD4 – молекула корцептора, взаимодействующая с молекулой ГКГС класса II. Экспрессирован на Т-хелперах, взаимодействует с В-лимфоцитами или макрофагами.

ЛИНКЕР – синтетический олигонуклеотид, содержащий сайт рестрикции. Используется для соединения векторной и клонируемой ДНК, к концам которой по методу сшивания тупых концов присоединены линкеры.

ЛИПКИЕ КОНЦЫ – взаимно комплементарные одноцепочечные участки ДНК, выступающие по концам двухцепочечной молекулы; образуются в результате ступенчатых разрезов двухцепочечных ДНК.

ЛИПОСОМА – структура, образуемая одно- или двухслойной мембраной, состоящей из липидных молекул. Гидрофобная часть этих молекул обращена внутри структуры, гидрофильная наружу. Внутри липосомы могут находиться белки, нуклеиновые кислоты, лекарственные вещества. В липидном бислое могут находиться гидрофобные вещества.

МАКРОФАГИ – большие тканевые клетки, удаляющие из организма поврежденные ткани, клетки, бактерии и другие материалы. Макрофаги и полиморфно-ядерные лейкоциты называют также миелоидными клетками, подчеркивая их общее происхождение в костном мозге.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА – однотипные антитела, строго специфичные в отношении одного эпитопа (антигенной детерминанты). Синтезируются гибридами – клеточными гибридами, полученными при слиянии нормальных антителообразующих клеток с миеломной опухолевой клеткой, способной к неограниченному росту.

НЕПРЕРЫВНАЯ ФЕРМЕНТАЦИЯ – культивирование микроорганизмов при непрерывном добавлении в биореактор среды и выведении такого же объема суспензии.

ОКРАШИВАНИЕ ПО ГРАМУ – метод окрашивания микробиологических препаратов, позволяющий идентифицировать две группы бактерий: грамположительные и грамотрицательные. Основан на различии биохимического состава мембран бактериальных клеток.

ОПЕРАТОР – участок ДНК, непосредственно примыкающий к структурному гену и регулирующий его транскрипцию при участии репрессора или активатора.

ОТЖИГ – процесс образования двухцепочечных молекул (ДНК–ДНК или ДНК–РНК) из одиночных полинуклеотидных комплементарных цепей.

ПАССИВНЫЙ ИММУНИТЕТ – форма иммунитета, возникающая при введении в организм сыворотки или препаратов иммуноглобулинов, содержащих антитела, выработанные другим организмом в результате активной иммунизации.

ПЕПТИД – короткая цепочка аминокислот, соединенных пептидными связями.

ПЕПТИДНАЯ ВАКЦИНА – короткая цепочка из аминокислот, индуцирующая образование антител к специфическому инфекционному агенту.

ПЕРВИЧНАЯ КУЛЬТУРА – культура клеток или тканей, взятых непосредственно из организма.

ПЕРИОДИЧЕСКАЯ ФЕРМЕНТАЦИЯ – культивирование микроорганизмов в течение ограниченного интервала времени. Свежую среду инокулируют посевным материалом, и проводят культивирование в непрерывном режиме, не добавляя новых порций среды и не удаляя продуктов, пока процесс не завершится сам собой.

ПИРОГЕН – вещество, продуцируемое бактериями (эндотоксин) и вызывающее повышение температуры.

ПЛАЗМИДА – внехромосомный генетический элемент, способный к длительному автономному существованию и репликации. Обычно это двухцепочечная кольцевая ДНК. Плазмиды есть практически у всех бактерий. Размеры плазмид достигают до 500 т.п.н. Плазмиды содержат сайты начала репликации (ori), определяющие репликацию в клетке-хозяине, без этих сайтов репликация была бы невозможна. Плазмиды могут быть представлены в клетке 10–100 копиями (высококопийные плазмиды) или 1–4 (низкокопийные плазмиды). На долю плазмидной ДНК обычно приходится 0,1–5,0 % суммарной клеточной ДНК. Плазмиды содержат информацию, обеспечивающую их собственный перенос из одной клетки в другую (F-плазмиды), другие несут гены устойчивости к антибиотикам (R-плазмиды) или специфические наборы генов, ответственных за утилизацию необычных метаболитов (плазмиды деградации). Свойства высокоэффективного плазмидного вектора определяются следующими параметрами:

- небольшим размером, поскольку эффективность переноса экзогенной ДНК в *E. Coli* значительно снижается при длине плазмиды более 15 т.п.н.;
  - наличием уникального сайта рестрикции, в который может быть осуществлена вставка;
  - наличием одного или более селективных генетических маркеров для идентификации реципиентных клеток, несущих рекомбинантную ДНК.
- Плазмидные векторы создаются при помощи генной инженерии.



ПЛАЗМИДНЫЙ ВЕКТОР pBR 322 – один из первых созданных плазмидных векторов. Обычно обозначение плазмидного вектора включает букву p (plasmid) и еще несколько букв, имеющих отношение к описанию вектора или истории его создания. Так, буквы BR в обозначении плазмиды p BR 322 указывают на авторство Ф. Боливара и Р. Родригеса, сконструировавших эту плазмиду, а число 322 – цифровое обозначение, взятое из протоколов исследования. Длина плазмиды pBR322 – 4361 п.н. Она несет два гена устойчивости к антибиотикам ампициллину (Amp r) и тетрациклину (Tet r), а также уникальные сайты BamHI, Hind III и Sal I в гене Tet r и один сайт Pst I в гене Amp r; один сайт для Eco RI (Eco RI – рестрицирующая эндонуклеаза типа II, выделенная из *E. Coli* и играющая ключевую роль при генном клонировании), находящийся за пределами кодирующих последовательностей, и сигнал начала репликации, обеспечивающий репликацию исключительно в *E. Coli*. Принцип работы вектора pBR322 можно представить следующим образом: при обработке очищенной кольцевой плазмиды рестриктазой, расщепляющей её в единственном сайте, расположенном в одном из генов устойчивости к тому или другому антибиотику, образуется линейная молекула с липкими концами. Такие молекулы смешивают с донорской ДНК, содержащей нужный ген и предварительно обработанной такой же рестриктазой. Поскольку липкие концы этих двух ДНК взаимно комплементарны, они спариваются с образованием гибридных молекул. На следующем этапе проводят выделение и очистку рекомбинантных ДНК, освобождая их от нежелательных продуктов и различных комбинаций фрагментов, в частности, объединившихся между собой фрагментов донорской ДНК и исходной ДНК плазмиды. Следующим этапом является процесс трансформации – введение рекомбинантной ДНК в клетку хозяина.

ПОЛИВАЛЕНТНАЯ ВАКЦИНА (комбинированная) – вакцина, дающая иммунный ответ на несколько инфекционных агентов (антигенов).

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР) – это эффективный способ получения *in vitro* большого числа копий специфических нуклеотидных последовательностей. Их амплификация (иногда в миллионы раз) осуществляется в ходе трехэтапного циклического процесса. Для ПЦР необходимы: 1) два синтетических олигонуклеотидных праймера (длиной примерно по 20 нуклеотидов), комплементарные участкам ДНК из противоположных цепей, фланкирующим последовательность-мишень; 2) их 3'-гидроксильные концы после отжига с ДНК должны быть ориентированы навстречу друг другу; ДНК-мишень длиной от 100 до ~ 35000 п.н.; 3) термостабильная ДНК-полимераза, которая не теряет своей активности при температуре 95 °С и выше; 4) четыре дезоксирибонуклеотида. Типичная ПЦР-амплификация состоит в многократном повторении следующих трех реакций:

1. *Денатурация*. Первый этап ПЦР состоит в тепловой денатурации образца ДНК выдерживанием его при температуре 95 °С в течение по крайней мере 1 минуты. Помимо ДНК, в реакционной смеси содержится в избытке два праймера, термостабильная ДНК-полимераза Taq, выделенная из бактерий *Thermus aquaticus*, и четыре дезоксирибонуклеотида.
2. *Ренатурация*. Температуру смеси медленно понижают до ~55 °С, при этом праймеры спариваются с комплементарными последовательностями ДНК.
3. *Синтез*. Температуру повышают до ~ 75 °С – величины, оптимальной для ДНК полимеразы Taq. Начинается синтез комплементарной цепи ДНК, иницируемый 3'-гидроксильной группой праймера. Все реакции проводят в пробирках, погруженных в термостат. Смена температурного режима и его поддержание осуществляется автоматически. Каждый цикл обычно длится 3–5 минут.

ПОЛИМОРФНО-ЯДЕРНЫЕ ЛЕЙКОЦИТЫ – короткоживущие клетки-«мусорщики» крови, содержащие мощные бактерицидные ферменты.

ПРЕБИОТИКИ – субстраты, стимулирующие естественную микрофлору, которые в норме поступают в организм человека, и которые не перевариваются и не всасываются в желудке и тонком кишечнике, а поступая в толстый кишечник используются в качестве питательной среды для нормальной микрофлоры. У людей в первые дни после рождения основным пребиотиком является лактулоза, входящая в состав грудного молока.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ – в большинстве случаев для реализации иммунного ответа макрофаг должен в особой форме представить антиген Т- и В-лимфоцитам.

ПРОБИОТИКИ (pro bios – для жизни) – препараты, содержащие живые микроорганизмы, относящиеся к нормальной, физиологически и эволюционно обоснованной флоре кишечного тракта. Они положительно влияют на организм хозяина, способствуют восстановлению пищеварения, биологического статуса, иммунного ответа, повышают эффект вакцинации. Пробиотики являются бактериальными препаратами, которые содержат те или иные микроорганизмы облигатной микрофлоры (бифидобактерии, лактобациллы, энтерококки, аэрококки, эшерихии и др.), осуществляющие при естественном способе введения положительное влияние на микробиоценоз кишечника хозяина. Симбионтное пищеварение происходит при содействии анаэробной кишечной микрофлоры и осуществляется преимущественно в восходящем отделе толстой кишки. При этом разлагаются не только непереваренные в верхних отделах желудочно-кишечного тракта остатки пищи (преимущественно

венно растительные волокна), но и другие органические соединения. В нормальных физиологических условиях протеолитические и сахаролитические бактерии совместно участвуют в этом процессе. Среди метаболитов особого внимания заслуживают так называемые короткоцепочные летучие жирные кислоты: уксусная, пропионовая, масляная, молочная и др. В состав препаратов входят представители нормальной микрофлоры человека, продуцирующие разнообразные по химическому составу вещества, проявляющие антимикробную активность: перекиси, низкомолекулярные кислоты, антибиотикоподобные пептиды, лизоцим и др. К настоящему времени установлено, что короткоцепочные летучие жирные кислоты выполняют в организме ряд важнейших функций: энергетическую поддержку, стимуляцию функций непатогенной симбионтной флоры, противовоспалительную и бактериостатическую (в отношении патогенной микрофлоры) активность, поддержание необходимых значений pH в кишечнике.

**ПРОКАРИОТЫ** – организмы, у которых нет ограниченных мембранами ядра и органелл. К прокариотам относятся все бактерии. Промотор – участок молекулы ДНК, с которым связывается РНК-полимераза, что сопровождается инициацией транскрипции соответствующих генов. Обычно находится перед 5'-концом регулируемого гена.

**ПРОТЕИНАЗЫ, ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ** – ферменты, расщепляющие пептидные связи в белковых молекулах.

**ПРОТЕОЛИЗ** – ферментативное расщепление белков.

**РЕГУЛЯТОРНЫЙ БЕЛОК** – белок, «включающий» и «выключающий» транскрипцию.

**РЕКОМБИНАНТНАЯ ДНК** – молекула ДНК, полученная объединением *in vitro* разнородных, вместе нигде в природе не существующих, фрагментов ДНК.

**РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДА** – плазида, измененная методами генной инженерии. Состоит из участков разных плазмид либо содержит сегменты ДНК других организмов.

**РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК** – белок, кодируемый клонированной рекомбинантной ДНК.

**РЕНАТУРАЦИЯ** – одна из ключевых стадий получения рекомбинантных белков, в процессе которой денатурированный белок приобретает нативную пространственную структуру, обеспечивающую его биологическую активность.

**РЕПЛИКАЦИЯ** – процесс самовоспроизведения (синтеза) ДНК.

**РЕПРЕССИЯ** – один из двух альтернативных (наряду с индукцией) механизмов регуляции генов. Состоит в подавлении транскрипции или трансляции путем связывания белка-репрессора с оператором.

**РЕПРЕССОР** – белок, связывающийся с оператором или промотором данного гена и блокирующий связывание с этими элементами РНК-полимеразы.

**РЕСТРИКТАЗА. РЕСТРИЦИРУЮЩАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА** – бактериальный фермент, расщепляющий двухцепочечную молекулу ДНК в специфических сайтах.

**РИБОСОМА** – клеточная органелла, рибонуклеопротеидная частица, при участии которой осуществляется синтез белка (трансляция). Состоит из двух субъединиц: большой и малой.

**РНК-ПОЛИМЕРАЗА** – фермент, осуществляющий синтез РНК из рибонуклеозидтрифосфатов. Матрицей может служить ДНК или РНК, соответствующие РНК-полимеразы называют ДНК- или РНК-зависимыми.

**САЙТ ВСТРАИВАНИЯ** – специфический участок векторной молекулы, в который встраивают фрагмент чужеродной ДНК.

**САЙТ РЕСТРИКЦИИ** – нуклеотидная последовательность в молекуле ДНК, узнаваемая рестриктазой.

**СЕРОТИП** – антигенная характеристика клетки (бактерии, вируса, клетки крови и др.), установленная на основании её взаимодействия с антителами.

**СИНБИОТИКИ** – рациональная комбинация пробиотиков и пребиотиков.

**СИСТЕМА КИНИНОВ** – серия сывороточных пептидов. При последовательной активации вызывают расширение и повышенную проницаемость сосудов.

**СПЕЦИФИЧНОСТЬ, СПЕЦИФИЧНЫЙ** – термины, обозначающие избирательность иммунного ответа к вызвавшему его возбудителю, то есть выработку антител и лимфоцитов, специфичных к данному возбудителю. Так, например, антитела к вирусу полиомиелита не будут связываться ни с каким другим вирусом.

**СТРУКТУРНЫЙ ГЕН** – ген, кодирующий какой-либо белок.

**СУБЪЕДИНИЧНАЯ ВАКЦИНА** – вакцина, содержащая лишь отдельные компоненты патогенного микроорганизма.

**ТЕРМИНАЦИЯ** – остановка синтеза макромолекулы.

**ТОКСОИД (АНАТОКСИН)** – инактивированные формалином, но сохранившие антигенность бактериальные токсины (например, дифтерии, столбняка, ботулизма или газовой гангрены).

**ТРАНСГЕННЫЙ ОРГАНИЗМ** – организм, геном которого содержит чужеродный генетический материал, включенный методами геной инженерии.

**ТРАНСГЕНОЗ** – введение чужеродного гена в растительную или животную клетку и его передача в ряду поколений.

**ТРАНСДУКЦИЯ** – перенос генетического материала из одной бактериальной клетки в другую с помощью бактериофага.

**ТРАНСКРИПЦИЯ** – процесс синтеза РНК, катализируемый РНК-полимеразой, в котором в качестве матрицы используется одна из цепей ДНК.

**ТРАНСЛЯЦИЯ** – синтез полипептидной цепи рибосомой с использованием в качестве матрицы мРНК.

**ТРАНСФОРМАЦИЯ** – перенос генетической информации в бактериальные клетки с участием плазмид (или без них).

**ФАГОЦИТОЗ** – поглощение частиц клеткой. Наиболее важные фагоцитарные клетки, уничтожающие большую часть попавшего в организм чужеродного материала – макрофаги и полиморфно-ядерные лейкоциты.

**ФЕРМЕНТАЦИЯ** – в промышленной микробиологии – крупномасштабное культивирование микроорганизмов в специальных емкостях (биореакторах или ферментерах).

**ФЕРМЕНТНЫЙ ИММУНОСОРБЕНТНЫЙ АНАЛИЗ, ELISA** – метод обнаружения специфических молекул в образце. Образец фиксируют на твердой подложке и добавляют антитело, специфичное к маркерной молекуле (первое антитело). Несвязавшиеся молекулы первого антитела смывают и добавляют второе антитело, специфически связывающееся с первым. Ко второму антителу присоединен фермент, превращающий неокрашенный субстрат в окрашенный продукт. Проводят количественное определение окрашенного продукта.

**ФИМБРИИ** – используются бактериями для прикрепления к клеткам. Присоединение может быть заблокировано антителами.

**ШТАММ** – культура генетически однородных микроорганизмов.

**ЭКЗОГЕННАЯ ДНК** – ДНК, выделенная из организма-донора и встроенная в вектор или хромосомную ДНК организма-хозяина. Называется чужеродной и гетерологичной ДНК.

**ЭКЗОТОКСИН** – токсин, выделяемый микробной клеткой в окружающую среду.

**ЭЛОНГАЦИЯ** – последовательное присоединение мономеров к полимерной цепи.

**ЭНДОТОКСИН** – токсин, выделяемый клеткой в окружающую среду, входящий в состав клеточной мембраны; многие эндотоксины вырабатываются грамотрицательными бактериями и вызывают воспаление.

**ЭПИТОП, АНТИГЕННАЯ ДЕТЕРМИНАНТА** – часть молекулы антигена, взаимодействующая с антигенсвязывающим центром антител или T-клеточного рецептора.

**ЭУКАРИОТЫ** – организмы, у которых имеется ядро, где содержатся хромосомы; в цитоплазме присутствуют различные органеллы – митохондрии, хлоропласты и т.д. К эукариотам относятся животные, растения, грибы, некоторые водоросли.

#### ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ И ОЧИСТКИ БЕЛКОВ:

**ИОННО-ОБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ.** Ионообменники, как известно, представляют собой нерастворимый материал, содержащий химически связанные заряженные группы и подвижные противоположные ионы. Подвижные ионы могут быть обратимо замещены другими ионами с тем же зарядом без каких-либо изменений нерастворимой матрицы. Если матрица несет положительно заряженные группы, то подвижные ионы имеют отрицательный заряд, и такой ионообменник называется анионообменником. При наличии отрицательных групп матрицы и положительных ионов обмениваются катионы, и такой ионообменник называется катионообменником. Нерастворимой основной матрицей могут служить алюмосиликаты, синтетические смолы, полисахариды и т.д. Природа матрицы определяет механическую стабиль-

ность и проточные свойства ионообменника, а также степень неспецифического воздействия на белки. Наличие заряженных групп характеризует свойства ионообменника, определяет тип и активность ионного обмена. Общее число групп и их доступность для обмена также влияют на реакционную способность. Фенолгидроксильные, карбоксильные и сульфоновые группы используют для формирования катионообменников, алифатические или ароматические группы – для анионообменников.

Наибольшее распространение в препаративной химии белка нашли ионообменники на основе целлюлозы или декстрана (сефадексы). Эффективность применения этих ионообменников для разделения щелочных и нейтральных белков обусловила их применение не только в исследовательских целях, но и в промышленной биотехнологии.

Наиболее употребительные ионообменные целлюлозы:

- анионит – диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ-целлюлоза);
- катионит – фосфоцеллюлоза (Ф-целлюлоза);
- катионит – карбоксиметилцеллюлоза (КМ-целлюлоза).

**ГЕЛЬ – ФИЛЬТРАЦИЯ.** Термин «гель-фильтрация (хроматография)» объединяет способы разделения белков в условиях сетчатой структуры геля. Данный вид хроматографии находит все большее применение при разделении смесей белков благодаря высокой разрешающей способности, а также мягкому воздействию на белки, не вызывающему денатурационных изменений.

Гранулы геля с растворителем помещают в вертикальную колонку, на поверхностный слой наносят разделяемое вещество. При промывании колонки растворителем микрочастицы поступают в гель, который не препятствует диффузии небольших молекул, распределяющихся равномерно по всему сечению колонки. Более крупные молекулы белков не проникают в гранулы, остаются в окружающем их слое растворителя и движутся вместе с током жидкости. Поэтому крупные молекулы проходят слой геля с большей скоростью, чем мелкие, движение которых задерживается в результате диффузии в неподвижную фазу. Скорость продвижения молекул промежуточных размеров также различна за счет частичного проникновения их в гель. Таким образом, компоненты смеси элюируются с колонки, заполненной гелем, в порядке уменьшения их относительной молекулярной массы в соответствии со степенью торможения, вызванного диффузией в гранулы геля.

Современные методы молекулярной фильтрации и ионообменной хроматографии в гелях получили новое развитие после того, как в 1959 г. шведская фирма “Pharmacia” выпустила полимер декстрана «сефадекс», полученный из *Leuconostoc mesenteroides* обработкой декстрана эпихлоргидрином.

Гель, образованный из гранул этого полимера, представляет собой пространственное молекулярное сито, построенное из нитевидных молекул полисахарида декстрана, соединенных через определенные промежутки поперечными

связями. В зависимости от числа поперечных мостиков и их длины образуются различные по размеру ячейки. Типы сефадекса различаются по номерам, которые соответствуют размеру ячеек – чем больше размер ячеек, тем выше номер сефадекса. Первыми элюируются наиболее крупные молекулы, затем мелкие.

Некоторые типы сефадексов позволяют чередовать два различных принципа разделения белковых смесей при производстве вакцин или препаратов крови – ионообменный и молекулярной фильтрации. Они получают при введении ионных групп в сефадексы G-25 и G-50. Ионообменные сефадексы обладают высокой обменной емкостью и низкоспецифической адсорбцией, обеспечивают быстрое прохождение жидкости и хорошее разделение смеси белков. Наиболее часто для разделения биотехнологических продуктов используются следующие сефадексы:

- Анионообменные сефадексы: QAE-сефадекс, A-25, A-50 (QAE – аминоэтил-2-оксипропил аминоэтил); DEAE-сефадекс, A-25, A-50 (DEAE – диэтил-аминоэтил);
- Катионообменные сефадексы: SP-сефадекс, C-25, C-50 (SP-сульфопропил); CM-сефадекс, C-25, C-50 (CM-карбоксиметил).

**УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИЯ НА МЕМБРАНАХ.** Ультрафильтрация – процесс, с помощью которого смесь веществ различной молекулярной массы в жидкой фазе подвергается разделению при прохождении ее под давлением через мембраны, имеющие определенные размеры пор. Сегодня в биотехнологических исследованиях ультрафильтрация является общепринятым и доступным методом. Преимуществами этого метода является возможность обработки промышленных количеств биологического материала; относительно доступное оборудование; заданная температура, значения pH, необходимая концентрация компонентов могут поддерживаться на протяжении всего процесса; концентрация и очистка биологически активных компонентов; удаление балластных примесей различной природы и очистка от пирогенов. Несомненно, важным является возможность дополнительной стерилизующей фильтрации растворов через ультрафильтрационные мембраны, так как размер пор мембраны позволяет отделить микробную контаминацию. Необходимо также отметить, что данные мембраны обладают минимальной адсорбционной активностью, просто регенерируются и могут быть использованы неоднократно. Кроме того, процесс не обладает значительной энергоемкостью. Молекулы вещества, подвергаемого ультрафильтрации (молекулы размером до 100 нм), микрофильтрации (молекулы размером от 100 нм до 10000 нм) практически полностью сохраняют нативность структуры: отсутствие изменений агрегатного состояния и фазовых превращений. Эффективность фракционирования ультрафильтрацией может снижаться из-за воздействия ряда факторов:

✓ взаимодействие макромолекул с образованием пограничного слоя повышенной концентрации на границе раздела между мембранной и фильтруемым раствором;

✓ взаимодействие системы «мембрана – растворенное вещество».

Появление пограничного слоя обусловлено концентрационной поляризацией, которая происходит в результате значительной потери растворителя из раствора на границе его раздела с мембраной. Вследствие взаимодействий системы «растворенное вещество – мембрана» этот пограничный слой иногда необратим и образует слой геля, который видоизменяет поверхность мембраны. При разделении белковых молекул обнаружено, что для разделения фракций двух белков их молекулярные массы должны различаться не менее, чем на порядок. Благодаря тангенциальному потоку и его «смывающим» усилиям осевшие на мембране молекулы белка и вещества могут иметь более или менее одинаковую ориентацию. Именно тангенциальный поток нивелирует трансмембранный поток молекул растворенного вещества. Принцип работы разделительных аппаратов следующий: из емкости А рабочая смесь, подаваемая насосом, циркулирует по замкнутому контуру через ультрафильтрационные мембраны или полые волокна разделительных аппаратов и, обогащенная малопроницающим компонентом, возвращается в емкость А. При значительном снижении проницаемости полых волокон производится промывка разделительного аппарата обратным током. Рабочее давление при ультрафильтрации создается подпорным вентилем и контролируется по манометру. Во время работы аппаратов максимальное рабочее давление не должно превышать 0,2 МПа.

Сегодня рынок ультрафильтрационного и микрофильтрационного оборудования насыщен и предлагает широкий выбор продукции в зависимости от целей, поставленных производителем биологических продуктов. Хорошо зарекомендовала себя фирма Spectrum (США), производящая мембраны полисульфона и полиэтилсульфона для ультрафильтрации, микрофильтрации и обратноосмотической фильтрации (диализ). Spectrum выпускает более 2000 наименований, в том числе мембраны с порогом отсечения от 10 кДа до 400 кДа, мембраны с величиной пор 0,1; 0,2 и 0,5 мкм различных объемов с использованием различных методов стерилизации. В России производят широкий спектр полых волокон, изготовленных из ароматических полиамидов и нецеллюлозных материалов – полисульфона, фторопласта, полисульфонида.

**ИЗБИРАТЕЛЬНАЯ АДСОРБЦИЯ.** Проводится с целью адсорбции индивидуальных белков на органических и минеральных адсорбентах. Обычно используется как вспомогательная технологическая стадия. Адсорбция зависит от температуры, величины рН, ионной силы, химической структуры вещества и т.д. Адсорбция может быть применена для очистки целевого продукта на балластных примесях и для извлечения искомого компонента.

**ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ (ПЭГ).** Предложены схемы фракционирования белков ПЭГ с относительной молекулярной массой 4000–6000. Интерес к этому методу связан с тем, что фракционирование можно проводить при положительной температуре, и опасность денатурирующего воздействия на белки значительно меньше, чем при использовании для осаждения органических осадителей. Сложным является удаление ПЭГ из конечных растворов белков, которые были бы быть приемлемы в производственных условиях.

**ОСАЖДЕНИЕ В ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКЕ.** Молекулы белков содержат как кислотные, так и щелочные группы, которые, диссоциируя, определяют их потенциал. Прибавление кислоты к раствору сопровождается увеличением положительно заряженных молекул за счет снижения диссоциации групп, создающих отрицательный заряд. Щелочь, напротив, подавляет диссоциацию групп, придающих положительный заряд, и вся молекула увеличивает свою отрицательную заряженность. Можно достигнуть равновесия в диссоциации этих групп, и молекула будет обладать нулевым зарядом. Такое состояние молекулы, при котором количество положительно заряженных групп равно количеству отрицательных, т.е. когда заряд отсутствует, называется изоэлектрическим. В изоэлектрической точке (значение рН) белок обладает минимальной растворимостью. Использование изменения рН до величины, соответствующей изоэлектрической точке, позволяет разделить белки с различными изоэлектрическими точками путем фракционированного осаждения. Путем изменения рН сложную смесь белков разделяют на фракции, содержащие различные белки. Примером может служить осаждение белковых токсинов и анатоксинов при производстве вакцин.

**АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ.** Метод основан на взаимодействии лиганда, фиксированного на частицах носителя с аффинным компонентом с образованием прочного комплекса. Аффинная хроматография может использоваться для очистки антител, антигенов (токсинов и анатоксинов), ферментов и других биологически активных молекул. Хроматография позволяет выделять высокоочищенные продукты. Аффинная хроматография может обеспечить избирательную очистку компонентов вакцин. Так, например, с помощью моноклональных антител предложено выделение и очистка поверхностного антигена гепатита В (HBsAg). В качестве носителя используют нерастворимые компоненты – декстрановые, агарозные, полиакриламидные гранулированные гели. По данным литературы, агароза является наиболее перспективным материалом для гелей, который укрепляют путем сшивков. Хроматография, основанная на взаимодействии антигенов (гаптенов) и антител, получила название иммуноаффинной хроматографии.

**ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ И СЕПАРИРОВАНИЕ.** Центрифугирование (сепарирование) используется при производстве вакцин на многих этапах: отделение биомассы от культуральной жидкости; отделение специфических белковых токсинов в процессе очистки; отделение растворов от сорбентов и др. *Центрифугирование* – разделение неоднородных систем и осаждение взвешенных в жидкости микроорганизмов, белковых частиц под действием центробежных сил. Центрифугу используют в случае невозможности процесса фильтрации и необходимости быстрого и непрерывного процесса разделения. Эффективность центрифугирования повышается при увеличении диаметра частиц в суспензии, разности между плотностью частиц и плотностью окружающей жидкости, уменьшении вязкости жидкости, повышении угловой скорости вращения ротора, радиуса центрифугирования, увеличении объема жидкости и уменьшения толщины слоя жидкости, подвергнутой центрифугированию. Основной характеристикой центрифуг является безразмерный фактор разделения ( $Fr$ ), определяемый как:

$$Fr = \frac{W \cdot R}{g},$$

где  $W$  – угловая скорость течения жидкости;  
 $R$  – радиус барабана;  
 $g$  – ускорение поля тяжести.

Существуют два класса центрифуг по фактору разделения:

- нормальные ( $Fr$  менее 3500);
- суперцентрифуги ( $Fr$  более 3500).

Наиболее часто для получения вакцинных препаратов используются суперцентрифуги со скоростью вращения ротора от 15000 до 90000 об/мин. При работе суперцентрифуги суспензия через сопло питающей трубы подается в нижнюю часть ротора и, вращаясь вместе с ротором, протекает вдоль его стенок в осевом направлении. По мере продвижения вдоль ротора суспензия расслаивается в соответствии с плотностью её составных частей. При этом из жидкости выделяются твердые частицы, находящиеся во взвешенном состоянии, и осаждаются на стенках ротора, центрифуга через верхнее отверстие в головке ротора выводится в сливную камеру, а затем в сборник. Благодаря отсутствию резких изменений направления движения жидкости и турбулентных завихрений устраняется возможность попадания частиц обратно в суспензию. Центрифуги, имеющие высокий фактор разделения (до 12000 об/мин) и оснащенные тарельчатым барабаном, называют сепараторами. Сепараторы позволяют осуществлять центробежные разделения жидкости с наибольшей полнотой извлечения отдельных компонентов. По технологическому назначению сепараторы делят на три основных класса: сепараторы-разделители, применяемые для выделения жидкостей, нерастворимых

одна в другой, или концентрирования суспензий и эмульсий; сепараторы-осветлители, предназначенные для выделения твердых частиц из жидкости; комбинированные сепараторы – для выполнения двух или более операций переработки жидкости. Подача исходной культуральной жидкости в барабан производится сверху по неподвижной осевой трубке, откуда она через распределитель поступает в набор тарелок, где происходит отделение твердых частиц. Твердые частицы отбрасываются радиально в направлении действия центробежных сил, ударяются снизу об одну из конических тарелок, соскальзывают к краю тарелки и выбрасываются из межтарельчатого пространства в расположенные по периферии карманы, где и происходит их накопление. Осветленная жидкость поднимается к горловине барабана и выгружается с помощью напорного диска. Сегодня высокопроизводительные сепараторы и суперцентрифуги выпускают известные мировые производители: «Вестфалия», «Альфа-Лаваль» и др. При подборе необходимого оборудования определяющими моментами является состав разделяемой суспензии, необходимое время проведения процесса, температура сепарирования, возможность стерилизации оборудования и проведения процесса в асептических условиях.

**ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ В ГРАДИЕНТЕ ПЛОТНОСТИ.** *Очистка центрифугированием в градиенте плотности* – скорость седиментации (т.е. осаждения и отделения друг от друга) частиц в центробежном поле зависит от размера и форм частиц. Лучшее выделение частиц, характеризующихся одинаковой скоростью седиментации, может быть достигнуто, если центрифугирование производится в градиенте плотности. При этом проявляются два положительных свойства метода: зоны стабилизируются против деформации под воздействием конвекции, в качестве дополнительного параметра разделения в систему вводится так называемая плавучая плотность частицы. В градиенте плотности частицы продолжают оседать до тех пор, пока не достигнут своей изопикнической плотности. До того, как они достигнут этого уровня в градиенте, сепарация будет происходить согласно скорости седиментации данного размера, плавучей плотности частиц и, в меньшей степени, формы частиц. Для разделения в градиенте плотности используются различные вещества, например, Фиколл, представляющий собой синтетический высокомолекулярный сополимер сахарозы и эпихлоргидрина с молекулярной массой 400000; сахароза, хлористый цезий и другие.

**ФИЛЬТРАЦИЯ СТЕРИЛИЗУЮЩАЯ.** Данный вид фильтрации является обязательным этапом производства биологических препаратов. Причем стерилизующая фильтрация для большинства препаратов проводится не только на конечном этапе, но и на многих технологических стадиях при производстве. Это касается в первую очередь вакцинных препаратов, препаратов крови человека и животных, фагов и т.д. По технологическому назначению фильтры

можно разделить на две группы: глубинные фильтры и фильтры мембранные. Глубинные фильтры состоят из волокон, частиц или фрагментов, образующих единую массу, в которой имеются извилистые каналы или поры. Размеры пор варьируют и намного превышают размеры задерживаемых частиц. Фильтрующий эффект в этом случае обеспечивается суммарным действием различных факторов. К глубинному типу относятся целлюлозные пластины, керамические свечи, мелкопористое стекло и т.д. Глубинные фильтры имеют высокую поглотительную способность, т.к. различные биочастицы и микроорганизмы накапливаются в их матриксе. При подборе глубинных фильтров необходимо учитывать адсорбцию биологических веществ на матриксе фильтров (снижение титра антител в препаратах крови и потерю определенного количества антигена) и возможность попадания в профильтрованный раствор фильтрующего материала, что недопустимо, особенно на завершающей стадии производства вакцин или других биопрепаратов, вводимых путем инъекции. Мембранные фильтры для стерилизующей фильтрации характеризуются одинаковыми отверстиями с равномерным распределением по поверхности фильтра. Они обладают высокой эффективностью, так как задерживают контаминирующие частицы, размеры которых превышают размер пор фильтрующего материала, и имеют незначительную адсорбционную способность по сравнению с глубинными фильтрами (их толщина около 150–200 мкм). Полную стерильность обеспечивают мембранные фильтры, полученные в основном из очищенных эфиров целлюлозы (нитроцеллюлоза, ацетилцеллюлоза) и имеющие размер пор около 0,22 мкм. Фильтры для стерилизующей фильтрации выпускают и из других материалов (винильные полимеры, полиамиды, фторуглеродороды). Предлагаемые фильтры за счет высокой пористости и малой толщины обеспечивают низкое сопротивление течению жидкости (или газов) и тем самым способствуют высокой пропускной способности. Указанные фильтры устойчивы по отношению к фильтруемым материалам и, что крайне важно, выдерживают стерилизацию паром. В настоящее время фильтры для стерилизующей фильтрации выпускают «Миллипор», «Палл», «Кюно», «Сарториус» и др. Выпускаются также фильтры из фарфора, поликарбоната, на основе тетрафторэтилена. Все шире внедряются в фармацевтическую практику фильтры с величиной пор около 0,1 мкм. Стерилизующая фильтрация является одной критических точек производства биопрепаратов и, бесспорно, должна быть валидирована путем подбора оптимальных условий фильтрации и фильтров для конкретного вакцинного препарата. Обычно препарат подвергают стерилизующему фильтрованию через предфильтр и, при необходимости, через каскад мембран с уменьшением по ходу протока размеров пор: 1,2, 0,8, 0,65, 0,45, 0,22 мкм.

**ДЕЗИНТЕГРАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.** Для выделения некоторых антигенов, находящихся в биологических структурах клеток микроорганизмов, например, бактерий коклюша, первоочередной задачей является разрушение клеточной оболочки – *дезинтеграция*. Разрушение клеточной оболочки происходит при достижении в ней механических напряжений, равных пределу прочности оболочек. Наиболее эффективными методами разрушения клетки являются методы экструзионной и ультразвуковой дезинтеграции. Экструзия – это разрушение клеток бактерий за счет взаимодействия их с однородно движущейся средой при возникновении поперечных градиентов скорости и неоднородного распределения давления. При гомогенизации под высоким давлением концентрированную клеточную суспензию продавливают через небольшое отверстие под высоким давлением, а затем давление резко сбрасывают, что и вызывает лизис. Еще один механизм разрушения клеток – соударение. Клеточную суспензию большой вязкости направляют под давлением на неподвижную поверхность или навстречу потоку другой суспензии. Вместе соприкосновения выделяется большое количество энергии, разрушающей клетки. При этом сохраняется структура биологически активных молекул, т.к. однократное силовое воздействие на целые оболочки клеток происходит практически без выделения тепла. Ультразвуковая дезинтеграция происходит за счет явления кавитации. Кавитация – физическое явление, вызываемое при действии ультразвука возникновение высокоградиентных микропотоков, ударных волн, локальных скачков давления и температуры. Частота и интенсивность ультразвука должны быть не менее 20 кГц. Разрушение клеток можно проводить методом замораживания-оттаивания, при котором осуществляют многократно чередующиеся операции замораживания и оттаивания бактериальных клеток, или с помощью обработки ферментами, например, лизоцимом и протеазой. Одним из методов, применяемых при выделении антигенных компонентов, является обработка бактерий детергентами – полярными соединениями, содержащими гидрофобные и гидрофильные компоненты. Взаимодействие этих соединений с компонентами клеточной мембраны способствует переходу в раствор поверхностных антигенов. Возможно несколько механизмов взаимодействия детергентов с бактериальными клетками: нарушение проницаемости клеточной мембраны; лизис клеток в результате связывания детергентов с ионогенными группами клеточных мембран; денатурация клеточных белков и нарушение функционирования клеточных ферментов. Для обработки бактерий используют детергенты: анионогенные (дезоксихолат и лаурилсульфат), катионогенные (цетавлон) и неионогенные (твин).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абаев И.В. Стабильная экспрессия гетерологичных белков в SALMONELLA: проблемы и подходы к их решению / И.В. Абаев, Э.А. Светоч, Н.Н. Ураков – Вестник Российской АМН, 1997. – С. 48–52.
2. Аладышева Ж.И. Основные принципы проведения валидации на фармацевтическом производстве / Ж.И. Аладышева, В.В. Береговых, А.П. Мешковский – М., 2005. – 185 с.
3. Алексеев В.И. Прикладная молекулярная биология / В.И. Алексеев, В.А. Каминский – М. Комкнига, 2005. – 200 с.
4. Артеменко Е. Вакцинация против кори и аутизм. Есть ли связь? / Е. Артеменко – Ежедневник Аптека, 2006. – С. 10–12.
5. Бабич Е.М. Динаміка формування гуморального імунітету при пероральному введенні ліпосомальних і модифікованих форм соматичних антигенів збудників дифтерії та кашлюка / Е.М. Бабич, В.І. Белозерський, Ю.М. Краснопольський – Експериментальна і клінічна медицина, 2004. – С. 120–123.
6. Бейли Дж. Основы биотехнологической инженерии. В 2 частях / Дж. Бейли, Д.М. Оллис – Мир, 1989. – 562 с.
7. Белоус А.М. Научные основы сублимационного консервирования / А.М. Белоус, И.Д. Цветков – Киев, 1985.
8. Береговых В.В. Нормирование фармацевтического производства / В.В. Береговых, А.В. Мешковский – М., 2001. – 527 с.
9. Бондаренко В.М. Пробиотики, пребиотики и симбиотики в терапии и профилактике кишечных дисбактериозов / В.М. Бондаренко, Н.М. Гачева – Фарматека, 2003. – С. 56–63.
10. Брок Т. Мембранная фильтрация / Т. Брок – М. Мир, 1987. – 464 с.
11. Букринская А.Г. Молекулярные основы патогенности вирусов / А.Г. Букринская, В.М. Жданов – М. Медицина, 1991. – 255 с.
12. Вейсфейлер Ю.К. Биология и изменчивость микобактерий туберкулеза и атипичные микобактерии / Ю.К. Вейсфейлер – Будапешт, 1975. – 334 с.
13. Воробьев А.А. Адьюванты / А.А. Воробьев, Н.Н. Васильев – М. Медицина, 1969. – 205 с.

14. Гельперин Н.И. Основные процессы и аппараты химической технологии / Н.И. Гельперин – М. Химия, 1981.
15. Гольбец И.И. К 100-летию предприятия «Биолек» / И.И. Гольбец, Ю.П. Темиров, Ю.М. Краснопольский – Научные исследования.
16. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак – М. Мир, 2002. – 590 с.
17. Далин М.В. Белковые токсины микробов / М.В. Далин, Н.Г. Фиш – М. Медицина, 1980. – 224 с.
18. Державна фармакопея України. Первое издание – Харьков, 2001. – 530 с.
19. Державна фармакопея України. Первое издание. Дополнение 2 – Харьков, 2008. – 617 с.
20. Дудниченко А.С. Липосомальные лекарственные препараты в эксперименте и клинике / А.С. Дудниченко, Ю.М. Краснопольский, В.И. Швец – Харьков, РА-Каравелла, 2001. – 143 с.
21. Егорова Т.А. Основы биотехнологии / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина – М. Академия, 2003. – 208 с.
22. Ершов Ф.И. Интерферон. В кн. Общая и частичная вирусология. Том 1 / Ф.И. Ершов – М., Медицина, 1982. – С. 323–341.
23. Жибурт Е.Б. Трансфузиология / Е.Б. Жибурт – Питер, 2002. – 732 с.
24. Зеленин А.В. Генная терапия на границе третьего тысячелетия / А.В. Зеленин – Вестник РАН, 2001. – С. 387–395.
25. Кестинг Р.Е. Синтетические полимерные мембраны / Р.Е. Кестинг – М. Химия, 1991. – 320 с.
26. Краснопольский Ю.М. Фармакопейные лекарственные средства для терапии и профилактики дисбактериозов кишечника / Ю.М. Краснопольский – Провизор, 2007. – С. 24–27.
27. Лахтин В.М. Нанотехнологии и перспективы их использования в медицине и биотехнологии / В.М. Лахтин, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин – Вестник РАМН, 2008. – С. 50–55.
28. Ляшенко В.А. Молекулярные основы иммуногенности антигенов / В.А. Ляшенко, А.А. Воробьев – М. Медицина, 1982. – 272 с.
29. Мертвцов Н.П. Современные подходы к конструированию молекулярных вакцин / Н.П. Мертвцов, А.Б. Беклемишев, И.М. Савич – Новосибирск, Наука, 1987. – 210 с.



30. Митина В.Х. Выделение и очистка биополимеров методами аффинной хроматографии. Получение, свойства и применение аффинных сорбентов с иммобилизованными полипептидами / В.Х. Митина, Н.А. Французова, Ю.М. Краснополяский – Биоорганическая химия, 1989. – С. 1468–1474.

31. Попов В.Ф. Лекарственные формы интерферонов / В.Ф. Попов – М. Триада-Х, 2002. – 136 с.

32. Русанов В. Лечебные препараты крови / В. Русанов, И. Левин – М. ИД-медпрактика, 2004. – 283 с.

33. Свердлов Е.Д. Очерки современной молекулярной генетики / Е.Д. Свердлов – Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 1997. – С. 3–28.

34. Сорокулова И.Б. Изучение безопасности бацилл-пробиотиков / И.Б. Сорокулова, И.Г. Осипова, Н.В. Терешкина – Вестник Рос. АМН, 2006. № 1. – С. 50–54.

35. Степанов А.Е. Физиологически активные липиды / А.Е. Степанов, Ю.М. Краснополяский, В.И. Швец – М. Наука, 1991. – 136 с.

36. Теста Д. Композиция альфа-интерферона и способ её получения из лейкоцитов крови человека / Д. Теста, М.Д. Лиано, А. Рамидбайджи – Патент РФ № 2129937, 1999.

37. Тихонов И.В. Биотехнология / И.В. Тихонов, Е.А. Рубан, Т.Н. Грязнева – С-Петербург. Гиорд, 2008. – 703 с.

38. Хейломский А.Б. Иммунологические препараты. Аспекты GMP / А.Б. Хейломский – В сборнике докладов научно-практической конференции «Стандартизация, контроль и производство иммунобиологических и лекарственных препаратов». Харьков, 1998. – С. 75–90.

39. Чолаков В. Ученые и открытия / В. Чолаков – М., Мир, 1987. – 369 с.

40. Adams G.D.J. Freeze-drying of biohazardous products, in Biosafety in Industrial Biotechnology / G.D.J. Adams, P. Hambleton, J. Melling – Blackie Academic and Professional, London. 1994. – P. 178–212.

41. Allen T.D. Regulation of ribosomal protein synthesis in *Vibrio cholerae* / T.D. Allen, T. Watkins, G. Lindahl – J. Bacteriol, 2004. – P. 17–186.

42. Bannister B. Virus vaccines and antisera / B. Bannister, T.N. Begg – In book Topley W. and Wilson G. Principles of bacteriology, virology and immunity Eighth Edition. V. 4. Virology. – P. 185–205.

43. Bousquet J. Role of Ribomunyl in the Prevention of Recurrent Respiratory Tract infection in Adults: Overview of Clinical Results / J. Bousquet, O. Dario – Treatments in Respiratory Medicine, 2006. – P. 317–324.

44. Cohen J. Naked DNA points way to vaccines / J. Cohen – Science, 1993. – P. 259, 1691–1692.

45. Deoker M.D. Comparative trial in infants of four conjugate *Hemophilus influenzae* type b in vaccines / M.D. Deoker – J. Pediatr, 1992. – P. 120, 184–189.

46. Fritzell B. Efficacy and safety of *Hemophilus influenzae* b capsular polysaccharide-tetanus conjugate vaccine / B. Fritzell, S. Plotkin – J. Pediatr, 1992. – P. 121, 355–362.

47. Grandi G. Genomics, proteomics and vaccines / G. Grandi, J. Willey – England, 2004. – 313 p.

48. Guidelines on pre-approval inspections. Good manufacturing practices for sterile products. WHO Expert Committee on biological standardization. Thirty-sixth Report. WHO Technical Report Series 902 – Geneva, 2002. – P. 73–101.

49. Ioshimoto L.M. Safety and immunogenicity of hepatitis B vaccine Butang in adults / L.M. Ioshimoto, M.L. Rissato, V.S.J. Bonilha – Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 1999. – P. 191–193.

50. Just M. Reactogenicity and immunogenicity of a recombinant hepatitis B vaccine compared with plasma-derived vaccine in young adults / M. Just, R. Berger, V. Just – Postgrad. Med. J., 1987. – P. 121–123.

51. Kayhty H. Serum antibodies after vaccination with *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide and responses to reimmunization: no evidence of immunologic tolerance or memory / H. Kayhty, V. Karanko, H. Peltola – Pediatrics, 1984. – P. 74, 857–865.

52. Lal R. Edible vaccine: Current status and future / R. Lal, V.C. Ramachandran, R. Gogal – Indian J. of Medical Microbiology, 2007. – P. 93–102.

53. Mastrobattista E. Artificial viruses: A nano-technological approach to gene delivery. Nature Rev / E. Mastrobattista, A.E. Marieke, H. Wim – Drug Discov, 2006. – P. 115–121.

54. Naito S. Induction of protection against tetanus toxin in mice by tetanus toxoid liposome conjugate / S. Naito, A. Horino, T. Komiya – Int. Arch. Allergy Immunol, 1998. – P. 215–219.

55. Rightsel W.A. Freezing and freeze-drying of viruses / W.A. Rightsel, D. Greiff – Cryobiology, 1967. – P. 423–431.

Навчальне видання

КРАСНОПОЛЬСЬКИЙ Юрій Михайлович  
БОРЩЕВСЬКА Марина Іллівна

**ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ.  
ТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА  
ІМУНОБІОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ**

Навчальний посібник

для студентів (у томк ччислі іноземних)  
біотехнологічного напрямку

Російською мовою

Роботу до видання рекомендував *М. Г. Зінченко*  
В авторській редакції  
Комп'ютерна верстка *Л. В. Северіна*

План 2009 р., поз. 117/116-09

Підп. до друку 02.11.09. Формат 60 × 84 1/16. Папір офісний.  
Riso-друк. Гарнітура Таймс. Ум. друк. арк. 20,4. Наклад 100 прим.  
Зам. № 323. Ціна договірна.

---

Видавничий центр НТУ „ХПІ”.  
Свідоцтво про державну реєстрацію ДК № 116 від 10.07.2000 р.  
61002, Харків, вул. Фрунзе, 21

---

Друкарня НТУ “ХПІ”, 61002, Харків, вул. Фрунзе, 21