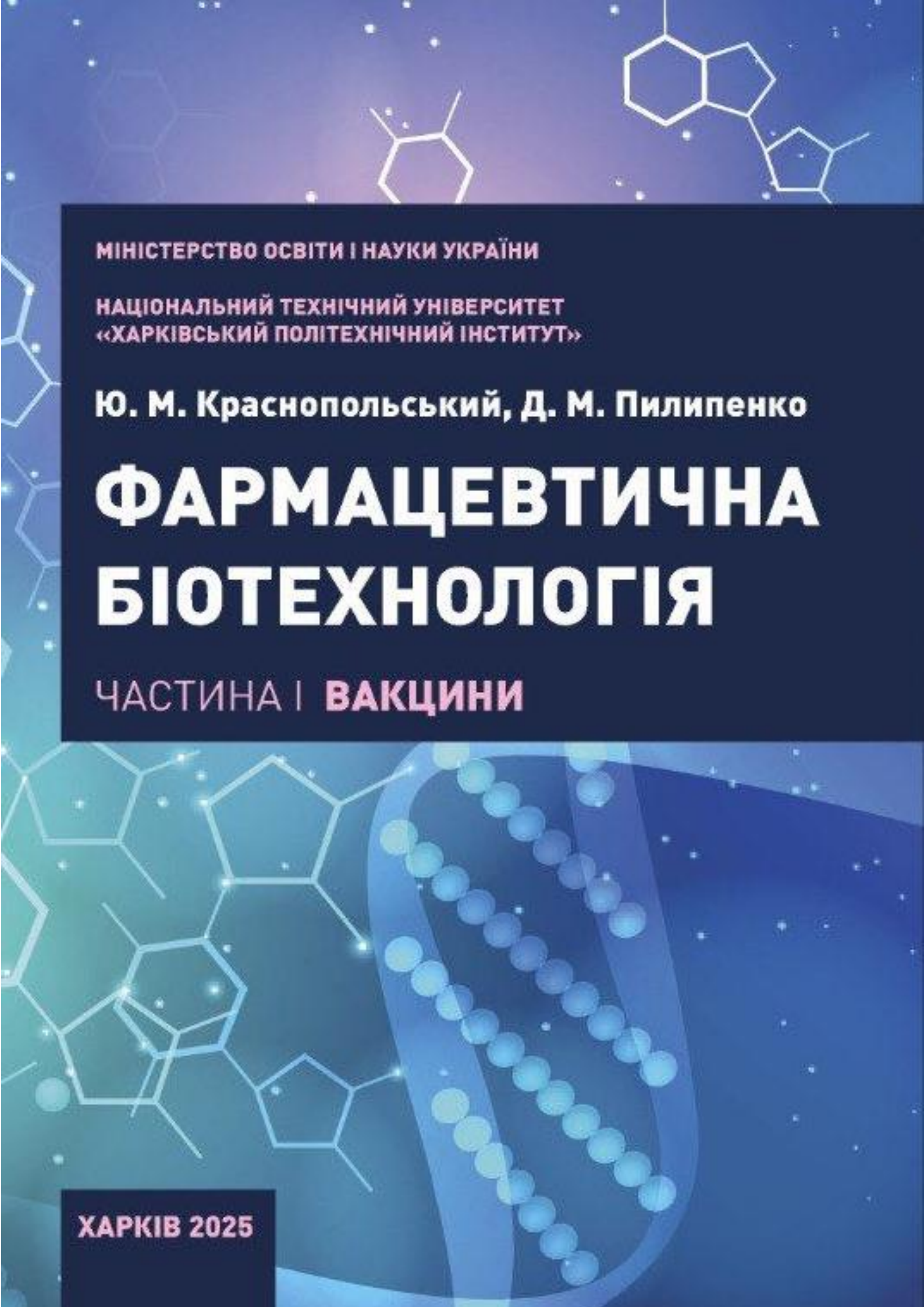




МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
«ХАРКІВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ»

Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко

ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ

ЧАСТИНА I **ВАКЦИНИ**

ХАРКІВ 2025

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
«ХАРКІВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ»

Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко

ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ
ЧАСТИНА І. ВАКЦИНИ

Підручник
для студентів спеціальності
«Біотехнології та біоінженерія»

Затверджено Вченою радою НТУ «ХПІ»

Харків
Друкарня Мадрид
2025

УДК 615.012(075):602.4(075):577(075)

К 78

Рецензенти:

Г. С. Григор'єва, д-р хім. наук, проф.,
ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»;
Л.О. Бобрицька, д-р фарм. наук, проф.,
Національний фармацевтичний університет

*Затверджено Вченою радою НТУ «ХПІ» як підручник
для студентів спеціальності «Біотехнології та біоінженерія»,
протокол № 10 від 27 грудня 2024 р.*

Краснопольський Ю.М.

К 78 Фармацевтична біотехнологія: Частина І. Вакцини : підручник для студентів біотехнологічних спеціальностей / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : Друкарня Мадрид, 2025. – 443 с. : ISBN 978-617-8254-01-8

У підручнику описані останні досягнення у галузі фармацевтичної біотехнології зі створення вакцинних препаратів, у тому числі вакцин, які входять до національного календаря щеплень, та препаратів нового покоління – рекомбінантних, ліпосомальних, мРНК-вакцин.

Призначено для бакалаврів, магістрів та аспірантів біотехнологічного напрямку.
Іл. 73, Табл. 24, Бібліогр. 324 назви.

УДК 615.012(075):602.4(075):577(075)

ISBN 978-617-8254-01-8

© Ю.М. Краснопольський, Д.М. Пилипенко, 2025
© НТУ «ХПІ», 2025
© ТОВ «Друкарня Мадрид», 2025

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. МЕТОДИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ У ТЕХНОЛО- ГІЯХ ВИРОБНИЦТВА ІМУНО- ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ	8
1.1. Процеси екстракції	11
1.2. Хроматографічні методи	13
1.2.1. Афінна хроматографія	13
1.2.2. Гель-фільтрація, або ексклюзійна хроматографія	20
1.2.3. Іонно-обмінна хроматографія	26
1.3. Методи центрифугування	28
1.3.1. Центрифугування та сепарування	28
1.3.2. Центрифугування у градієнті щільності	31
1.4. Методи осадження	32
1.4.1. Фракціонування за допомогою поліетиленгліколю (ПЕГ)	32
1.4.2. Метод ізоелектричного осадження	32
1.4.3. Осадження білків сульфатом амонію	33
1.5. Вибіркова (селективна) адсорбція	35
1.6. Ультрафільтрація на мембранах (тангенційна фільтрація). Діаліз	35
1.7. Фільтрація та стерилізуюча фільтрація	38
1.8. Дезінтеграція мікроорганізмів	40
1.9. Ліофілізація імунобіотехнологічних препаратів	42
1.9.1 Технологічний процес ліофілізації	42
1.9.2. Кріопротектори при ліофілізації	50
1.10. Методи аналізу та характеристики білкових молекул	52
Запитання для самоконтролю	56
Список джерел інформації до розділу 1	57

РОЗДІЛ 2. ІСТОРІЯ СТВОРЕННЯ ВАКЦИН. КЛАСИФІКАЦІЯ ВАКЦИН. АНТИГЕНИ ТА ІМУННА ВІДПОВІДЬ. ГАПТЕНИ. АД'ЮВАНТИ	61
2.1. Історія створення вакцин	61
2.2. Класифікація вакцин	66
2.3. Антигени та імунна відповідь. Гаптени	71
2.4. Ад'юванти	84
Запитання для самоконтролю	92
Список джерел інформації до розділу 2	92

РОЗДІЛ 3. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ОТРИМАННЯ СУЧАСНИХ ВАКЦИННИХ ПРЕПАРАТІВ	95
3.1. Живі вакцини	95
3.1.1. Класичні стратегії	96
3.1.2. Реасортантні геноми	99
3.1.3. Термочутливі мутанти	101
3.1.4. Хімічний мутагенез	101
3.1.5. Рекомбінантні віруси	102
3.1.6. Рекомбінантні бактерії	102
3.1.7. Рекомбінантні вектори	103
3.2. Біотехнологія одержання рекомбінантних препаратів	107
3.2.1. Продуценти для генно-інженерної біотехнології	108
3.2.2. Технологічні принципи отримання рекомбінантних продуктів	126
3.2.3. Рекомбінантні вакцини	134
3.3. Рослинні вакцини	135
3.4. ДНК-вакцини. Вірусна та бактеріальна доставка	143
3.5. Вакцини на основі полісахаридів	151
3.5.1. Прямі полісахаридні вакцини	151
3.5.2. Кон'югати полісахаридних вакцин	152
3.6. Субодиничні вакцини	157
3.7. Мукозальні вакцини	160
3.8. Рибосомальні вакцини	169
3.9. Білкові та пептидні вакцини	171
3.10. Цілісні патогени у складі вакцин (інактивовані вакцини)	179
3.11. Екзосомальні вакцини. Перспективи отримання	181

Запитання для самоконтролю	185
Список джерел інформації до розділу 3	186

РОЗДІЛ 4. ВАКЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОГО КАЛЕНДАРЯ ЩЕПЛЕНЬ

УКРАЇНИ	197
4.1. Протибактеріальні вакцини.....	198
4.1.1. Вакцини для профілактики дифтерійної інфекції	198
4.1.2. Вакцини для профілактики правцевої інфекції.....	214
4.1.3. Вакцина для профілактики кашлюкової інфекції: клітинна та ацелюлярна	225
4.1.4. Отримання адсорбованої кашлюково-дифтерійно-правцевої вакцини (АКДП).....	238
4.1.5. Вакцини для профілактики мікобактеріальної інфекції	247
4.1.6. Вакцини для профілактики Ніб-інфекції	261
4.2. Протівірусні вакцини	273
4.2.1. Механізми протівірусного імунітету	273
4.2.2. Характеристика вірусів, проти яких спрямована дія вакцин .	280
4.2.3. Вакцини для профілактики кору, краснухи та епідемічного паротиту.....	285
4.2.4. Вакцини для профілактики поліомієліту	313
4.2.5. Вакцини для профілактики гепатиту В.....	328
4.3. Комбіновані вакцини	345
Запитання для самоконтролю	350
Список джерел інформації до розділу 4	351

РОЗДІЛ 5. СУЧАСНІ ПРИНЦИПИ СТВОРЕННЯ ВАКЦИН.....

5.1. Вакцини для профілактики вірусу папіломи людини	358
5.2. Антирабічні вакцини.....	365
5.3. Вакцини для профілактики COVID-19	378
5.4. Вакцини проти вірусів Ебола та Зіка	37891
5.5. Ліпосомальні форми ад'ювантів і вакцин	394
5.5.1. Протівірусні вакцини у ліпосомальній формі.....	399
5.5.2. Антибактеріальні вакцини у ліпосомальній формі	404
5.5.3. Протипухлинні вакцини у ліпосомальній формі	416
5.6. Вакцина для профілактики гепатиту А.....	423
Запитання для самоконтролю	435
Список джерел інформації до розділу 5	435

ВСТУП

Шановний читачу! Представлений Вашій увазі підручник є 1-шою частиною огляду біотехнологій імунобіологічних препаратів: вакцин, цитокінів, пробіотиків, антитоксинів, моноклональних антитіл та інших препаратів, що належать до профілактичних, діагностичних та лікарських препаратів.

Вакцини є першими фармацевтичними препаратами, які були створені на основі біотехнології. Все, імовірно, почалося з давніх китайців і арабів, які багато століть тому помітили, що людина, яка перенесла віспу, рідко занедужує на неї знову. У X ст.н.е. в Китаї вперше було розроблено вакцину проти віспи. Жодній медичній науці людство не зобов'язане порятунком стількох життів, як вакцинології. Сьогодні створено вакцини проти понад 40 соціально значущих інфекцій, що призвело до значного зниження захворюваності на дифтерію, правець, кір, туляремію, поліомієліт та зникнення віспи.

Неможливо сьогодні уявити наше життя без рекомбінантних білкових субстанцій, у тому числі й ряду вакцин. Істотно змінилася профілактика інфекційних захворювань людини зі створенням вакцин нового покоління для профілактики: грипу, гепатиту, малярії, оперізуючого лишая та ін. Тріумфом вакцинології останніх років стало створення вакцин проти COVID-19, що було єдиною можливістю боротьби проти пандемії цього захворювання і врятувало мільйони людей. Постійно проводяться роботи зі створення нових вакцин для профілактики туберкульозу, сказу, дифтерії та ін. Створюються протипухлинні вакцини.

Фармацевтична біотехнологія, зокрема імунобіотехнологія, має великі перспективи на світовому фармацевтичному ринку через постійне зростання потреб охорони здоров'я. Інтенсивний розвиток біотехнології, біохімії, імунології визначив прогрес у розвитку світової фармації та створення високоефективних вакцин як традиційних, так і вакцин нового покоління, препаратів крові, інтерферонів, цитокінів та рекомбінантних продуктів різної спрямованості. З розвитком технології рекомбінантної ДНК

стало можливим створення вакцин наступного покоління, позбавлених недоліків традиційних вакцин.

Широкий спектр біотехнологічних препаратів, що застосовується сьогодні у світовій практиці, вимагає подальшого дослідження і є предметом обговорення даної публікації. Нами будуть розглянуті технологічні схеми отримання вакцин різного походження, у тому числі генно-інженерних препаратів. Технології, наведені в даній публікації, є принципово можливими схемами отримання біотехнологічних препаратів і не є технологією конкретного виробника. Спроба їх відтворення не може закінчитися успішно, оскільки наведено лише загальні характеристики процесів, які дозволяють уявити й оцінити сучасний стан проблеми.

Необхідно зазначити, що цей підручник не має аналогів в Україні. Дана публікація є продовженням серії навчальних посібників НТУ «ХП» за спеціальністю «Фармацевтична біотехнологія».

Можна сподіватися, що представлений на суд читачів матеріал сприятиме розвитку знань студентів та аспірантів, а також всіх зацікавлених читачів, про виробництво, контроль та застосування фармацевтичних субстанцій, отриманих біотехнологічними методами.

РОЗДІЛ 1. МЕТОДИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ У ТЕХНОЛОГІЯХ ВИРОБНИЦТВА ІМУНО- ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

Технології одержання імунобіологічних препаратів (вакцин, цитокінів, факторів згортання крові та ін.) та препаратів, одержаних біотехнологічними методами (вітаміни, антибіотики, фосфоліпіди, рекомбінантні гормони та ін.), включають стадії, на яких використовуються загальноприйняті методи:

- ✓ руйнування клітин;
- ✓ осадження білків (амоній сірчаноокислий, хлорид кальцію, ПЕГ, ізоелектрична точка та ін.);
- ✓ освітлення розчинів (глибинна і мембранна фільтрація, тангенціальна фільтрація (ультрафільтрація), центрифугування, сепарування, центрифугування в градієнті щільності сахарози, хлориду цезію, фіколу (синтетичний низькомолекулярний полімер сахарози та епіхлоргідрину) та ін.);
- ✓ хроматографічні методи (ексклюзійна, іонообмінна, гідрофобна, афінна хроматографія та ін.);
- ✓ для контролю та ідентифікації одержаних продуктів використовують такі методи: імуноферментного аналізу, електрофорезу в поліакриламідному гелі без детергенту та з додецилсульфатом натрію, вестерн-блотингу та ін.

Мета цього розділу – дати *загальні уявлення про методи виділення та очищення білкових препаратів*. В імунобіотехнології використовуються різні білкові молекули, отримані з бактерій, вірусів, рослинних та тваринних тканин, а також рекомбінантні продукти, отримані з використанням зазначених систем експресії. При виробництві ряду вакцин на основі полісахаридів застосовуються методи виділення та очищення полісахаридних молекул бактерій, як у нативному вигляді, так і у вигляді модифікованих молекул.

Очищення природних та рекомбінантних білків включає кілька етапів, які ґрунтуються на відмінностях у розмірі, заряді, гідрофобності та

афінності зв'язування зі специфічними лігандами. Для білків, які секретуються із клітини, потрібна мінімальна підготовка зразків, тоді як для внутрішньоклітинних білків потрібно здійснити лізис клітин за допомогою механічних і немеханічних процедур з подальшим осадженням з використанням солей, хімічних речовин, ізоелектричної точки для отримання цільового білка в комплексі з іншими біомолекулами. Іонообмінна, гідрофобна та/або афінна хроматографія є заключним етапом, які можна використовувати послідовно для очищення білка. Оскільки протеази також вивільняються під час лізису клітин, необхідно запобігти протеолізу за допомогою інгібітору протеази або проводити очищення при низькій температурі.

Виділення білків з біоматеріалів та вивчення їх будови та функцій мають велике значення для розуміння закономірностей життєдіяльності та сутності біологічних явищ. Тому вчені запропонували нову концепцію *протеоміки*, у якій важливу роль відіграє технологія розділення білків. Вона широко використовується у біотехнологічній промисловості, біологічних дослідженнях, розробці ліків, вивченні механізму захворювань. У цьому розділі розглянуто методологію розділення білків методами екстракції, осадження, мембранного розділення, хроматографії, електрофорезу тощо. Більшість імунобіологічних препаратів представлені білками: вакцини, інтерлейкіни, інтерферони, препарати фагів, моноклональні антитіла, імунні сироватки та ін. Широко представлені препарати на основі рекомбінантних білків. Порівнюючи протеоми патологічних та нормальних тканин чи живих організмів, ми можемо виявити деякі специфічні для захворювання білки, які можна використовувати як білки-мішені для терапевтичних препаратів або молекулярних маркерів для діагностики захворювань.

Розвиток та застосування протеоміки невіддільні від технології розділення та ідентифікації білків. Природні білки переважно є сумішами, і багато важливих білків містяться в біоматеріалах у малих кількостях, тому виділення білків без зміни їх структури, складу та активності завжди становить труднощі у дослідженнях протеоміки. З розвитком технологій розділення білків стали застосовуватися багато нових методів, таких як двофазна водна екстракція, твердофазна екстракція, метод ізоелектричного осадження, методи з використанням органічного розчинника, діаліз, ультрафільтрація, хроматографія, електрофорез, сепарація та центрифугуван-

ня, кристалізація тощо. Залежно від властивостей білків розвивається тенденція до їх розділення за допомогою комбінації кількох методів, що дозволяє підтримувати активність та структуру білків та отримувати більшу роздільну здатність.

Важливим компонентом ряду вакцин є капсульні полісахариди, що входять до складу препаратів для профілактики інфекцій, наприклад, вакцини проти *Haemophilus influenzae* або *Neisseria meningitidis*. Виділення полісахаридів залежить від їхньої хімічної структури та розчинності. Для виділення полісахариду із зазначених мікроорганізмів використовують таку методологію: полісахарид осаджують з використанням катіонного детергенту, збирають, солюбілізують, осаджують полісахарид чистим етанолом або сумішшю етанол : вода, фільтрують, а потім осаджують полісахарид солями кальцію або натрію. Для очищення полісахаридів бактерій можна використовувати аніонообмінну хроматографію на ДЕАЕ-целюлозі, а потім використовувати гель-фільтрацію, наприклад, на сефадексі G-100.

Продукція біотехнологічних препаратів починається з культивування мікроорганізмів (бактерій та вірусів), клітин тварин, фагів тощо у ферментерах з мішалками або спеціальних одноразових біореакторах (наприклад, *Biostat STR*, фірми *Sartorius* – пакети або контейнери такого біореактора виготовлені з гнучкого, нетоксичного, стерильного пластику, такого як поліетилен або поліпропілен, призначені для одноразового використання, легко підключаються до інших компонентів системи біореактора та замінюються). При цьому використовуються різні системи контролю температури, подачі поживних речовин та аерації. Потім проводять збір виробленого біоматеріалу та піддають його багатостадійному очищенню від баластних компонентів з використанням наведених в даному розділі методів. На сьогоднішній день *стратегію очищення імунобіологічних препаратів* (вакцин, моноклональних антитіл, цитокінів та ін.) можна розділити на три етапи:

1-й етап – концентрування та ізолювання молекули-мішені для видалення її з оточення, яке може призвести до її інактивації або повної втрати;

2-й етап – видалення більшої частини забруднюючих баластних компонентів;

3-й етап – максимальне видалення залишкових кількостей домішок за допомогою високоефективних способів очищення.

При цьому необхідно враховувати, що домішки можуть бути подібними до цільових молекул. Одним з найефективніших методів, що використовуються для очищення імунобіологічних препаратів, є різні види хроматографії. Хроматографія є потужним інструментом і придатним для масштабування методом для досягнення максимальної чистоти при обробці препаратів і видаленні баластних домішок. Використання хроматографії може скоротити стадії технологічного процесу, збільшити вихід цільового продукту та інтенсифікувати процес отримання продукту. На різних технологічних етапах отримання цільового продукту і на стадії виготовлення готового препарату використовуються фільтри різної структури із різним розміром пор – глибинні та мембранні, у тому числі і заряджені.

1.1. Процеси екстракції

Під час виробництва низки біотехнологічних продуктів використовують процес екстракції, тобто процес вилучення. Для здійснення процесу екстракції та отримання екстракту необхідні: об'єкт екстракції (мікроорганізми, тваринна або рослинна тканина, розчин тощо), оптимальна температура та обладнання. Метод та режим екстрагування (температура, час, рН, умови перемішування та ін.) встановлюють експериментально.

Екстракція – процес розділення суміші твердих та рідких речовин за допомогою вибірових (селективних) розчинників – екстрагентів. Фізична сутність екстракції полягає в переході компонента, що вилучається, з однієї фази (рідкої або твердої) у фазу рідкого екстрагента при їх взаємному зіткненні. Екстраговані компоненти переходять з вихідного розчину в розчинник внаслідок різниці концентрацій.

Екстракція поділяється на твердо-рідинно-фазну, наприклад, продукт з мікробної клітини переходить у рідину, та рідинно-фазну – перехід продукту з однієї рідкої фази в іншу. Інтенсивність екстракції визначається дифузійними процесами, які протікають швидше у менш в'язких середовищах – коефіцієнт дифузії обернено пропорційний в'язкості екстрагента. Потрапляючи всередину клітини або тканини, екстрагент витісняє повітря і змочує залишок, який підлягає екстракції, при цьому утворюються різні дисперсійні системи, істинні розчини, розчини біополімерів (білків,

ліпополісахаридів), руйнуються адсорбційні зв'язки нерозчинних комплексів.

Спочатку розчиняються речовини, що мають більшу здатність до дифузії – низькомолекулярні кислоти, солі, цукри, амінокислоти, потім починають екстрагуватися високомолекулярні речовини. В першу чергу дифундують речовини з невеликою молекулярною масою, повільніше – високомолекулярні речовини, і останніми – речовини колоїдного характеру.

У процесі екстрагування відбувається молекулярна дифузія та дифузія в результаті конвекції. Молекулярна дифузія відбувається за рахунок хаотичного руху молекул у рідині і залежить від запасу кінетичної енергії (молекул та іонів). На швидкість молекулярної дифузії впливає ступінь подрібненості (гомогенності) матеріалу, об'єм екстрагенту, тривалість екстракції та температура проведення процесу. Конвективна дифузія пов'язана з перенесенням речовини в результаті переміщення рідини при зміні температури, перемішуванні, обробці ультразвуком та інших факторах. При конвективній дифузії розмір екстрагованих молекул, в'язкість екстрагента, кінетична енергія молекул стають другорядними. Головними стають термодинамічні умови екстракції: швидкість та режим руху рідини. Наприклад, при рідинній екстракції для виділення з культуральної рідини вітамінів та ліпідів використовуються фенол та його похідні, бензиловий спирт, хлороформ.

Залежно від розчинності білка у воді та жирі, білок можна екстрагувати з біоматеріалів водою або органічними розчинниками у поєднанні з обробкою ультразвуком. Цей метод являє собою технологію розділення, в якій використовується різниця коефіцієнтів розподілу речовин між двома водними фазами, що виникає в основному через несумісність між полімерами або між полімером і сіллю. Він дозволяє здолати недоліки традиційної екстракції, такі як низька ефективність органічних розчинників у вилученні білка.

Ефективність екстракції можна підвищити при використанні багаторазового екстрагування, вибором оптимального розчинника, нагріванням екстрагуючої речовини або рідини, зниженням тиску в екстракторі. Для того щоб уникнути негативної дії підвищених температур на цільовий продукт, застосовують метод холодної екстракції (кріоекстракції), при

якій використовують рідкий пропан або бутан, які знижують температуру розчину.

Перевагами методу екстракції є низькі затрати, висока швидкість екстракційних процесів (порівняно з іонообмінними). Недолік – використання шкідливих, вибухонебезпечних органічних речовин.

Екстракція використовується при отриманні низки імунобіотехнологічних препаратів: алергени, вакцини, поживні середовища, діагностичні препарати, гіперімунні сироватки та ін.

1.2. Хроматографічні методи

1.2.1. Афінна хроматографія

Афінна, або біоспецифічна хроматографія – це хроматографія за спорідненістю, ефективний метод виділення та очищення біополімерів та клітинних структур. Це процес біоселективної адсорбції (принцип вибіркової взаємодії) різноманітних речовин, зокрема біомолекул, на закріплених (іммобілізованих) на носіях специфічних речовинах – лігандах. На відміну від відомих методів виділення та очищення біологічно активних сполук, які базуються на фізико-хімічних відмінностях – розмір молекул, молекулярна маса, заряд та ін., в афінній хроматографії використовується здатність біополімерів специфічно і зворотно взаємодіяти з певними речовинами, як-от субстрати, інгібітори, рецептори, коферменти, антигени, антитіла та ін. Ці речовини називаються лігандами, і вони здатні ковалентно зв'язуватися з твердим носієм, утворюючи специфічний адсорбент, який може вибірково зв'язувати та затримувати біополімер, який має до нього спорідненість, із розділюваної (фракціонованої) суміші. Завдяки високій специфічності біомолекул до ліганду, іммобілізованого на носії (яким заповнюють хроматографічну колонку), приєднується лише один компонент із суміші, тому перевагою методу є можливість одноетапного виділення цільової біомолекули високого ступеня чистоти. Зміна умов елюювання приводить до виділення адсорбованого на колонці біополімеру в очищеному стані.

У афінній хроматографії використовують такі поняття:

Афінність – міцність зв'язування активних центрів однієї молекули з реакційно активними групами іншої молекули. Залежить від взаємної просторової комплементарності активного центру певної молекули та ліганду.

Комплементарність – просторове взаємодоповнення поверхонь молекул, які взаємодіють між собою, або їх частин, що призводить зазвичай до створення слабких зв'язків між ними (вандерваальсових, водневих, іонних). Унікальність та міцність комплементарних структур відрізняється високою вибірковістю та значною площею взаємодії.

Біоспецифічний адсорбент – адсорбент, який здатний вибірково взаємодіяти з біополімером. Адсорбент складається, як правило, з твердого носія, вставки та ліганду.

Вставка (спейсер) – сполука, яка відокремлює ліганд від поверхні носія з метою зменшення впливу стеричних факторів на взаємодію ліганду з біополімером, що виділяється.

Груповий ліганд – ліганд, який має спорідненість до цілої групи розчинених біополімерів.

Імобілізація – перехід речовин у нерозчинний стан зв'язуванням з твердим носієм, найчастіше це ковалентне зв'язування. Імобілізація ліганду не повинна призводити до зміни його конформації або впливати на ділянки зв'язування, тому ліганд приєднується до носія тією частиною молекули, яка не бере участі у зв'язуванні зі зразком.

В афінній хроматографії функція носія полягає у створенні твердої матриці, до якої приєднується ліганд через вставку або без неї. *До носіїв висуваються певні вимоги:*

- 1) він має бути інертним, що виключає неспецифічну взаємодію з біополімерами;
- 2) має характеризуватись механічною та хімічною стійкістю, що визначає стійкість носія, як в умовах елюювання біополімеру, так і за більш жорстких умов регенерації адсорбенту;
- 3) має бути досить пористим, що підвищує ємність адсорбенту;
- 4) має характеризуватись легкістю хімічної активації (модифікації) для приєднання ліганду чи вставки.

З огляду на це, *до процесу афінної адсорбції висувають ряд вимог:*

- ❖ ліганд повинен бути приєднаний до матриці таким чином, щоб не виникало труднощів при зв'язуванні його з біомолекулою, наприклад, білком;

- ❖ місток між матрицею та лігандом повинен полегшувати доступ білка до ліганду;
- ❖ зв'язок ліганду з матрицею повинен бути стабільним в умовах хроматографії і в процесі регенерації адсорбенту.

Вимоги до матриці хроматографічного сорбенту:

- ✓ максимальна інертність матриці;
- ✓ можливість ковалентно модифікувати лігандом активні групи;
- ✓ висока пористість для повної дифузії макромолекул;
- ✓ розмірність частинок для високих швидкостей елюювання;
- ✓ стійкість до складу рухомої фази (рН, детергенти).

Вимоги до ліганду:

- повинен зберігати специфічність зв'язування компонентів, що виділяються, в умовах елюювання та зберігання сорбенту;
- повинен забезпечувати зворотність зв'язування, що значною мірою гарантує десорбцію біомолекули у нативній формі;
- ковалентне зшивання ліганду до сорбенту має витримувати багаторазове використання;
- зшивання має відбуватися з максимальною щільністю.

Вимоги до спейсера: відсутність власної адсорбції речовини, стійкість до складу рухомої фази (рН, детергенти).

Таким чином, метод афінної хроматографії заснований на взаємодії ліганду, який фіксується на частинках носія з афінним компонентом з утворенням міцного комплексу. Афінна хроматографія може використовуватися для очищення антитіл, антигенів (токсинів та анатоксинів), ферментів та інших біологічно активних молекул. Хроматографія дозволяє виділяти високоочищені продукти та може забезпечити вибірково очищення компонентів препарату, наприклад, вакцин. Так, за допомогою моноклональних антитіл запропоновано виділення та очищення поверхневого антигена гепатиту В (HBsAg) – основного компонента рекомбінантної вакцини проти гепатиту В. Як носій використовують нерозчинні компоненти – декстранові, агарозні, поліакриламідні гранульовані гелі. За даними літератури, агароза є найбільш перспективним матеріалом для гелів, який зміцнюють шляхом зшивок.

Хроматографія, заснована на взаємодії антигенів (гаптенів) та антитіл, отримала назву *імуноафінної хроматографії*.

Для успішного проведення хроматографії має значення стерична доступність (вимоги до носія – для взаємодії необхідно мати достатньо простору). Як носії широко використовують агарозу, поліакриламід та пористе скло. У біотехнологічних дослідженнях та у виробництві препаратів для виготовлення афінних носіїв проводять іммобілізацію біологічного матеріалу на сефарозі (4В – містить 4 % агарози, 6В – 6 %) або TSK-гель (*Toyopearl®*) для отримання афінного сорбенту необхідної специфічності, бажано високої ємності. Існують готові нерозчинні матеріали, які імітують субстрат або природні субстрати (крохмаль для амілаз, хітин для хітиназ). Найчастіше у біотехнологічних роботах афінні адсорбенти необхідно синтезувати, оскільки лігандів може існувати багато, і фірми-виробники виготовляють носій з реакційними групами, до яких потім приєднується необхідний ліганд. Таким носієм може бути, наприклад, сефароза, оброблена бромціаном, який входить у реакцію з гідроксильною групою агарозної матриці.

Афінні носії, які найбільш широко використовуються в біотехнології: тіофільний гель (Т-гель) – для очищення імуноглобулінів (IgG, IgA, IgM, IgD, IgY) у м'яких умовах (рН 8,0, низька іонна сила, елюювання при фізіологічних значеннях рН). Т-гель – це поперечно зшита агарозна матриця, яка містить тіоефірні групи, взаємодія з якими призводить до утворення псевдо-(S-S)-зв'язків, аналогічних (S-S)-зв'язкам у Fc-фрагменті імуно-глобулінів, чим і пояснюється специфічне зв'язування імуноглобулінів з матрицею. Місткість Т-гелю за імуноглобулінами становить 10–22 мг/мл гелю.

Носії для металохелатної хроматографії: IDA-сефароза або NTA-сефароза (як матриця може бути використаний *Toyopearl®*) – поперечно зшита матриця з іммобілізованою імінодиоцтовою (IDA, $C_4H_7NO_4$) або нітрилотриоцтовою (NTA, $N(CH_2CO_2H)_3$) кислотою. Металоафінна хроматографія, або металхелатна хроматографія (хелати – металоорганічні комплексні сполуки) – в основі цього хроматографічного методу лежить різна спорідненість білків (пептидів) до деяких іонів металів. Утворення комплексного іона металу та деяких амінокислотних залишків або модифікація, наприклад, фосфатною групою, яка знаходиться на поверхні молекули білка, легко оборотний процес. Отже, іммобілізовані іони металів можна використовувати як сорбент, причому руйнування комплексу можна проводити в м'яких денатуруючих умовах. Взаємодія з білками суворо обу-

мовлена значенням рН, тому зв'язані пептиди можна елюювати, змінюючи рН, зменшуючи іонну силу буфера або використовуючи інші хелатуючі агенти. Металохелатна хроматографія є достатньо поширеним методом очищення рекомбінантних білків. Метод ґрунтується на здатності деяких амініслот, зокрема гістидину, формувати комплекси з іонами металів. Після іммобілізації на нерухомій хроматографічній фазі хелатуючих груп цільовий білок, який містить декілька залишків гістидину, зв'язується з нерухомою фазою, після чого супутні баластні білки відокремлюють промиванням, а потім проводять елюювання цільового білка.

Для отримання високоочищеного продукту із високим виходом дослідники модифікують сорбент. Наприклад, отриманий афінний сорбент на основі желатин-сефарози з використанням високоочищених α -пептидів колагену, виділеного зі шкіри. α -ланцюги пептидів колагену мають активні центри, що специфічно зв'язують фібронектин. В результаті за допомогою розробленого методу афінної хроматографії був отриманий препарат фібронектину з чистотою не менше 98 % і виходом, що у 2 рази перевищує відомі технології отримання фібронектину.

Елюювання зв'язаного в колонці біополімеру може бути *специфічним або неспецифічним*. Неспецифічне елюювання з колонки проводять, наприклад, буферними сумішами з градієнтом рН або градієнтом іонної сили, а також введенням детергентів до складу елюентів, що послаблює взаємодію між біомолекулами та лігандами. Специфічне елюювання відбувається в результаті заміщення білка лігандом з розчину. Більш м'яким є елюювання біоспецифічного типу, коли розчин містить речовини, які мають спорідненість до адсорбованого біополімеру (субстрат, інгібітор та ін.). Для елюювання можливе використання специфічних іонів, які змінюють конформацію білка. Таким чином, афінна хроматографія складається з двох принципових процесів: «афінної адсорбції» і «афінної елюції».

Методом афінної хроматографії можна виділяти токсини, рецептори, інгібітори, транспортні білки тощо. Високою вибірковістю відзначається *імуносорбція*, в якій як ліганд використовуються антитіла специфічні до білків, які необхідно виділити. Особливо ефективні моноклональні антитіла. Афінну хроматографію можна ефективно використовувати для виділення та очищення ферментів, антитіл / антигенів, транспортних білків, полісахаридів, екзосом. Субстрат можна зв'язати з матрицею у колонці, і

якщо суміш білків і неочищений екстракт клітин можна пропустити через таку колонку, то в ній залишиться речовина, яка може зв'язуватися із іммобілізованим субстратом. Перевагою хроматографії є можливість отримання високоочищених ферментів зі складних сумішей. Можливо отримувати високоочищені антитіла, використовуючи сефарозу, активовану бромціаном, до якої приєднані антигени.

Афінна хроматографія – це різновид адсорбційної хроматографії, при якій зв'язування відбувається відповідно до специфічних властивостей двох молекул. Між молекулами відбуваються такі взаємодії: іонні, водневі, гідрофобні, що залежить від конформації та розміру молекул. До методів афінної хроматографії належить *гідрофобна хроматографія*, яка ґрунтується на зв'язуванні гідрофобної ділянки на поверхні білкової молекули з аліфатичним ланцюгом адсорбенту. Гідрофобна взаємодія посилюється із підвищенням концентрації солі. У сольовому розчині більшість білків адсорбуватиметься на гідрофобних групах, зв'язаних з матрицею. Елюювання білків проводять зі зниженням градієнта концентрації солі. *Ефективність афінної хроматографії* полягає в тому, що розділення ґрунтується на відмінностях не фізико-хімічних параметрів біомакромолекул (заряд, форма, розмір), а на специфічних функціональних властивостях, які відрізняють досліджуваний об'єкт від багатьох інших біополімерів.

Найчастіше афінну хроматографію проводять колонковим методом, однак у ряді випадків суміш можна розділити, поміщаючи досліджуваний розчин у ємність із сорбентом і витримуючи до повного зв'язування з сорбентом досліджуваних молекул (рис. 1.1).

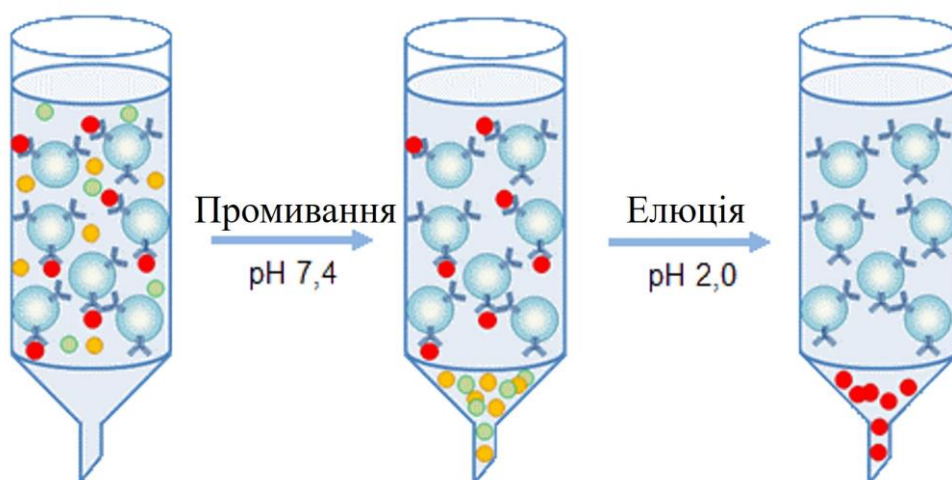


Рисунок 1.1 – Схема колоночної хроматографії білків на афінному носії

Потім сорбент промивають буферним розчином для видалення компонентів суміші, які не зв'язалися, після чого десорбують цільовий компонент. Десорбція (елюція) проводиться з використанням розчину з підвищеною іонною силою, з відмінним рН буферного розчину або додаванням органічного розчинника, який послаблює взаємодію ліганд-білок.

Очищення білків та нуклеїнових кислот на афінних сорбентах проводять не лише на колонках, а й в об'ємі – методами декантації чи центрифугування (рис. 1.2).

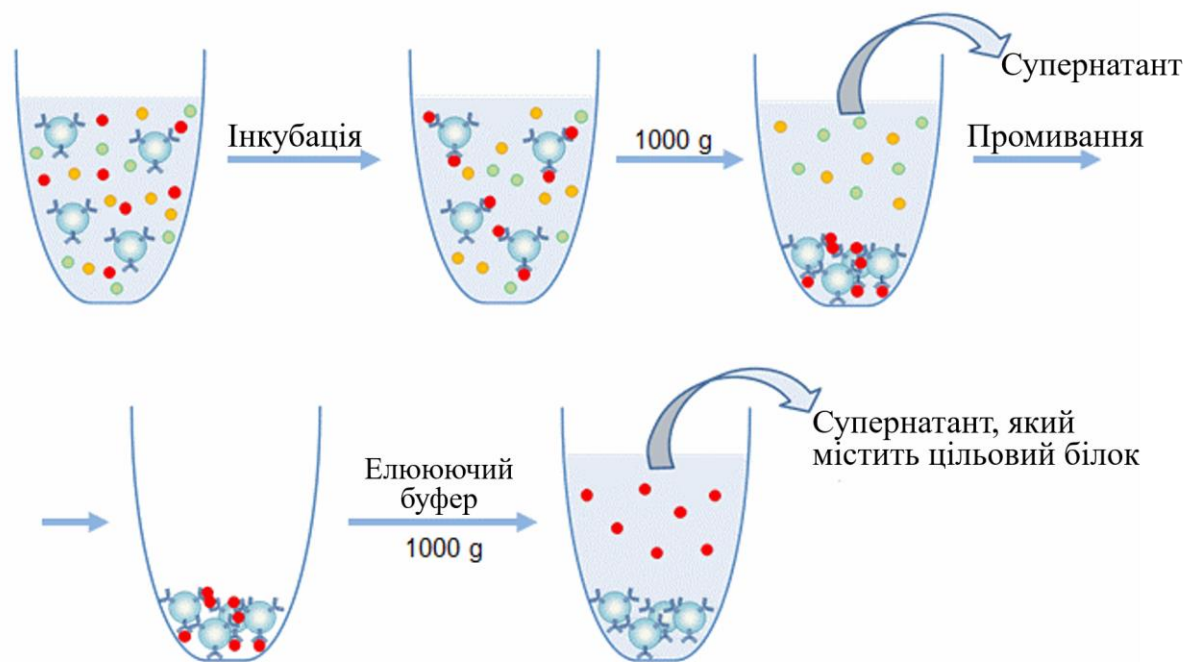


Рисунок 1.2 – Схема афінного виділення білків методом імуопреципітації

Таким чином, афінна хроматографія дозволяє відокремити цільовий продукт із суміші на основі високоспецифічних взаємодій між мішенню та іммобілізованим лігандом. В умовах зв'язування цільові молекули зв'язуються з лігандами, тоді як домішки, включаючи компоненти клітинної мембрани клітин-господарів (баластні білки, нуклеїнові кислоти, полісахариди та ін.), проходять через колонку. Оптимізовані умови промивання видаляють неспецифічно пов'язані домішки, а потім цільові молекули звільняють з афінної колонки в умовах елюювання. Сьогодні афінна хроматографія використовується при виробництві ряду імуобіологічних препаратів: вакцин (очищення антигенів токсинів кашлюку, гепатиту А, поліовірусу, папіломи людини, правця, гепатиту В та ін.), цитокінів (інтерлейкіни та інтерферони), моноклональних антитіл тощо.

Водночас використання афінної хроматографії ще повністю не охоплює потреби фармацевтичної біотехнології. Афінна хроматографія є одним із найефективніших методів розділення суміші, що дозволяє досягти найкращого розділення з високими виходами навіть у найскладніших потоках вихідних матеріалів. Включення афінної хроматографії в процес очищення імуно- та біотехнологічних препаратів вже давно проводиться дослідниками для підвищення виходу продукції та її чистоти з метою скорочення кількості наступних технологічних операцій. Незважаючи на успіх у перевірці концепції в лабораторних масштабах, впровадження цього методу в пілотному виробництві або виробництві GMP реалізується недостатньо через технічні та економічні проблеми розробки та виробництва ідеальних лігандів, а також доступність високопродуктивних хроматографічних середовищ.

Сьогодні в літературі активно розглядаються технології, які розвиваються в галузі інженерних лігандів і хроматографічних середовищ, що спонукає компанії розглядати можливість використання афінної хроматографії у великомасштабному очищенні імунобіологічних препаратів. Передбачається, що впровадження високопродуктивної одноразової афінної хроматографії у промислових масштабах може спростити процеси виготовлення, підвищити продуктивність і гнучкість, а також знизити вартість продукції.

1.2.2. Гель-фільтрація, або ексклюзійна хроматографія

Термін «гель-фільтрація», або «ексклюзійна хроматографія» поєднує способи розділення білків в умовах сітчастої структури гелю. Даний вид хроматографії набуває дедалі більшого застосування при розділенні сумішей білків завдяки високій роздільній здатності, а також м'якому впливу на білки, який не викликає денатураційних змін. Методи молекулярної фільтрації та іонообмінної хроматографії в гелях набули нового розвитку після того, як у 1959 р. шведська фірма *Pharmacia* випустила полімер декстрану – «сефадекс», отриманий шляхом обробки епіхлоргідрином (C_3H_5ClO – зшиваючий агент для отримання деяких декстранів для хроматографії) декстрану, виділеного з бактерій *Leuconostoc mesenteroides*. Гель, утворений гранулами цього полімеру, являє собою просторове молекулярне сито, побудоване з ниткоподібних молекул полісахариду декстрану,

з'єднаних через певні проміжки поперечними зв'язками. Залежно від числа поперечних містків та їх довжини утворюються різні за розміром ячейки. Типи сефадексу розрізняються за номерами, які відповідають розміру ячеек – чим більший розмір, тим вищий номер сефадексу. При хроматографії через сефадекс першими елюються найбільші молекули, потім – менші.

У цьому методі використовують *гранульовані гелі поперечно-зшитих гідрофільних матеріалів*, таких як: декстран (сефадекс, сефароза та їх аналоги), поліакриламід (біогелі та їх аналоги), полівінілового спирту (*Toyopearl*). Гранули утворені тривимірною сіткою полімеру (рис. 1.3 а), яка непроникна для великих молекул, частково проникна для молекул проміжного розміру і добре проникна для невеликих молекул, солей та води. Залежно від середнього розміру ячейки полімерного гелю та геометрії молекули із суміші, молекули доступна більша або менша частина загального обсягу гранул гелю.

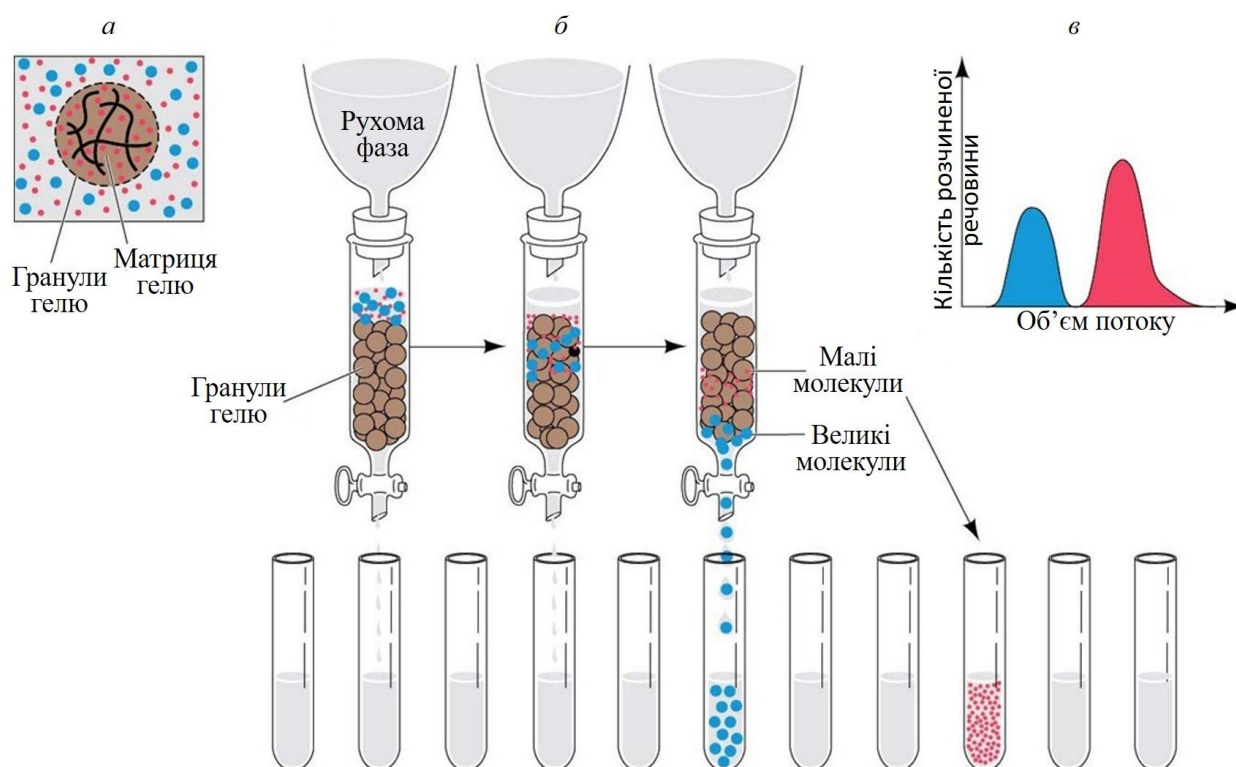


Рисунок 1.3 – Гель хроматографія:

а – гранула гелю; б – схема проведення процесу гелю хроматографії;

в – елюйовані речовини на хроматограмі

Гранули гелю з розчинником поміщають у вертикальну колонку, на поверхневий шар наносять суміш речовин, яку потрібно розділити (рис.

1.3 б). При промиванні колонки розчинником білки надходять у гель, який перешкоджає дифузії невеликих молекул, які розподіляються рівномірно по всьому об'єму колонки. Більші молекули білків не проникають у гранули, залишаються в навколишньому шарі розчинника і рухаються разом із потоком рідини. Тому великі молекули проходять шар гелю з більшою швидкістю, ніж дрібні, рух яких затримується внаслідок дифузії у нерухому фазу. Швидкість просування молекул проміжних розмірів також різна через їх часткове проникнення у гель. Таким чином, компоненти суміші елюються з заповненої гелем колонки у порядку зменшення їх відносної молекулярної маси відповідно до ступеня гальмування, спричиненого дифузіїєю в гранули гелю.

При русі потоку розчину, який містить білки та інші молекули, по колонці, яка заповнена набухлими гранулами гелю, компоненти суміші, які проникли в гель, затримуються в ньому. Таким чином, вони відстають від більших молекул, які не можуть увійти всередину гранул і знаходяться тільки в розчині, що їх омиває. Не включені в гель великі молекули з'являються в елюаті, як тільки через колонку пройде «вільний» об'єм розчину V_0 , рівний об'єму розчину, який заповнює простір колонки між гранулами гелю. Об'єм V_0 визначається щільністю упаковки та геометрією гранул. Для сферичних частинок, у вигляді яких зазвичай і випускаються матеріали для гелю-хроматографії, вільний об'єм становить 30–35 % загального обсягу колонки V_t . Якщо розміри молекул білка дозволяють йому проникати в пори, які складають суттєву частину об'єму гранул, то спостерігатиметься затримка елюції і білок з'явиться в об'ємі V_e , який пов'язаний з коефіцієнтом доступності $K_{\text{дост}}$ (частка об'єму гранул, доступна даному виду молекул) співвідношенням:

$$K_{\text{дост}} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0},$$

де $K_{\text{дост}}$ – коефіцієнт доступності;

V_0 – вільний об'єм;

V_e – об'єм, у якому виявляється білок;

V_t – повний об'єм колонки, крім тієї його частини, яка припадає на сам гель-утворюючий полімер.

Кожному білку залежно від розмірів його молекули відповідає своє значення $K_{дост}$, на чому і засноване розділення при хроматографії. Якщо об'єм елюції V_e близький до вільного об'єму V_0 , то $K_{дост}$ наближається до нуля і розділення білків, молекули яких практично не входять у пори гелю, не відбудеться. Водночас, якщо молекули невеликих розмірів, які проникають через весь об'єм гелю (V_e близький до V_t , $K_{дост}$ наближається до одиниці), то вони також не розділяться в гелі з цими характеристиками. Найкраще розділення відбувається у тому випадку, якщо $K_{дост}$ знаходиться в межах 0,4–0,6. Межі розділення можна розширити, використовуючи для високомолекулярних білків крупнопористі гелі, а для низькомолекулярних – дрібнопористі.

Таким чином, *при гель-хроматографії розділення білків визначається не молекулярною масою, а геометричними розмірами молекули*. Відповідно молекули витягнутої форми завдяки можливості перевертання в розчині важче проникають у гелі, ніж сферичні молекули такої ж молекулярної маси. Цим пояснюється рання елюція денатурованих білків, які поводять себе як невпорядкований рихлий «клубок», а не як компактна глобула.

Проста залежність між об'ємом елюції та молекулярною масою білка (справедлива тільки для компактних сферичних молекул) та легкість проведення експерименту зробили гель-хроматографію улюбленим методом визначення молекулярної маси білків. Для цієї мети колонку, заповнену відповідним гелем, калібрують набором білків з відомими молекулярними масами, після чого визначають об'єм елюції аналізованого білка і обчислюють його молекулярну масу інтерполяцією. Точність методу не дуже велика, але цілком достатня для більшості практичних завдань.

При використанні даного методу необхідно враховувати обмеження, які виникають через те, що гель-утворюючий матеріал не зовсім інертний, як це передбачає теорія методу, і може взаємодіяти з речовинами, які розділяються, що спотворює залежність об'єму елюції від розміру молекули. Це особливо впливає на розділення малих кількостей білка, оскільки сорбційна ємність матриці гелю невелика і у великомасштабних дослідках її взаємодія з білком мало впливає на процес.

Зв'язування білків гель-утворюючими матеріалами може бути пов'язане із іонообмінними взаємодіями, зокрема наявністю негативно заряджених груп у полісахаридних матрицях (сефароза, сефадекс), а також у

поліакриламідних матеріалах. В останніх карбоксильні групи виникають при спонтанному гідролізі амідів, а в полісахаридах вони можуть утворюватися в результаті окислення. Затримка при гель-хроматографії, яка виникає при іонообмінних взаємодіях із матрицею, особливо характерна для катіонних білків, наприклад, лізоциму та деяких субтилізинів. Нерідко вона є суттєвою і може навіть перешкоджати відокремленню солей від білка. В аналітичних дослідах вплив такого утримання вдається знизити значним підвищенням іонної сили розчину.

Ще однією причиною аномального утримування речовин при гель-хроматографії, особливо помітною при виділенні невеликих молекул, таких як пептиди, є гідрофобне зв'язування з матрицею гелю. Гідрофобні елементи включаються в гідрофільні полісахаридні матриці при їх обробці зшиваючими агентами, зокрема епіхлоргідрином при синтезі сефадексу. Пептиди, які містять гідрофобні, особливо ароматичні, залишки (фенілаланіну, триптофану), іноді утримуються матрицею настільки сильно, що з'являються в елюаті пізніше неорганічних солей.

Роздільна здатність методу не дуже велика, хоча простота проведення та м'якість умов експерименту є його безперечними перевагами. Застосування методу на перших етапах очищення обмежується тим, що для задовільного фракціонування білків об'єм розчину, який наноситься на колонку, не повинен перевищувати 3–5 % загального обсягу колонки. Зважаючи на це, до гель-хроматографії зазвичай вдаються в середині або на завершальних етапах виділення білка. При відділенні низькомолекулярних домішок, зокрема при знесолюванні, об'єм зразка може бути значно більшим, оскільки не потрібно високої роздільної здатності. У такому спрощеному варіанті гель-фільтрацію використовують особливо часто.

Незважаючи на зазначені обмеження, гель-хроматографія – це зручний спосіб фракціонування білків. Його застосовують і для відокремлення білків від низькомолекулярних домішок, у тому числі і солей. Деякі типи сефадексів дозволяють чергувати два різні принципи розділення білкових сумішей при виробництві вакцин або препаратів крові: іонообмінну та молекулярну фільтрації. Їх отримують при введенні іонних груп у сефадекси G-25 та G-50. Іонообмінні сефадекси мають високу обмінну ємність і низькоспецифічну адсорбцію, забезпечують швидке проходження рідини і хороше розділення суміші білків. *Найчастіше для розділення біотехнологічних продуктів використовуються такі сефадекси:*

- аніонообмінні сефадекси: QAE-сефадекс А-25 / А-50 (QAE – аміноетил-2-оксипропіл-аміноетил), DEAE-сефадекс А-25 / А-50 (DEAE – диетил-аміноетил);
- катіонообмінні сефадекси: SP-сефадекс С-25 / С-50 (SP – сульфопропіл); CM-сефадекс С-25 / С-50 (CM-карбоксиметил).

Останнім часом, крім гель-утворюючих матеріалів, для розділення білків за розмірами почали застосовувати *макропористі неорганічні носії: макропористе скло та силікагель*. Зазвичай поверхню цих матеріалів покривають гідрофільними органічними речовинами, щоб унеможливити незворотню сорбцію білків. Жорсткість цих матеріалів дозволяє розділяти білки за розміром молекул при підвищеному тиску, що прискорює процес і знижує перешкоди з боку дифузії.

Для проведення гель-фільтрації необхідно використовувати комплекс компонентів:

- 1) *стаціонарна фаза* – складається з напівпроникних пористих полімерних гелевих кульок;
- 2) *мобільна фаза* – рідина, яка використовується для розчинення біомолекул та забезпечує високу швидкість просочування поверхні стаціонарної фази;
- 3) *хроматографічні колонки* – існують комерційно доступні колонки (аналітичні та препаративні);
- 4) *насос*, завдяки якому на колонку подають різні рідини, як ті, які містять досліджувані біомолекули, так і рідини для елюювання;
- 5) *детектори* – використовуються для вимірювання показника заломлення / поглинання в УФ області.

Основними вимогами до гелевих кульок стаціонарної фази є хімічна інертність та механічна стабільність. Широко використовують наступні види гелів:

Декстрановий гель – природний лінійний полісахарид, що містить одну ланку, нерозчинний у водному середовищі, отриманий зшиванням ОН-груп декстрану та дисперсії епіхлоргідрину в органічному середовищі.

Агарозний гель – гель з великим розміром пор, утворений з нейтральної фракції агару і ланок агарози, зшитих з чергованими ланками 1,3-зв'язаної D-галактози і 1,4-зв'язаної 3,6-ангідро- α -L-залактози. Використовується переважно для розділення великих біомолекул.

Поліамідний гель – використовується для розділення органічних кислот і фенолів, здатний створювати міцні водневі зв'язки між його амідними та ОН-групами фенолу.

1.2.3. Іонно-обмінна хроматографія

Іонообмінники являють собою нерозчинний матеріал, який містить хімічно зв'язані заряджені групи і рухливі протилежно заряджені іони. Рухливі іони можуть бути зворотно заміщені іншими іонами з таким самим зарядом без змін нерозчинної матриці. Якщо матриця несе позитивно заряджені групи, а рухливі іони мають негативний заряд, то такий іонообмінник називається *аніонообмінником*. За наявності негативних груп матриці та позитивних рухливих іонів, такий іонообмінник називається *катіонообмінником*.

Іонообмінна хроматографія є методом, що дозволяє розділити іони і полярні молекули *на основі різниці заряду*. Дана хроматографія може бути використана для розділення практично будь-яких заряджених молекул, у тому числі біополімерів, невеликих пептидів і амінокислот. Взаємодія зразка та сорбенту ґрунтується на зворотній кулонівській взаємодії. Сорбент несе на поверхні іонні функціональні групи, які взаємодіють із іонами аналіту протилежного заряду. *При катіоннообмінній хроматографії* негативно заряджені групи сорбенту зв'язують позитивно заряджений аналіт, а *при аніонообмінній* – для зв'язування негативно зарядженого аналіту використовують позитивно заряджений сорбент (рис. 1.4).

При виборі виду іонообмінної хроматографії керуються ізоелектричною точкою (pI). При значенні рН вище pI білок набуває негативного заряду, нижче pI – позитивного. Під час іоннообмінної хроматографії білки розділяються відповідно до їх сумарного заряду. Розділення здійснюється зміною рН або концентрацією іонів рухомої фази. Зміни вносять поетапно або безперервним градієнтом. Найчастіше зразки білків елюють градієнтом хлориду натрію. Наприклад, якщо білок має негативний заряд при рН 7,0, то він буде зв'язуватися з позитивно зарядженим сорбентом, тоді як позитивно заряджені білки будуть елюйовані потоком елюенту. За допомогою рН білок набуде зростаючого позитивного заряду і врешті-решт також буде елюйований, що дає пік при УФ поглинанні на хроматограмі.

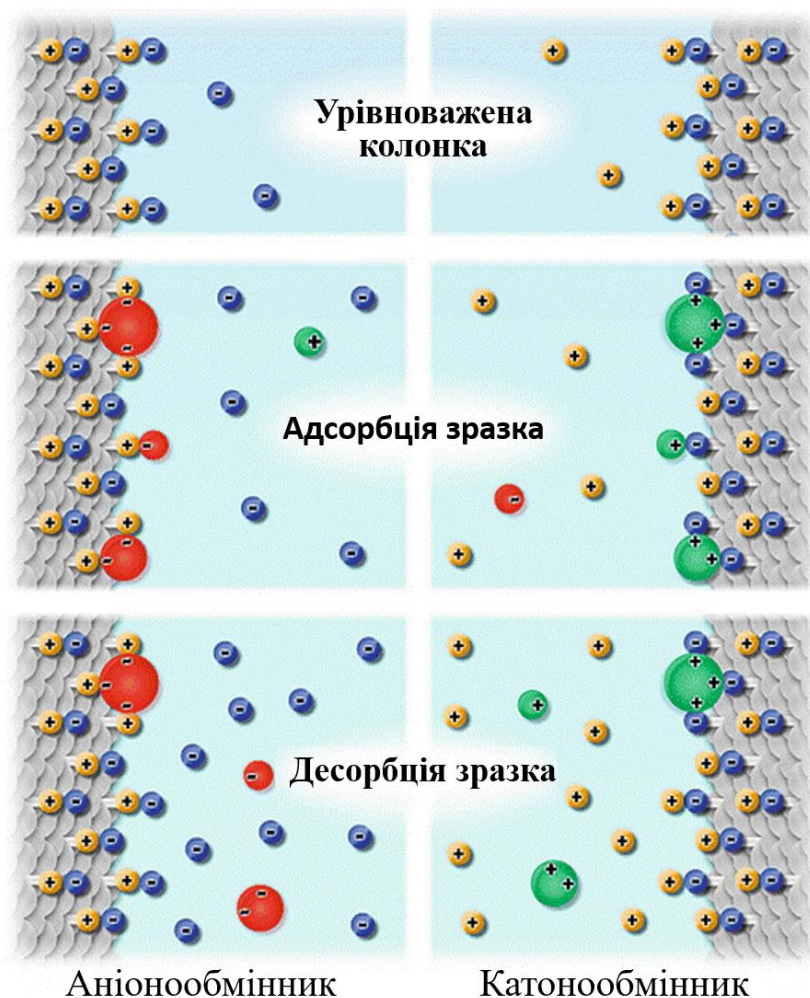


Рисунок 1.4 – Схема іонообмінної хроматографії на аніоніті та катіоніті

Нерозчинною основою матриці можуть бути алюмосилікати, синтетичні смоли, полісахариди і т.д. Природа матриці визначає механічну стабільність та проточні властивості іонообмінника, а також ступінь неспецифічного впливу на білки. Наявність заряджених груп характеризує властивості іонообмінника, визначає тип та активність іонного обміну. Загальна кількість груп та їх доступність для обміну впливають на реакційну здатність. Фенолгідроксильні, карбоксильні та сульфонові групи використовують для формування катіонообмінників, аліфатичні або ароматичні групи – для аніонообмінників.

Найбільшого поширення в препаративній хімії білка набули іонообмінники на основі целюлози або декстрану (сефадексу). Ефективність застосування цих іонообмінників для розділення лужних та нейтральних білків обумовила їх застосування не тільки в дослідницьких цілях, а й у промисловій біотехнології.

Найчастіше застосовують такі йонообмінні целюлози: аніоніт – диетиламіноетилцелюлоза (ДЕАЕ-целюлоза); катіоніти – фосфоцелюлоза (Ф-целюлоза) та карбоксиметилцелюлоза (КМ-целюлоза).

Таким чином, іонно-обмінна хроматографія – це адсорбційна хроматографія, яка розділяє молекули на основі різниці зарядів. Широке використання методу обумовлено тим, що він підходить на всіх стадіях очищення або масштабного виробництва, цей метод добре керований, дозволяє концентрувати зразки, має високу швидкість вилучення, досить привабливу продуктивність при виділенні та очищенні імунобіологічних препаратів. За останні роки запропоновано використовувати іонообмінну хроматографію для виділення не тільки білків, а й позаклітинних везикул, наприклад, екзосом. Метод дозволяє з великою швидкістю виділяти позаклітинні частинки з високим виходом.

1.3. Методи центрифугування

1.3.1. Центрифугування та сепарування

Центрифугування та сепарування використовується при виробництві імунобіотехнологічних препаратів на багатьох етапах: відокремлення біомаси від культуральної рідини, відділення специфічних білкових токсинів та рекомбінантних білків у процесі очищення, відділення розчинів від сорбентів та ін.

Центрифугування – це розділення неоднорідних систем та осадження зважених у суспензії клітин мікроорганізмів, білкових частинок під дією відцентрових сил. Центрифугування використовують у разі неможливості проведення фільтрації та за необхідності швидкого та безперервного процесу розділення. Ефективність центрифугування підвищується при збільшенні діаметра частинок в суспензії, різниці між щільністю частинок і щільністю навколишньої рідини, зменшенні в'язкості рідини, збільшенні кутової швидкості обертання ротора та радіуса центрифугування, збільшенні обсягу рідини та зменшенні товщини шару рідини, яка центрифугується.

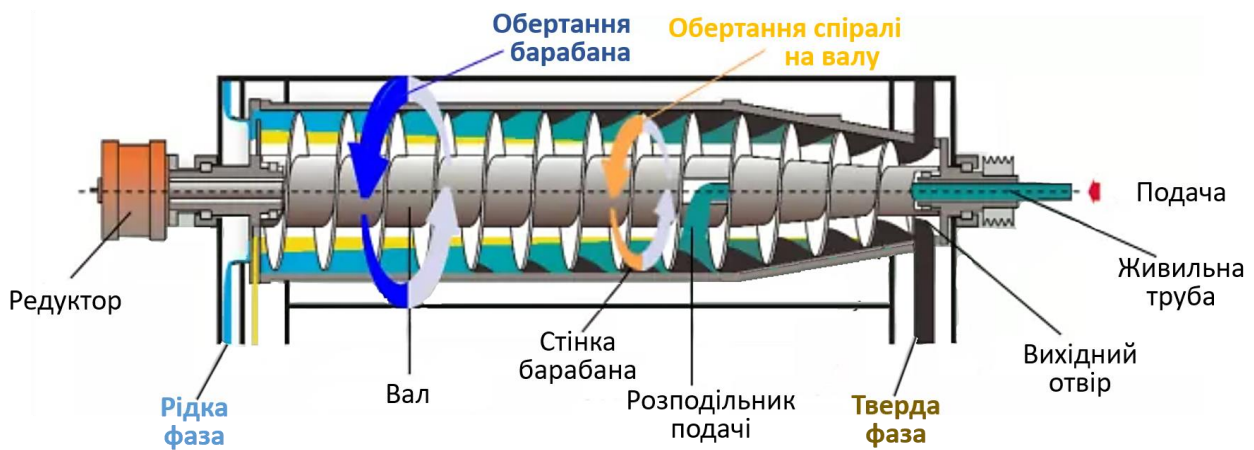


Рисунок 1.5 – Декантаційна центрифуга

Основною характеристикою центрифуг є безрозмірний фактор розділення (Fr), який визначається як:

$$Fr = \frac{\omega^2 \cdot R}{g},$$

де ω – кутова швидкість потоку рідини, 1/с;

R – радіус барабана, м;

g – прискорення гравітаційного поля, м/с².

Існують два класи центрифуг за фактором розділення:

- ✓ нормальні (Fr менше 3500);
- ✓ суперцентрифуги (Fr понад 3500).

Найчастіше для отримання імуні- та біотехнологічних препаратів використовуються суперцентрифуги зі швидкістю обертання ротора від 15 000 до 90 000 об./хв. При роботі суперцентрифуги суспензія через сопло живильної труби подається в нижню частину ротора і, обертаючись разом з ротором, протікає вздовж стінок в осьовому напрямку. У міру просування вздовж ротора суспензія розшаровується відповідно до густини її складових частин. При цьому тверді частинки, які знаходяться у зваженому стані, виділяються з рідини і осідають на стінках ротора, через верхній отвір у головці ротора виводиться в зливну камеру, а потім у збірник. Завдяки відсутності різких змін напрямку руху рідини та турбулентних вихрів усувається можливість потрапляння частинок назад у суспензію.

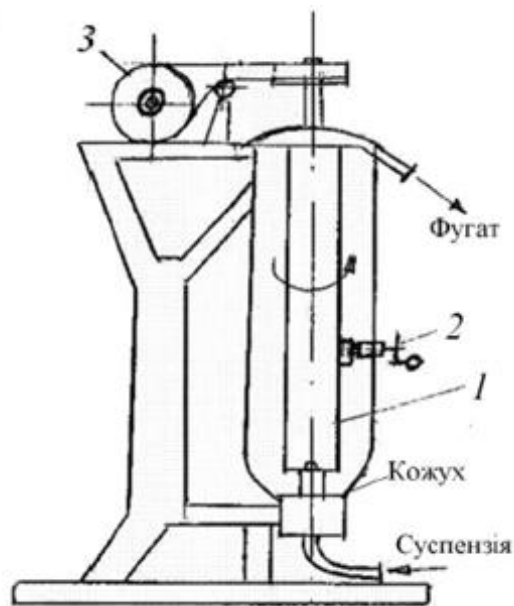


Рисунок 1.6 – Суперцентрифуга:
1 – ротор; 2 – гальма; 3 – електродвигун

Центрифуги, які мають високий фактор розділення (до 12 000 об./хв) та оснащені тарілчастим барабаном, називають *сепараторами*. Сепаратори дозволяють здійснювати відцентрове розділення рідин із найбільшою повнотою вилучення окремих компонентів. За технологічним призначенням сепаратори ділять на три основні класи:

- ❖ *сепаратори-розділювачі*, які застосовуються для виділення рідин, нерозчинних одна в одній, або концентрування суспензій та емульсій;
- ❖ *сепаратори-освітлювачі*, призначені для виділення твердих частинок з рідини;
- ❖ *комбіновані сепаратори* для виконання двох або більше операцій переробки рідини.

Подача вихідної культуральної рідини в барабан проводиться зверху нерухомою осьовою трубкою, звідки вона через розподільник надходить у набір тарілок, де відбувається відділення твердих частинок. Тверді частинки відкидаються радіально у напрямку дії відцентрових сил, ударяються знизу об одну з конічних тарілок, зісковзують до краю тарілки і викидаються з міжтарілчастого простору в кишені, що розташовані по периферії, де і відбувається їх накопичення. Освітлена рідина піднімається до горловини барабана та вивантажується за допомогою напірного диска.

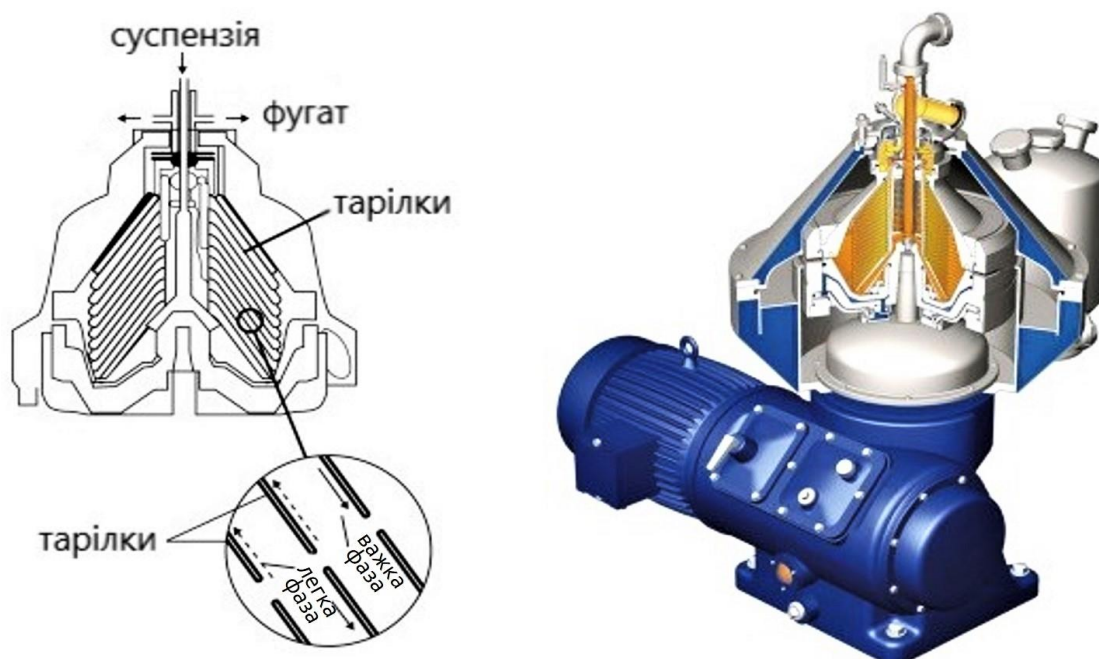


Рисунок 1.7 – Сепаратор тарілчастий: принцип дії (зліва),
конструкція та вигляд апарату (справа)

Сьогодні високопродуктивні сепаратори і суперцентрифуги випускають відомі світові виробники: *Westfalia*, *Alfa Laval* та ін. При виборі необхідного обладнання визначальними моментами є склад розділюваної суспензії, тривалість процесу, температура сепарування, можливість стерилізації обладнання і проведення процесу в асептичних умовах.

1.3.2. Центрифугування у градієнті щільності

Швидкість седиментації частинок у відцентровому полі залежить від їх розміру та форми. Кращого виділення частинок, які характеризуються однаковою швидкістю седиментації, можна досягти, якщо центрифугування проводиться у градієнті щільності. При цьому метод має дві позитивні характеристики: зони стабілізуються проти деформації під дією конвекції, як додатковий параметр розділення в систему вводиться так звана плавуча щільність частинки.

У градієнті щільності частинки продовжують осідати до того моменту, поки досягнуть своєї ізопікнічної щільності. До того як вони досягнуть цього рівня в градієнті, розділення відбуватиметься згідно зі швидкістю седиментації частинок даного розміру, їх плавучою щільністю і, меншою мірою, формою частинок. Для розділення в градієнті щільності використовуються різні речовини, наприклад, фікол, який являє собою синтетич-

ний високомолекулярний сополімер сахарози та епіхлоргідрину з молекулярною масою 400 000, а також сахарозу, хлористий цезій та ін.

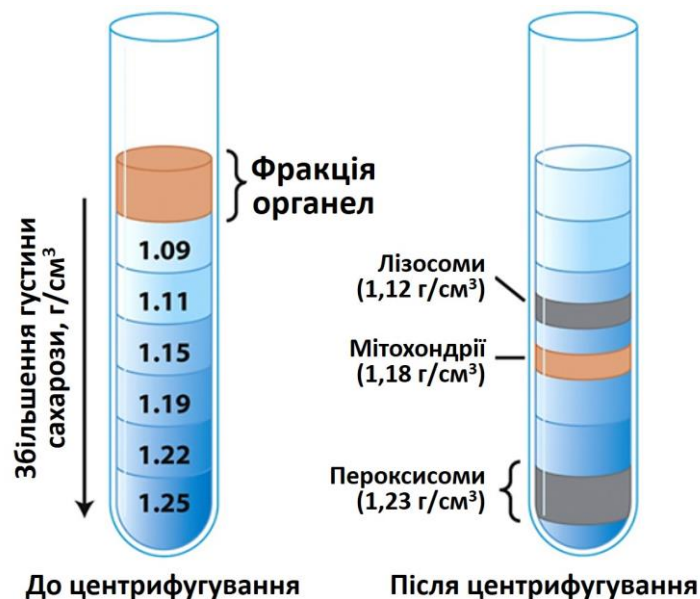


Рисунок 1.8 – Розділення органел клітини за допомогою центрифугування у градієнті щільності сахарози

1.4. Методи осадження

1.4.1. Фракціонування за допомогою поліетиленгліколю (ПЕГ)

Запропоновано методи фракціонування білків з використанням ПЕГ із відносною молекулярною масою 4000–6000. Інтерес до цього методу пов'язаний з тим, що фракціонування можна проводити при позитивній температурі, а небезпека денатуруючого впливу на білки значно менша, ніж при використанні органічних осадників. Складними є методи видалення ПЕГ з кінцевих розчинів білків, які були б прийнятними у виробничих умовах.

1.4.2. Метод ізоелектричного осадження

Ізоелектрична точка – характерна для конкретної речовини величина рН, при якій максимальна кількість іонів даної речовини в розчині набуває нульового електричного заряду. При такій величині рН речовина є найменш рухомою в електричному полі, і цю властивість можна викорис-

товувати для очищення та розділення білкових молекул. Такий підхід для розділення речовин широко використовується у роботі з високомолекулярними речовинами, наприклад, білками. М'яке зниження рН до ізоелектричної точки призводить до зменшення заряду, яке супроводжується зменшенням гідратної оболонки і, як наслідок, зниженням розчинності молекул білка.

Молекули білків мають у своєму складі як кислотні, так і лужні групи, які, дисоціюючи, визначають потенціал молекули. Додавання кислоти до розчину супроводжується збільшенням позитивно заряджених молекул через зниження дисоціації груп, які утворюють негативний заряд. Луг, навпаки, пригнічує дисоціацію груп, які мають позитивний заряд, і вся молекула збільшує свою негативну зарядженість. Якщо досягти рівноваги в дисоціації цих груп, то молекула матиме нульовий заряд. Такий стан молекули, у якому кількість позитивно заряджених груп дорівнює кількості негативних, тобто коли сумарний заряд відсутній, називається *ізоелектричним*. Оскільки в ізоелектричній точці молекула білка не має надлишкового заряду, в цих умовах білок легше агрегує та осаджується. Зміна рН до величини, яка відповідає ізоелектричній точці, дозволяє розділити білки з різними ізоелектричними точками шляхом фракціонованого осадження. Шляхом зміни рН складну суміш білків розділяють на фракції, які містять різні білки. Прикладом може бути осадження білкових токсинів і анатоксинів при виробництві вакцин. Необхідно враховувати, що використання низького рН зазвичай призводить до зниження виходу білкового компонента та зниження біологічної активності.

1.4.3. Осадження білків сульфатом амонію

Коли говорять про висолювання, зазвичай мають на увазі саме висолювання сульфатом амонію. Цьому методу вже понад 150 років, але сьогодні як раніше він застосовується як зручний метод осадження та розділення білків, який дозволяє досягти суттєвого ступеня чистоти (2–10-кратне очищення).

При рівній молярній концентрації полівалентні аніони є більш ефективними для висолювання, ніж моновалентні (частково через те, що значення має не концентрація солі, а іонна сила розчину), а полівалентні катіони навіть перешкоджають дії полівалентних аніонів. Оптимальним поєд-

нанням вважається полівалентний аніон із моновалентними катіонами. Ефективність висолювання зменшується в ряду Гофмейстера (Hofmeister serie): цитрат > сульфат > фосфат > хлорид > нітрат > тіоцінат. У цьому ряду зменшується стабілізуючий ефект і зростають хаотропні властивості солі. Таким чином, найкращими кандидатами є цитрат та сульфат.

Сульфат є зручнішим через кращу розчинність (при нормальній температурі розчинність амонійних солей цитрату і сульфату дорівнює приблизно 2,5М і 4,1М), низьку ціну та стабілізуючий вплив, який він проявляє по відношенню до більшості білків при концентраціях вище 0,5 М. *Сульфат амонію* – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – *преципітує білки за двома механізмами*:

1) під дією сульфат-іонів молекула білка стає більш компактною (менш розчинною) через взаємодії з позитивно зарядженими амінокислотами, причому ця взаємодія ефективніша при $\text{pH} < \text{pI}$;

2) зневоднення: один іон SO_4^{2-} має 13–14 молекул H_2O тільки в першому гідратному шарі і, імовірно, більше у другому. Якщо одна молекула сульфату координує навіть 15 молекул води, то 3М сульфату амонію зв'яже 45 наявних у розчині 55М молекул H_2O .

Розчинність білків визначається:

❖ *впливом іонної сили та температури*: при низькій іонній силі (менше 0,2М) розчинність білка збільшується при підвищенні концентрації солі, оскільки екранування тяжіння протилежно заряджених груп призводить до того, що структура білка стає більш рихлою. При високій іонній силі (більше 0,2М) розчинність білка знижується через висолювання і зневоднення. Вона падає експоненційно із підвищенням іонної сили:

$$\log S = \beta - KsI,$$

де $S[\text{g/l}]$ – розчинність білка;

I – іонна сила;

β і Ks – константи.

Ks – трохи відрізняється для різних білків і майже не залежить від pH і температури, а β – сильно залежить від білка, pH та температури: підвищення температури викликає зниження β , що призводить до зменшення розчинності білка.

❖ *впливом рН*: при низькій іонній силі (менше 0,2М) розчинність білка мінімальна при рН рівному ізoeлектричній точці білка. При високих концентраціях $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ розчинність підвищується з підвищенням рН, тому що при низьких рН сульфат іон компактизує білок, взаємодіючи з позитивно зарядженими групами. Отже, краще проводити осадження при $\text{pH} < \text{pI}$.

❖ *впливом початкової концентрації білка*: білки бувають двох типів – для типу I розчинність не залежить від вихідної концентрації білка, для типу II – залежить сильно. Зазвичай, при концентраціях нижче 1М (25 % насичення) осаджуються лише великі частинки, преагреговані або дуже великі білки.

Висолювання є маловитратним, екологічно чистим і не викликає денатурації.

1.5. Вибіркова (селективна) адсорбція

Вибіркова адсорбція проводиться з метою адсорбції індивідуальних білків на органічних та мінеральних адсорбентах. Зазвичай її використовують як допоміжну технологічну стадію.

Адсорбція залежить від температури, рН, іонної сили, хімічної структури речовини тощо. Адсорбція використовується для очищення цільового продукту від баластних домішок і для вилучення цільового компонента, наприклад, при виділенні HBs-Ag-антигена вірусу гепатиту при виробництві рекомбінантної вакцини проти гепатиту В. Як сорбент використовують колоїдний кремнезем (SiO_2) – аеросил. Потім сорбент з антигеном обробляють розчином для десорбції (наприклад, 8М сечовиною) і сорбент відділяють центрифугуванням, при цьому одержують концентрований розчин антигена, для видалення солей проводять ультрафільтрацію.

1.6. Ультрафільтрація на мембранах (тангенційна фільтрація). Діаліз

Ультрафільтрація – процес, за допомогою якого суміш речовин різної молекулярної маси у рідкій фазі розділяється при проходженні під тиском через мембрани з певним розміром пор. Сьогодні в біотехнологічних

дослідженнях ультрафільтрація є загальноприйнятим та доступним методом. *Перевагами методу є:*

- ✓ можливість обробки промислових кількостей біологічного матеріалу;
- ✓ достатньо доступне обладнання;
- ✓ задана температура та рН процесу;
- ✓ можливість підтримки необхідної концентрації компонентів протягом всього процесу;
- ✓ можливість концентрування та очищення біологічно активних компонентів;
- ✓ можливість видалення баластних домішок різної природи та очищення від пірогенів.

Важливим фактором є можливість додаткової стерилізуючої фільтрації розчинів через ультрафільтраційні мембрани, оскільки розмір пор мембрани дозволяє відокремити мікробну контамінацію. Необхідно також зазначити, що дані мембрани мають мінімальну адсорбційну активність, просто регенеруються і можуть бути використані повторно. Крім того, процес не потребує великої енергоємності. Молекули речовини, яка піддається ультрафільтрації (молекули розміром до 100 нм), мікрофільтрації (молекули розміром від 100 до 10 000 нм) практично повністю зберігають нативність структури – відсутність змін агрегатного стану та фазових перетворень.

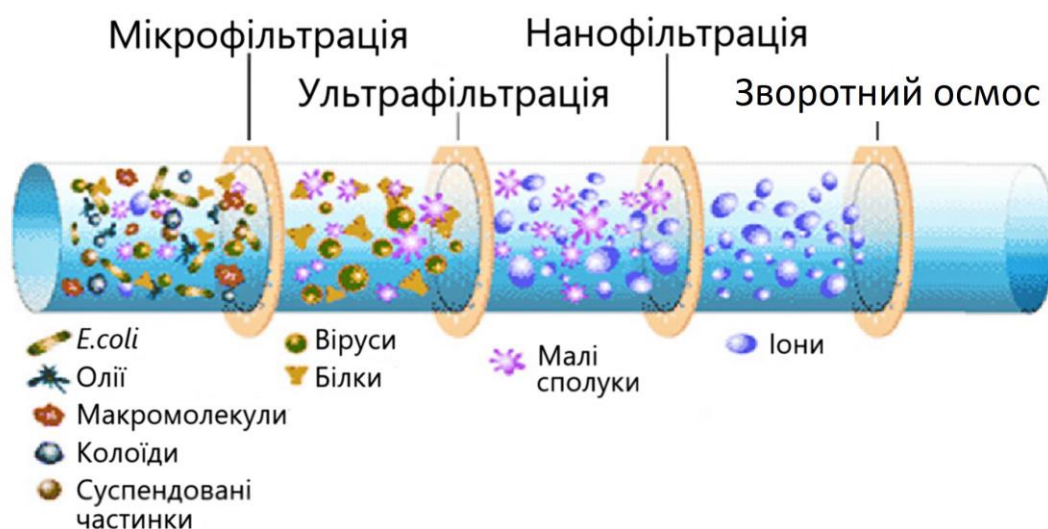


Рисунок 1.9 – Ефективність методів фільтрації макромолекул та мікроорганізмів

Ефективність фракціонування ультрафільтрацією може знижуватися через такі фактори, як взаємодія макромолекул з утворенням приграничного шару підвищеної концентрації на межі між мембраною та розчином та взаємодія системи «мембрана – розчинена речовина».

Поява приграничного шару обумовлена концентраційною поляризацією, яка відбувається внаслідок значної втрати розчинника з розчину на межі його поділу з мембраною. Внаслідок взаємодій системи «розчинена речовина – мембрана» цей приграничний шар іноді формується незворотно та утворює шар гелю, який видозмінює поверхню мембрани. При розділенні двох фракцій білкових молекул їх молекулярні маси повинні відрізнятися не менше, ніж на порядок. Завдяки тангенціальному потоку і його «змиваючим» зусиллям молекули білка і речовини, які осіли на мембрані, можуть мати більш-менш однакову орієнтацію. Саме тангенціальний потік нівелює трансмембранний потік молекул розчиненої речовини.

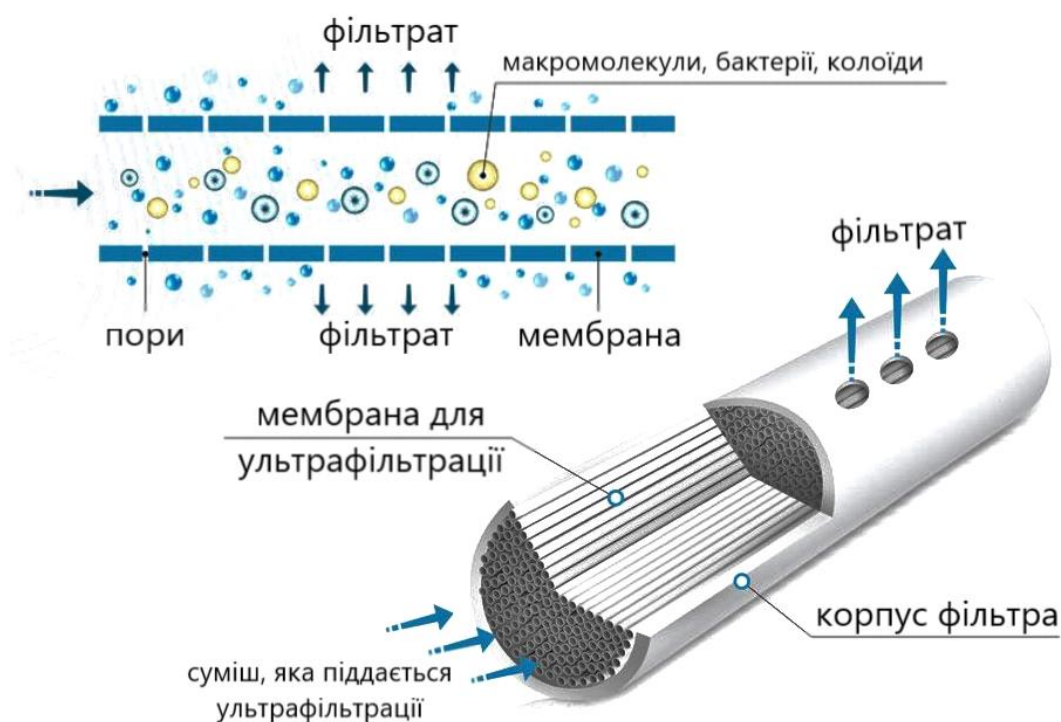


Рисунок 1.10 – Мембрана для ультрафільтрації

Принцип роботи розділювальних апаратів: за допомогою насоса робоча суміш із вихідної ємності подається та циркулює по замкнутому контуру через ультрафільтраційні мембрани або порожнисті волокна розділювальних апаратів і, збагачена малопроникним компонентом, повертається в цю ємність. При значному зниженні проникності порожнистих во-

локон проводять промивання розділювального апарату зворотним потоком. Робочий тиск при ультрафільтрації створюється підпірним вентилем та контролюється за допомогою манометра. Під час роботи апаратів максимальний робочий тиск не має перевищувати 0,2 МПа.

Сьогодні ринок ультрафільтраційного та мікрофільтраційного обладнання пропонує широкий вибір продукції залежно від цілей, поставлених виробником біологічних продуктів. Добре зарекомендувала себе фірма *Spectrum* (США), яка виробляє мембрани з полісульфону та поліетилсульфону для ультрафільтрації, мікрофільтрації та зворотноосмотичної фільтрації (діаліз). *Spectrum* випускає більше 2000 найменувань, у тому числі мембрани з порогом відсікання від 10 до 400 кДа, мембрани з величиною пор 0,1, 0,2 та 0,5 мкм різних розмірів з використанням різних методів стерилізації. Ряд країн виробляє широкий спектр порожнистих волокон, виготовлених із ароматичних поліамідів та нецелюлозних матеріалів – полісульфону, фторопласту, полісульфоніду.

Для очищення біотехнологічних препаратів можливе використання діалізу. *Діаліз* – це метод очищення, рушійною силою якого є градієнт концентрації. Оскільки біомакромолекули, такі як білки, не можуть пройти через напівпроникну мембрану, діаліз рідко застосовують для очищення білків сам по собі. Для підвищення чистоти білка його зазвичай комбінують з іншими методами розділення та очищення, такими як центрифугування, ексклюзійна хроматографія, афінна хроматографія з іммобілізованим металом, іонообмінна хроматографія, висолювання тощо.

1.7. Фільтрація та стерилізуюча фільтрація

Фільтрація є обов'язковим етапом виробництва імунобіотехнологічних препаратів. Причому стерилізуюча фільтрація більшості препаратів здійснюється як на кінцевому етапі, так і на багатьох технологічних стадіях виробництва. Це стосується насамперед вакцинних препаратів, препаратів з крові людини та тварин, фагів, вітамінів, реомбінантних гормонів тощо. За технологічним призначенням фільтри можна розділити на дві групи: глибинні та мембранні.

Глибинні фільтри складаються з волокон, частинок або фрагментів, що утворюють єдину масу, в якій присутні звивисті канали або пори. Розміри пор варіюються і набагато перевищують розміри частинок, які за-

тримуються фільтром. Фільтруючий ефект у цьому випадку забезпечується сумарною дією різних факторів. До глибинного типу належать целюлозні пластини, керамічні свічки, дрібнопористе скло тощо. Глибинні фільтри мають високу поглинаючу здатність, оскільки різні біочастинки та мікроорганізми накопичуються в їхньому матриксі. При підборі глибинних фільтрів необхідно враховувати адсорбцію біологічних речовин на матриксі фільтрів (наприклад, зниження титру антитіл у препаратах крові та втрату певної кількості антигена) і можливість попадання у профільтрований розчин фільтруючого матеріалу, що неприпустимо, особливо на завершальній стадії виробництва вакцин або інших біопрепаратів, які вводяться ін'єкційно.

Мембранні фільтри для стерилізуючої фільтрації характеризуються однаковими отворами з рівномірним розподілом по поверхні фільтра. Вони мають високу ефективність, оскільки затримують контамінуючі частинки, розміри яких перевищують розмір пор фільтруючого матеріалу, і мають незначну адсорбційну здатність порівняно з глибинними фільтрами (їх товщина становить близько 150–200 мкм).

Стерильність забезпечують мембранні фільтри, отримані в основному з очищених ефірів целюлози (нітроцелюлоза, ацетилцелюлоза) і мають розмір пор близько 0,22 мкм. Фільтри для стерилізуючої фільтрації випускають і з інших матеріалів (вінільні полімери, поліаміди, фторвуглеводні). Такі фільтри за рахунок високої пористості та малої товщини забезпечують низький опір потоку рідини або газу і тим самим сприяють високій пропускній здатності. Крім того, ці фільтри стійкі щодо фільтрованих матеріалів і, що вкрай важливо, витримують стерилізацію пором. На сьогоднішній день фільтри для стерилізуючої фільтрації випускають фірми «Міліпор», «Палл», «Кюно», «Сарторіус» та ін.

Випускаються також фільтри з порцеляни, полікарбонату, на основі тетрафторетилену. Дедалі ширше у фармацевтичну практику впроваджуються фільтри з величиною пор близько 0,1 мкм. Стерилізуюча фільтрація є однією з критичних точок виробництва біопрепаратів і, безперечно, повинна бути валідована шляхом підбору оптимальних умов фільтрації та фільтрів для конкретного препарату. Зазвичай препарат піддають стерилізуючій фільтрації через попередній фільтр, а при необхідності через каскад мембран зі зменшенням розмірів пор по ходу потоку: 1,2, 0,8, 0,65, 0,45, 0,22 мкм.

Зважаючи на те, що середовища, які містять термолабільні компоненти такі як вакцини, сироватки, ферменти, екзосоми, фагові частинки та інші білки, легко руйнуються при нагріванні, їх потрібно стерилізувати іншим способом. Цим способом є фільтрація рідин через мембрани, виготовлені зі складних ефірів целюлози чи інших полімерів. Мембрани мають діаметр пор від 0,2 до 0,45 мкм. При проходженні середовища через фільтр бактерії та інші частинки, розміри яких перевищують розмір пор, відсіваються та збираються на поверхні мембрани. Невеликі розміри пор, що використовуються при фільтрації рідин, означають, що мембрани легко блокуються (забиваються), якщо середовище не піддається попередній фільтрації для видалення великих частинок (через фільтри з розмірами пор 1,2, 0,8, 0,65 мкм). Самі мембрани мають бути стерилізовані парою або радіацією перед використанням. Як альтернативу використовують одноразові фільтри та фільтруючі картриджі з розміром пор від 0,2 до 0,45 мкм.

Стерилізуюча фільтрація може бути не такою ефективною або надійною як термічна стерилізація, оскільки віруси та мікоплазми здатні проходити через мембрани. Однак доступність мембранних стерилізуючих фільтрів класу 0,1 мкм для видалення мікоплазм сприяла широкому застосуванню стерилізуючої фільтрації у багатьох процесах культивування клітин ссавців, в яких можуть бути присутні різноманітні білкові молекули, а також віруси або мікоплазми.

1.8. Дезінтеграція мікроорганізмів

Для виділення деяких антигенів, тілець включення та інших біомолекул, які знаходяться всередині клітин мікроорганізмів, наприклад, бактерій кашлюку або *E. coli*, першочерговим завданням є руйнування клітинної оболонки – *дезінтеграція*. Руйнування клітинної оболонки відбувається при досягненні в ній механічних напруг, рівних межі міцності оболонок. Найефективнішими методами руйнування клітини є методи екструзійної та ультразвукової дезінтеграції.

Екструзія (гомогенізація під високим тиском) – це руйнування клітин бактерій через їх взаємодію з однорідно рухомим середовищем, при цьому виникають поперечні градієнти швидкості та неоднорідний розподіл тиску. При гомогенізації під високим тиском концентровану суспензію

клітин продавлюють через невеликий отвір під високим тиском, а потім тиск різко знижують, що і викликає лізис (рис. 1.11).

Ще один механізм руйнування клітин – *зіткнення*. Клітинну суспензію, яка має велику в'язкість, направляють під тиском на нерухому поверхню або назустріч потоку іншої суспензії. У місці зіткнення виділяється велика кількість енергії, що руйнує клітини, однак зберігається структура біологічно активних молекул, оскільки одноразовий силовий вплив на цілі оболонки клітин відбувається практично без виділення тепла.

Ультразвукова дезінтеграція – руйнування клітин відбувається заа-
дяки явищу кавітації. Кавітація – це фізичне явище, що викликається дією
ультразвуку і призводить до виникнення високоградієнтних мікропотоків,
ударних хвиль, локальних стрибків тиску та температури. Частота та інтен-
сивність ультразвуку мають бути не менше 20 кГц.

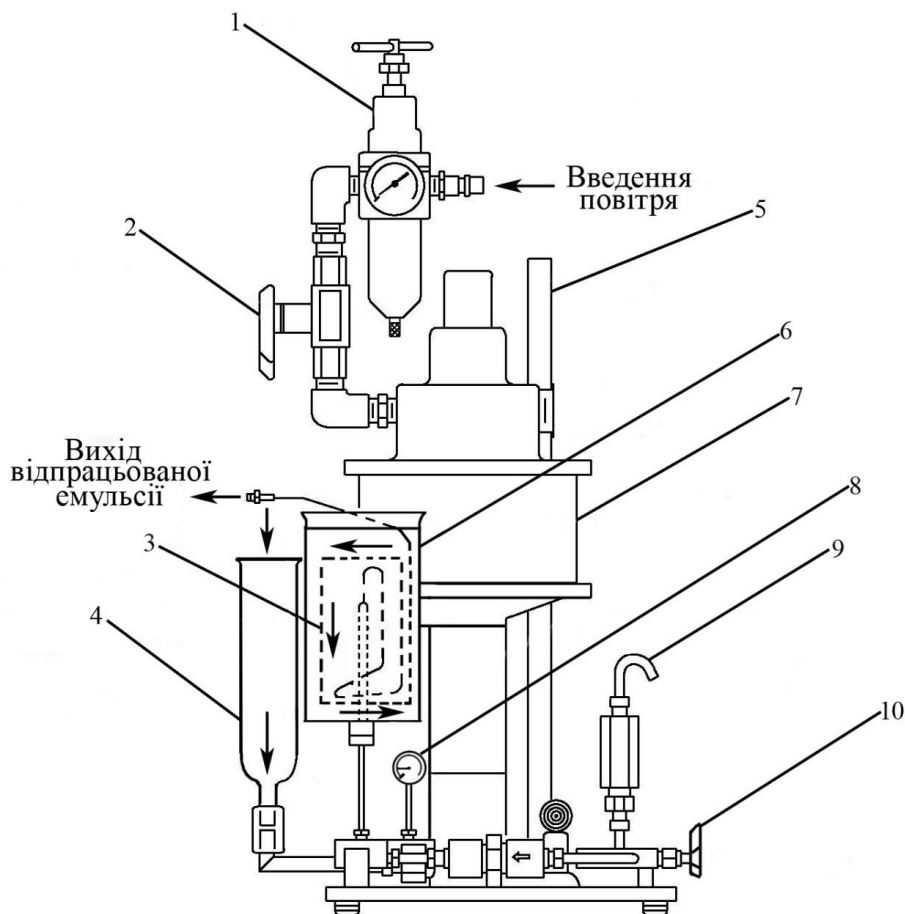


Рисунок 1.11 – Гомогенізатор *Microfluidics-110Y*:

1 – регулятор тиску повітря; 2 – вентиль подачі повітря; 3 – спіраль для охолодження емульсії; 4 – резервуар для введення емульсії; 5 – стабілізатор тиску; 6 – резервуар з охолодженою водою; 7 – повітряна помпа; 8 – манометр; 9 – скидання повітря; 10 – вентиль скидання повітря

Руйнування клітин можна проводити методом *заморожування/відтаювання*, при якому по чергові здійснюють операції заморожування і відтаювання бактеріальних клітин. Внаслідок такої багаторазової обробки оболонка клітини руйнується.

Руйнування клітинної оболонки можна проводити за допомогою *обробки ферментами*, наприклад, лізоцимом і протеазою.

Одним із методів, що застосовується при виділенні антигенних компонентів, є *обробка бактерій детергентами* – полярними сполуками, що містять гідрофобні та гідрофільні компоненти. Взаємодія цих сполук із компонентами клітинної мембрани сприяє переходу в розчин поверхневих антигенів. Можливі кілька механізмів взаємодії детергентів із бактеріальними клітинами:

- ✓ порушення проникності клітинної мембрани;
- ✓ лізис клітин внаслідок зв'язування детергентів з іоногенними групами клітинних мембран;
- ✓ денатурація клітинних білків та порушення функціонування клітинних ферментів.

Для обробки бактерій використовують такі детергенти: аніоногенні (дезоксихолат та лаурилсульфат), катіоногенні (цетавлон) та неіоногенні (твін).

1.9. Ліофілізація імунобіотехнологічних препаратів

1.9.1 Технологічний процес ліофілізації

Розвиток біотехнології та розширення номенклатури продукції ставить перед розробниками важливе питання про збереження біологічних властивостей препаратів та продовження терміну їх зберігання. Ці питання можуть успішно вирішуватись за допомогою процесу *ліофілізації*. Сьогодні ліофілізацією висушують багато продуктів фармацевтичної біотехнології, серед яких: живі вакцини – бактеріальні (BCG) та вірусні (кір, краснуха, поліомієліт та ін.), цитокіни (інтерферони та інтерлейкіни), пробіотики, ферменти, антибіотики, ліпосомальні наночастинки тощо. Ліофілізація незамінна для отримання та зберігання культур бактерій та вірусів.

Ліофілізація являє собою процес висушування матеріалу із замороженого стану, при цьому волога, яка знаходиться в матеріалі, переходить у

водяну пару, минаючи рідку фазу, тобто сублімується. Таким чином, в основі ліофілізації препаратів лежить процес сублімації. Ліофілізація дозволяє зберегти структуру, біологічні властивості, цілісність біологічних мембран, забезпечуючи ефективність сублімованих препаратів.

Термін «ліофілізація» грецького походження «*lyophilio*», що означає «люблю-розчиняю». Отриманий продукт після ліофілізації представлений легко розчинним гігроскопічним порошком. Матеріал, який піддається ліофілізації, може розчинятися краще, ніж до висушування. Ліофілізація відбувається за умов глибокого вакууму (трохи більше 1 мм.рт.ст) при низьких температурах. Проведення ліофілізації дозволяє зберегти основні біологічні властивості матеріалу – культури вірусів та бактерій залишаються живими та практично не змінюють морфологічних та культуральних властивостей. Ефективність використання вакууму при висушуванні сублімацією полягає у тому, що зі збільшенням розрядження падає температура фазового переходу. При підведенні тепла за умов глибокого вакууму можна створити велику різницю температури між препаратом та джерелом тепла. Нижче наведено принципову технологічну схему системи ліофілізації.

Система складається з камери-субліматора, в якій знаходяться полиці, у порожнині яких циркулює теплоносіє (наприклад, силіконове масло). На полицях встановлюють препарат, який висушується, що знаходиться переважно в ампулах або флаконах. У деяких випадках на полиці поміщають ємності (лотки) з нержавіючої сталі, в яких знаходиться продукт, що висушується, розлитий з певним шаром рідини препарату. Між полицями та препаратом існує можливість передачі тепла. Заморожування препарату можна проводити в окремих низькотемпературних камерах, що передбачає швидке перенесення продукту до субліматора камери. Однак така технологія має кілька недоліків, головні з яких це можливість контамінації продукту при переносі та можливість відтаювання препарату. Перевагою сучасних промислових апаратів є можливість заморожування препарату в камері субліматора. Після герметизації камери субліматора на електронній стійці встановлюють параметри процесу висушування. Під час проведення сублімації пара з камери переходить у труби конденсатора (заморожувач), у якому циркулює холодоагент (розсіл, охолоджений етанол тощо). Конденсатор включений в один циркуляційний контур з випарником (аміак, фреон тощо) холодильної установки та з'єднаний з вакуу-

мним насосом, який призначений для видалення парів із сублиматора. Конденсатор дозволяє утримувати холод і вловлювати розчинник під час висушування. Традиційно температура у теплообміннику підтримується за допомогою циркуляції рідини крізь полиці з зазначеною бажаною температурою. Циркулюючий теплоносіє за допомогою насоса прокачується герметичним контуром. Герметичність контуру потребує постійного контролю, оскільки у ряді випадків постійний цикл модифікації температури тягне за собою витік силіконової олії з подальшим забрудненням продукту. Система охолодження потребує застосування компресорів на основі рідкого азоту. Компресор виконує функції охолодження полиць при замерзанні та охолодження конденсатора при випарюванні рідини. Для досягнення низького вакууму застосовується двоступеневий роторний насос. При завантаженні препаратів у сублиматор використовують датчики температури, які розміщують на полицях в різних точках.

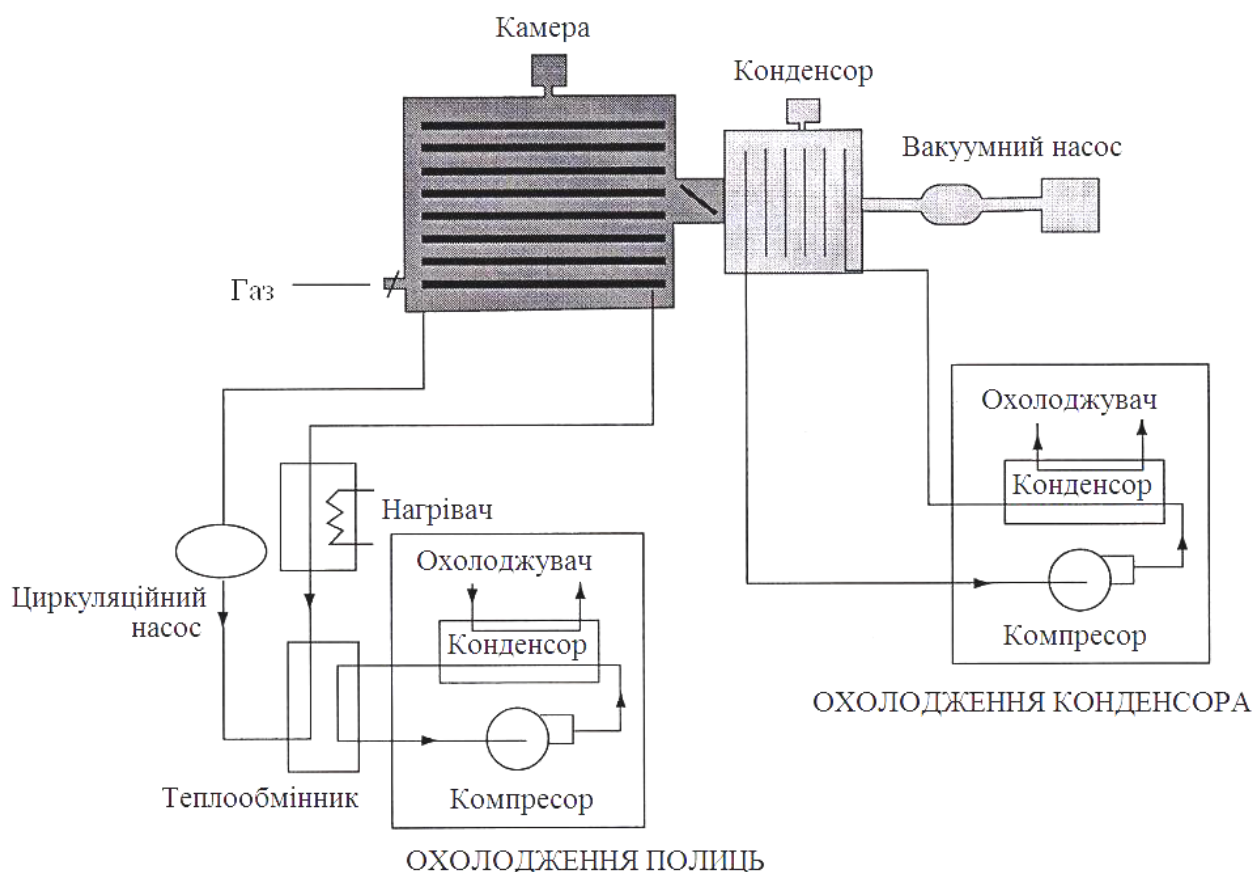


Рисунок 1.12 – Схема сублимаційної сушарки

Швидкість сублимації прямо пропорційна різниці між парціальним тиском водяної пари на поверхні висушеного матеріалу та парціальним

тиском на поверхні конденсатора. Величина парціального тиску прямо залежить від температури. Тривалість процесу сублімації безпосередньо залежить від відведення водяної пари, об'єм якої, у свою чергу, залежить від різниці тиску між висушеним препаратом і конденсатором. У зв'язку з тим, що парціальний тиск водяної пари залежить від температури, можна зробити висновок, що швидкість сублімації залежить від різниці температури висушеного продукту і температури конденсатора. Температура конденсатора, а отже, і мінімальний парціальний тиск водяної пари в конденсаторі залежить від конструкції апарату. У сучасних апаратах температура конденсатора досягає мінус 80 °С. У зв'язку з цим температуру висушеного матеріалу, а отже, і парціальний тиск водяної пари необхідно зробити максимальним.

Для визначення необхідної температури висушування використовується термін «*евтектична точка*». Матеріал, який висушують, містить не тільки воду, але й інші компоненти, наприклад, солі та цукри. При охолодженні розбавленого сольового розчину під точкою замерзання у першу чергу замерзає чистий лід, а рідка частина розчину концентрується і замерзає лише при *евтектичній температурі*, яка визначається за максимальним зниженням точки замерзання відповідного розчину солі. Евтектичні температури для препаратів, які підлягають ліофілізації, визначаються експериментально. Встановлення температури евтектики препаратів є обов'язковим, оскільки дозволяє встановити допустимий рівень нагрівання при висушуванні препарату.

Існує кілька методів визначення точки евтектики: термічний та шляхом вимірювання опору замороженого продукту. В основі термічного методу лежить вимірювання температури препарату в процесі повільного заморожування та відтаювання. Електричний опір найбільш точно характеризує стан замороженого продукту. Сутність цього методу полягає у визначенні температури фазових змін речовин, призначених для ліофілізації, шляхом вимірювання електричного опору зразків речовин залежно від температури охолодження до повного затвердіння речовини при температурі евтектики, і при наступному нагріванні до температури початку відтаювання і далі до повного відтаювання.

Процес ліофілізації вакцин є визначальним при виробництві живих вакцин (вірусів і бактерій), медіаторів імунної відповіді, пробіотиків та ін.

Перевагами ліофілізації перед іншими видами висушування є максимальне збереження біологічного матеріалу (виживання бактерій та вірусів), проведення процесу в асептичних умовах, висушування препарату в первинній упаковці (флакони або ампули) у точно дозованих кількостях та герметизація цієї упаковки в атмосфері вакууму або інертного газу.

Процес ліофілізації проходить у кілька технологічних стадій:

1. *Попереднє заморожування* проводиться при температурі нижче точки евтектики (температура, при якій вся рідина переходить у тверду фазу – лід) самого низькотемпературного компонента препарату, який висушується. При цьому повинна бути дослідним шляхом підібрана швидкість заморожування, при якій спостерігається мінімальний травматичний вплив кристалів льоду і електролітів на клітину. До негативного результату можуть призводити застосування як вищих температур, так і нижчих (переохолодження). Неповне заморожування препарату на початку вакуумного висушування призводить до зниження виживання мікроорганізмів, спінювання препарату, значного погіршення розчинності при використанні. Водночас всередині замороженої маси препарату залишаються ділянки з незамороженою вологою, що супроводжується механічним руйнуванням при кристалізації, руйнуванням мембрани через різке підвищення концентрації солі, втрати мембранного потенціалу через різницю концентрацій всередині клітини та ззовні. На даному етапі необхідно вивчення всіх параметрів попереднього заморожування: форми та об'єму первинної упаковки з урахуванням її геометричних форм, дози розлитого препарату, його складу, виду та концентрації кріопротектора, вмісту живих клітин у препараті. Останнє є суттєвим моментом, оскільки вміст живих клітин варіює від серії до серії та вимагає додаткових досліджень щодо підбору умов.

2. *Первинне висушування* – на цьому етапі температура препарату нижча 0 °С. Для живих вакцин ця температура, залежно від складу препарату та кріопротектора, знаходиться в межах від мінус 20 °С до мінус 30 °С. Протягом цього періоду вільна вода у формі льоду максимально видаляється з препарату, і його температура підвищується до 0 °С. У камері сублімаційної установки створюють вакуум для забезпечення вільної дифузії парів рідини від замороженої маси продукту до охолодженої поверхні конденсатора. У разі підвищення вакууму інтенсивність випаровування зростає. Протягом першої фази висушування відбувається сублімація льоду на поверхні препарату. При продовженні висушування препара-

ту сублімаційна поверхня проникає в продукт, а пара повинна бути відведена через раніше висушений зовнішній шар. Процес висушування залежить від швидкості переміщення та відведення пари та тепла, що використовується для сублімації. Тепло, необхідне для сублімації, забезпечується конвекцією та теплопровідністю. Тривалість та параметри цього етапу визначаються експериментальним шляхом.

3. *Вторинне висушування* – на цьому етапі відбувається видалення зв'язаної води. Наприкінці цього періоду температура препарату сягає 25–35 °С і відбувається видалення залишкової кількості зв'язаної води (близько 5–15 %), а залишкова вологість не має перевищувати 2–5 %. Випаровування вологи з матеріалу при висушуванні зв'язане з витратою певної енергії, необхідної на розрив молекулярних зв'язків. Наявність цієї енергії забезпечується підведенням тепла від нагрівальних елементів, розташованих у полиці сублиматора, на якій знаходиться препарат, що ліофілізується. Силіконова емульсія, яка знаходиться в полицях, забезпечує постійний і рівномірний прогрів полиць і препарату.

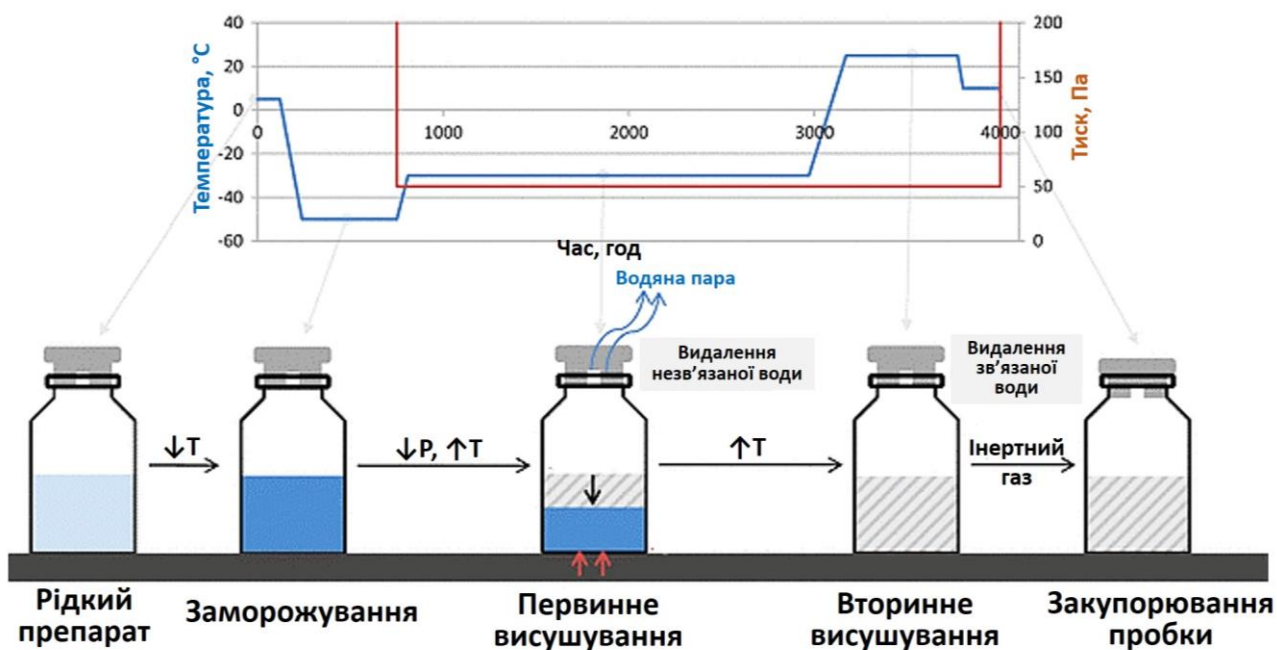


Рисунок 1.13 – Зміна температури та тиску в процесі ліофілізації

4. *Завершення процесу ліофілізації* – на цьому етапі проводять закупорювання та герметизацію флаконів або ампул. Флакони можна закупорювати безпосередньо в камері сублиматора або в атмосфері інертного газу, або у вакуумі. Для цього використовують спеціальні пробки для ліофі-

лізації з прорізом. Пробки для сублімаційного висушування поміщають у флакон на половину довжини таким чином, щоб між внутрішньою частиною флакона і областю навколо нього був отвір для виходу парів. Наприкінці циклу ліофілізації пробки повністю вдавлюються у флакони спеціальним пристроєм, що знаходиться в камері. У камеру субліматора через стерилізуючі фільтри можна подавати стерильний інертний газ для заповнення флаконів.

На рисунку 1.14 представлена схема проведення процесу ліофілізації.

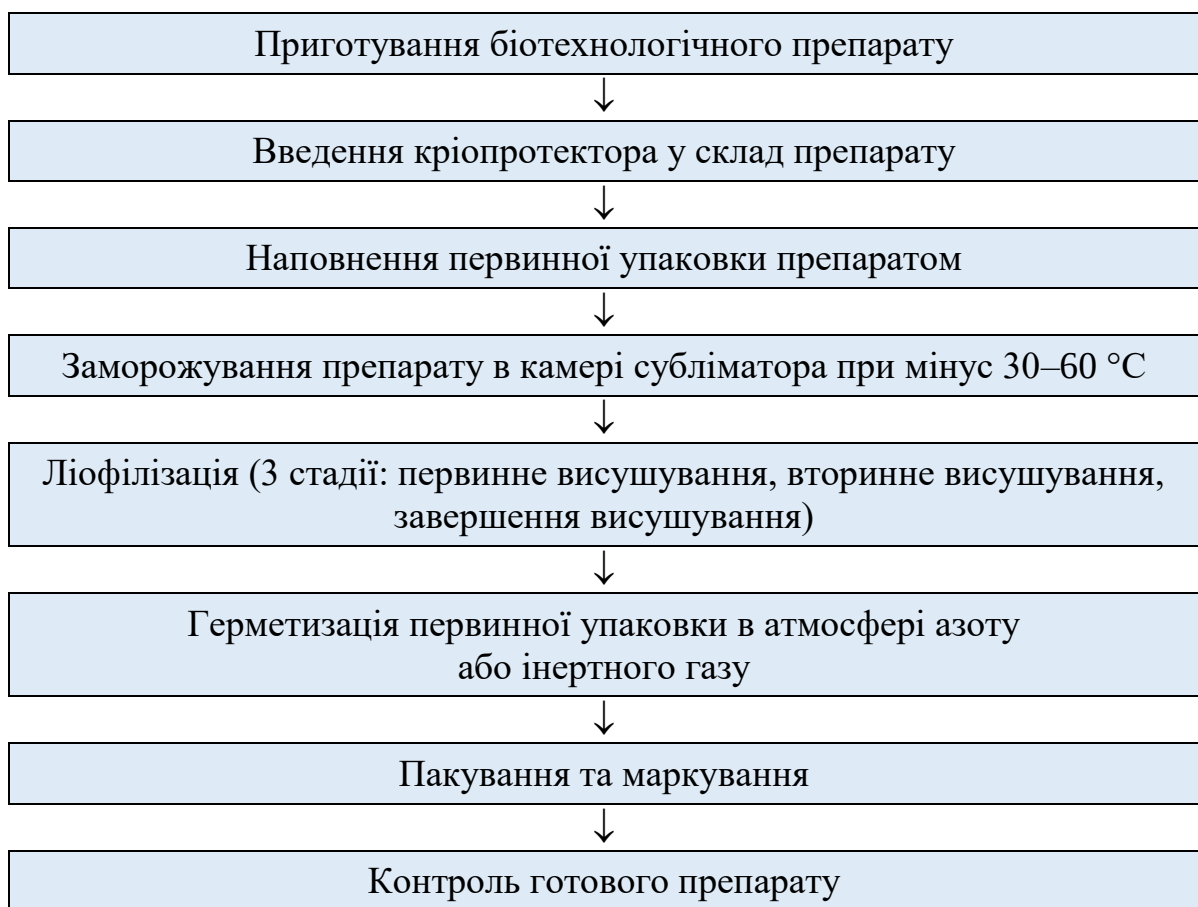


Рисунок 1.14 – Схема проведення процесу ліофілізації

Самостійним питанням є *визначення залишкової кількості води* в ліофілізованих вакцинних препаратах. Вода в ліофілізованих вакцинах визначає збереження імунобіологічних та фізико-хімічних властивостей препаратів у процесі зберігання. Вміст залишкової води визначають за допомогою сертифікованих методів:

- ✓ метод Бейкера (при 60 °С у вакуумі протягом встановленого часу);

- ✓ метод Карла Фішера (амперометричним титруванням з використанням реактиву Фішера);
- ✓ метод газової хроматографії.

Регламентований вміст води в препаратах становить не більше 2–5%.

В даний час на світовому ринку обладнання для ліофілізації біологічних препаратів, зокрема вакцин, присутня значна кількість фірм-виробників, серед яких добре відомі: *Martin Christ* (Німеччина); *VirTis* (США); *Edwards* (США); *LabConco* серія *FreeZone* (США); *Jouan* серія *Heto*, (Данія / Франція); *CleanVac Hanil Science Industrial Co.* (Південна Корея), *Niro-Atlas-Stord Denmark A/S* (Данія) та ін.



Рисунок 1.15 – Ліофільні сушарки фірми *Martin Christ Freeze Dryers*: лабораторна і промислова

Промислові ліофільні сушарки мають об'єм конденсатора від 10 до 500 літрів. При виготовленні ліофілізаторів використовується високоякісна сталь AISI 316 L. Температура конденсатора становить від мінус 60 до мінус 85 °C. Наприклад, при використанні обладнання *CleanVac* для ліофілізації вакцин у флаконах діаметром 23 мм можна ліофілізувати від 1000 до 25000 флаконів залежно від марки апарату.

Сьогодні можна сформулювати такі *основні вимоги для субліматорів вірусних та бактеріальних препаратів*:

1. Усі необхідні дані про роботу сублімаційного сушарки повинні бути виведені на двосторонній дисплей, а інформація про температуру та тиск відображається у вигляді інформативних та наочних графіків.

2. Апарати повинні з'єднуватися з комп'ютером чи самописцем через інтерфейс.

3. У всіх системах охолодження апаратів бажано використання холодоагентів, які не містять фреон.

4. Необхідна можливість закупорювання флаконів у камері у вакуумі або атмосфері інертного газу / азоту.

5. Повне використання поверхні конденсатора, що має забезпечити високу продуктивність апарату.

6. Можливість зміни конфігурації за рахунок зсуву полиць (збільшення або зменшення відстані між полицями).

7. Наявність системи стерилізації камери (термічна чи газова обробка).

8. Бажано мати ізолюючий кран між камерою та конденсатором, що дозволяє визначити закінчення висушування та незалежно розділити камеру та конденсатор.

9. Температура полиць регулюється рідким силіконом, що гарантує точне регулювання та однорідний розподіл температури.

10. Система датчиків усіх виробничих властивостей.

11. Мікропроцесорний контроль з цифровою індикацією параметрів тиску та температури, а також можливість регулювання тиску повітряного потоку та автоматичне відкриття перехідного клапана за показниками температури.

12. Апарати повинні бути оснащені системами стерилізації парою або хімічної стерилізації – системою SIP (англ. – *sterilization in place*) та системою CIP (англ. – *cleaning in place*) для забезпечення високої якості очищення та стерилізації.

1.9.2. Кріопротектори при ліофілізації

Необхідно зупинитися на питанні захисних речовин (*кріопротекторів*), що використовуються у процесі сублімації для захисту мембран мікроорганізмів від механічних пошкоджень кристалами льоду. За функціональним призначенням кріопротектори являють собою речовини, які захищають продукт від переохолодження та супутніх термічних та механічних впливів переважно на етапі заморожування. Кріопротекторами є сполуки різних хімічних класів, об'єднані здатністю стабілізувати компонен-

ти препаратів при заморожуванні: маніт, сахароза, лактоза, трегалоза, полімери (декстран, ПВП і ПЕГ), амінокислоти (гліцин).

Існує кілька теорій механізму стабілізації мембран під час заморожування. Сьогодні дедалі більше дослідників дотримуються думки про *вплив кріопротекторів на поверхневий натяг води*. Автори припускають, що внаслідок зменшення поверхневого натягу води після додавання кріопротекторів, відбувається переважно гідратація поверхні молекул речовини, ліпосомальних наночастинок, бактерій або вірусів. Термодинаміка цього процесу аналогічна тому, що відбувається на межі поділу повітря-вода: розчинена речовина частково виключається з межі поділу, що збільшує поверхневий натяг розчину. Це явище збільшує вільну енергію розгортання нативної конформації об'єкта і збільшують його стабільність.

Другим механізмом кріозахисту є *зменшення адсорбції речовини на поверхні кристалів льоду*.

Третім механізмом кріозахисту, що стабілізує продукт в кінці заморожування, є *збільшення в'язкості концентрату, який заморожується*. Ближче до кінця замерзання продукт, що піддається ліофільному висушуванню, диспергується в матриці речовини кріопротектора, в якій в'язкість стає дуже високою і уповільнює молекулярну рухливість і, як наслідок, швидкість денатурації, агрегації, лізису і т.д. До того ж можлива стабілізація продукту, завдяки запобіганню кристалізації буферного компонента, тим самим, усуваючи великий зсув рН, що дестабілізує структуру продукту.

Одним із продуктів нанобіотехнології є препарати на основі штучних мембран (ліпосом). Ліпосоми являють собою сферичні везикули, в яких водна фаза оточена однією або декількома бішаровими мембранами, утвореними фосфоліпідними молекулами, наприклад, фосфатидилхоліном. При заморожуванні, ліофілізації та подальшій регідратації у воді відбувається реорганізація ліпосом та вивільнення значної частини гідрофільного внутрішнього вмісту у зовнішній розчин. Крім цього, при висушуванні ліпосом з ліпофільними речовинами в мембранах ліпосом може спостерігатися зміна структури, поява вільної ліпофільної речовини та агрегація частинок. Тому для запобігання руйнуванню ліпосом та зміни їх структури застосовують кріопротектори. Таким чином, обов'язковою умовою цілісності везикул при ліофілізації та зберіганні сухого препарату є наявність кріопротектора, який забезпечує цілісність ліофілізованого продукту

за рахунок стабілізації мембран у рідкокристалічному стані. Основний критерій для вибору ефективного кріопротектора – його здатність стабілізувати інкапсульований у ліпосоми лікарський АФІ при дегідратації. Як кріопротектори-стабілізатори ліпосом зазвичай використовують вуглеводи: сахарозу, лактозу, трегалозу тощо. Лактоза ефективно використовувалася для ліофілізації ряду ліцензованих ліпосомальних препаратів. Захисний ефект цукрів може бути пов'язаний зі здатністю вуглеводу діяти як проміжна матриця між окремими везикулами, запобігаючи їх зближенню. Це може бути пов'язане з тим, що однією з передумов мембранного злиття є близький контакт двох бішарів.

Сьогодні для захисту вірусів та бактерій у процесі сублімації використовуються різні речовини, до яких висуваються такі вимоги:

- ❖ максимальне збереження нативної структури мікроорганізмів;
- ❖ відсутність антигенних, ад'ювантних, токсичних та пірогенних властивостей;
- ❖ сумісність із біологічним матеріалом;
- ❖ висока розчинність після проведення процесу сублімування.

Перевага надається натуральним продуктам, які легко розчиняються у водних розчинах, негігроскопічним, стабільним при зберіганні та економічно доступним. Сьогодні для ліофілізації вакцинних препаратів зазвичай використовують гідролізований желатин (температура замерзання – мінус 32 °С), сорбітол (мінус 28 °С), глутамінат натрію (мінус 58 °С), лактоза (мінус 24 °С), сахароза (мінус 33 °С) та ряд інших. Найчастіше використовуються комбіновані варіанти кріопротекторів, наприклад, з ліопротекторами. Кріопротектори для конкретних імунобіотехнологічних препаратів будуть розглянуті у відповідних розділах цієї публікації.

1.10. Методи аналізу та характеристики білкових молекул

Імуноферментний аналіз (ІФА, ELISA). Метод ІФА широко використовується для ідентифікації та кількісного визначення білкових молекул, зокрема вакцин, цитокінів, окремих антигенів, терапевтичних білків та інших компонентів біотехнологічних препаратів. Цей метод було започатковано у 1971 році, коли Е. Engvall та Р. Perelman опублікували першу статтю про ІФА, в якій навели експериментальні дані кількісного визначення IgG в сироватці кролика з використанням ферменту лужної фосфа-

тази. ІФА – високочутливий метод імуноаналізу, який дозволяє специфічно визначити антиген або антитіло у досліджуваному зразку, що обумовлює його широке використання у діагностичних дослідженнях. ІФА проводять переважно на мікропланшетах, дно якого служить твердою поверхнею, до якої безпосередньо або через антитіло прикріплюється цільовий компонент суміші (рис. 1.16). В аналізі використовується антиген або антитіло, закріплені на твердій поверхні, які специфічно зв'язуються із цільовою молекулою у досліджуваному зразку. Детекцію результатів зв'язування проводять шляхом додавання антитіл, кон'югованих з ферментами, і вимірювання зміни активності ферментів, яка пропорційна концентрації антигена і антитіла в досліджуваному зразку.

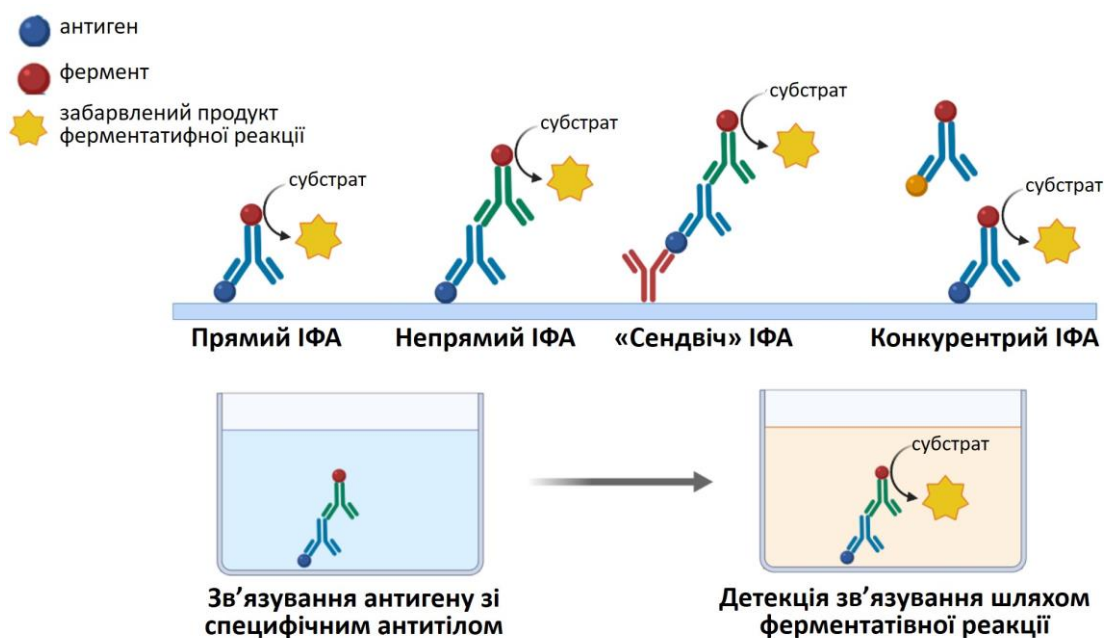


Рисунок 1.16 – Принцип імуноферментного аналізу

Електрофорез у поліакриламідному гелі без детергенту та з додецилсульфатом натрію. Розподіл молекул у поліакриламідному гелі відбувається за рахунок відмінностей їх заряду і молекулярної маси. Цим методом можна розділити макромолекули: білки та нуклеїнові кислоти. Електрофорез білків можна проводити в нативному та денатурованому стані. Для вивчення білків у денатурованому стані зразки попередньо денатурують кип'ятінням у буфері, який містить сильний іонний детергент – додецилсульфат натрію. SDS-PAGE (англ. – *Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) є методом з високою роздільною здатністю для білків залежно від їх розміру (рис. 1.17). Білки здатні рухатися

під дією електричного поля в середовищі, рН якого відрізняється від їхньої ізоелектричної точки. Різні білки та їх суміші мігрують у гелі з різною швидкістю залежно від співвідношення між їх зарядом та масою. Додавання додецилсульфату натрію денатурує білки, тому їх слід розділяти виключно по молекулярній масі.

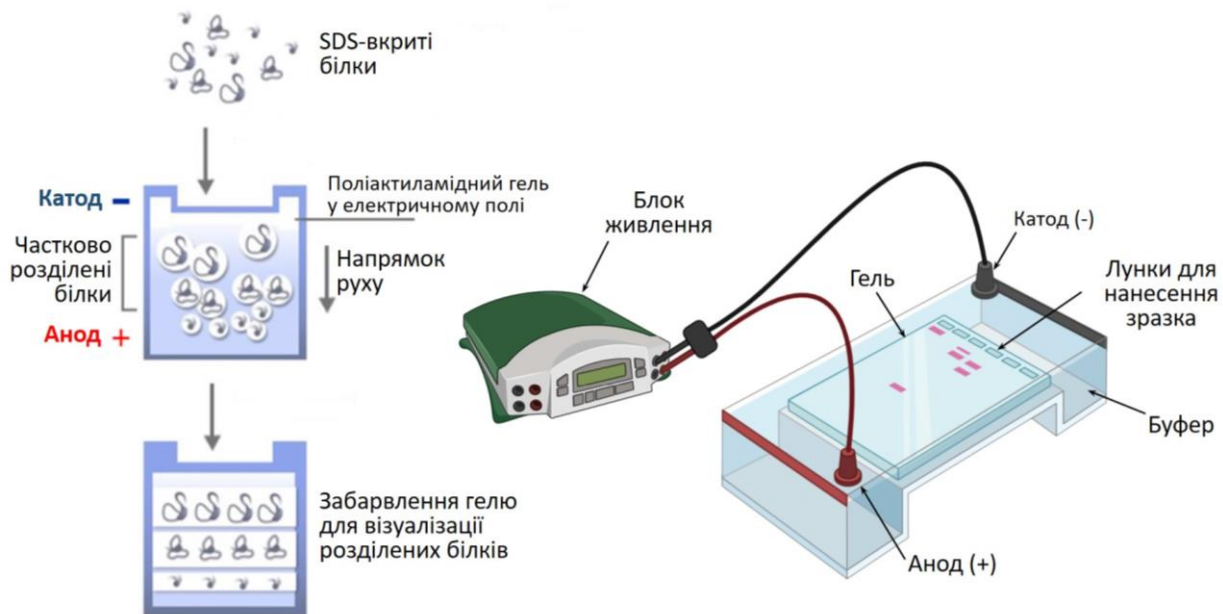


Рисунок 1.17 – Електрофорез у поліакриламідному: принцип розділення білків у SDS-PAGE (зліва), установка для SDS-PAGE (справа)

Двовимірний гель-електрофорез. Повне розподіл складної суміші білків досить важко здійснити в результаті одного електрофорезу. Тому в складних випадках кожену смужку після першого електрофоретичного фракціонування суміші білків необхідно перевірити на гомогенність, використовуючи її як вихідний препарат для електрофорезу, який проводять за умов відмінних від першого. Двовимірний електрофорез у поліакриламідному гелі (2D-PAGE) є ефективним та надійним методом розділення білків на основі їх маси та заряду. 2D-PAGE здатний послідовно розділяти близько 5000 різних білків залежно від розміру гелю. Білки розділяють по заряду на першому етапі, а на другому етапі розділення відбувається з урахуванням відмінностей їх молекулярних мас. 2D-PAGE успішно застосовується для характеристики посттрансляційних модифікацій, мутантних білків та оцінки метаболічних шляхів.

Вестерн-блотинг є ефективним методом виявлення специфічних білків при їх низькій концентрації у зразку. Метод включає розділення біл-

ків за допомогою електрофорезу (SDS-PAGE), перенесення на нітроцелюлозну мембрану з подальшим виявленням цільового білка за допомогою кон'югованих з ферментом антитіл (рис 1.18, 1.19). Вестерн-блотинг є перспективним інструментом для виявлення антигенів різних мікроорганізмів, а також може бути використаний для діагностики інфекційних захворювань.

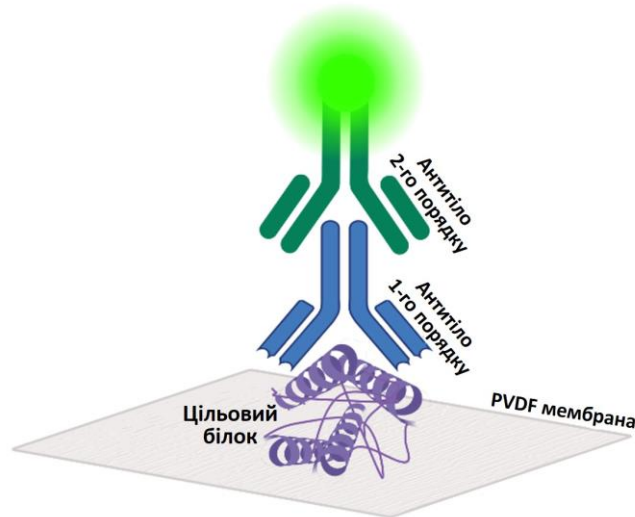


Рисунок 1.19 – Принцип зв'язуванні білка та забарвлення у вестерн блотингу: антитіло 1-го порядку – специфічне до цільового білка, антитіло 2-го порядку – специфічне до антитіла 1-го порядку; PVDF – полівініліденфторид

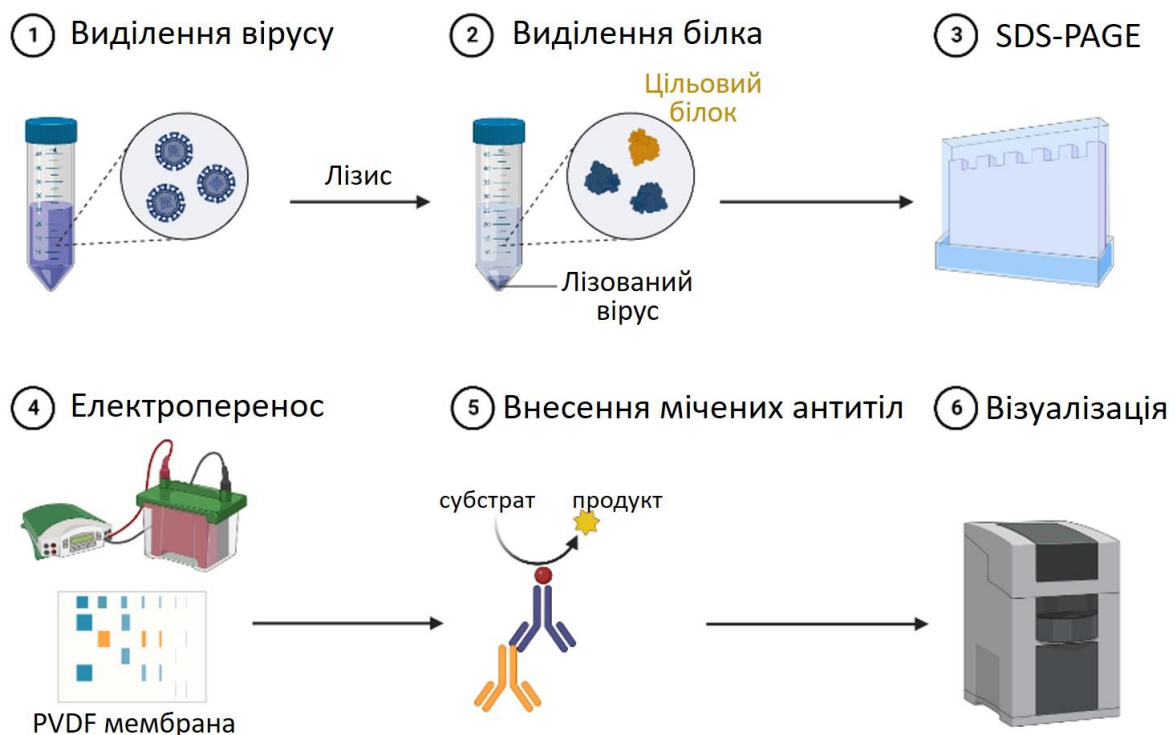


Рисунок 1.1 – Основні етапи проведення вестерн блот експерименту

Полімеразна ланцюгова реакція – це метод молекулярної біології, який дозволяє досягти значного збільшення малих концентрацій певних фрагментів ДНК у біологічному матеріалі. За допомогою ПЛР проводять ампліфікацію – процес утворення додаткових копій ділянок хромосомної ДНК.

Мас-спектроскопія використовується для вимірювання співвідношення маси до заряду (m/z), що важливо для визначення молекулярної маси білків. Процес складається із трьох етапів: на першому етапі молекули повинні бути перетворені та іони газової фази, що створює проблему для біомолекул у рідкій або твердій фазі; другий етап включає розподіл іонів на основі значень m/z у присутності електричних або магнітних полів у відсіку, відомому як мас-аналізатор; на третьому етапі вимірюють розділені іони та кількість кожного виду з відповідним значенням m/z . Зазвичай метод іонізації включає іонізацію з лазерною десорбцією з використанням матриці (MALDI), лазерну десорбцію / іонізацію з посиленою поверхнею (SELDI) та іонізацію електророзпиленням (ESI).

ЯМР – ядерно-магнітно-резонансна спектроскопія – є найважливішим методом для дослідження молекулярної структури, укладання та поведінки білків. Метод дозволяє ідентифікувати та досліджувати речовини на основі ядерно-магнітного резонансу. Для методу доступні всі ядра, що мають не нульовий спин: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P та ін. Визначення структури за допомогою ЯМР-спектроскопії зазвичай включає різні етапи, на кожному з яких використовується дискретний набір надзвичайно специфічних методів, які включають підготовку зразків, проведення вимірювання та подальшу інтерпретацію підходів для підтвердження структури. Структура білка є фундаментальною в кількох галузях досліджень, таких як розробка ліків на основі структури, моделювання гомології та функціональна геноміка.

Запитання для самоконтролю

1. На які основні етапи можна розділити процес очищення імунобіологічних препаратів?
2. Які фактори впливають на ефективність екстракції?
3. Яка властивість біомолекул лежить в основі афінної хроматографії?
4. Що являє собою нерухома фаза при гель-фільтрації?
5. Які види іонообмінників існують?

6. Якою величиною характеризується ефективність центрифугування?
7. У чому особливості конструкції сепараторів?
8. Які речовини використовують для створення градієнта щільності?
9. У чому переваги та недоліки методу ультрафільтрації?
10. У якому випадку доцільно використовувати стерилізуючу фільтрацію?
11. Які методи дезінтеграції Вам відомі?
12. Назвіть основні стадії процесу ліофілізації. Які процеси відбуваються у висушуваній масі на кожному з них?

Список джерел інформації до розділу 1

1. Баркарь Є. В. Методи біотехнологічних досліджень : курс лекцій / Є. В. Баркарь. – Миколаїв : МНАУ, 2019. – С. 20-29.
2. Белоус А. М. Научные основы сублимационного консервирования / А. М. Белоус, И. Д. Цветков. – Київ : Наукова думка, 1985. – 208 с.
3. Герасименко В. Г. Біотехнологія: Підручник / В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін. – Київ : Фірма «ІНКООС», 2006. – 647 с.
4. Дудниченко А. С. Липосомальные лекарственные препараты в эксперименте и клинике / А. С. Дудниченко, Ю. М. Краснопольский, Швеи В.И. – Харьков : «РА-Каравелла», 2001. – 143 с.
5. Жукова А. І., Волков Г. Л. Афинна хроматографія на блакитній сефарозі в розробці технологій очистки білків із отрути змій / А. І. Жукова, Г. Л. Волкову // Вісник ЗНУ. – 2012. – №3. – С. 160-164.
6. Капрельянц Л. В. Теоретичні основи біотехнології : навч. посіб. / Л. В. Капрельянц. – Харків : Факт, 2020. – 291 с.
7. Краснопольский Ю. М. Биотехнология иммунобиологических препаратов: монография / Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская. – Харьков : Фармитек, 2008. – 312 с.
8. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов : учеб. пособ. / Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2009. – 351 с.
9. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ. Часть I : учеб. пособ. / Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2012. – 303 с.
10. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ. Часть II : учеб. пособ. / Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2013. – 192 с.

11. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: аспекты фармацевтической химии : учеб. пособ. / Ю. М. Краснопольский, О. В. Звягинцева. – Харьков : НТУ "ХПИ", 2018. – 247 с.
12. Краснопольський Ю. М. Фармацевтична біотехнологія: Біотехнології виробництва готових лікарських форм : навч. посіб. / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : ТОВ «ДРУКАРНЯ МАДРИД», 2020. – 279 с.
13. Краснопольський Ю. М. Фармацевтична біотехнологія: сьогодення та майбутнє : навч. посіб. / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : ТОВ «Друкарня Мадрид», 2022. – 151 с.
14. Краснопольський Ю. М. Створення систем доставки антигенів та ліків на основі штучних і природних ліпідних наночастинок: ліпосоми та екзосоми : монографія / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : Друкарня Мадрид, 2023. – 179 с.
15. Курта С. А. Промислові біотехнології : курс лекцій / С. А. Курта, В. П. Супрун // Івано-Франківськ : ПрНУ ім. Василя Стефаника, 2018. – 197 с.
16. Кучеренко М. Є. Сучасні методи біохімічних досліджень: підручник / М. Є. Кучеренко, Ю. Д. Бабенюк, В. М. Войцицький. – Київ : Фітосоціоцентр, 2001. – С. 286-292.
17. Мацай Н. Ю. Основи біотехнології : підручник / Н. Ю. Мацай. – Луганськ : ДЗ «ЛНУ імені Тараса Шевченка», 2011. – 133 с.
18. Мехед О. Б. Біоорганічна хімія : навч. посіб. / О. Б Мехед., Б. В. Яковенко, О. П. Третякю – Чернігів : ЧНПУ імені Т. Г. Шевченка, 2013. – 208 с.
19. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2020 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика. Київ : МОЗ України. 2020. – 356 с.
20. Перцев І. М. Допоміжні речовини в технології ліків: вплив на технологічні, споживчі, економічні характеристики і терапевтичну ефективність / І. М. Перцев, Д. І. Дмитрієвський, В. Д. Рибачук та ін. – Харків : Золоті сторінки, 2010. – 600 с.
21. Полісахаріди. / у кн.: Фармацевтична Енциклопедія. 2-ге видання доп. – Київ : Моріон, 2010. – С. 1132-1134.
22. Старовойтова С. О. Технологія пробіотиків: підручник / С. О. Старовойтова, О. І. Скроцька, Ю. М. Пенчук, Т. П. Пирог // – Київ : НУХТ, 2012. – 318с.
23. Стасевич М. Б. Технологічне обладнання фармацевтичної та біотехнологічної промисловості : підручник / С. Т. Стасевич, А. О. Милянйч, Л. С. Стрельников та ін. – Львів : «Новий Світ-2000», 2017. – 410 с.
24. Сухенко В. Ю. Технологічне обладнання фармацевтичних та мікробіологічних виробництв : конспект лекцій / В. Ю. Сухенко, О. М. Прохоров, І. В. Житнецький. – Київ : НУХТ, 2008. – 90 с.

25. Чуешов В. И. Основы биотехнологии : учеб. пособ. / В. И. Чуешов, Л. И. Богуславская, Ю. М. Краснопольский и др. – Харків : УкрФА, 1995.– 117 с.
26. Юлевич О. І. Біотехнологія : навч. посіб. / О. І. Юлевич, С. І. Ковтун, М. І. Гиль; за ред. М. І. Гиль. – Миколаїв : МДАУ, 2012. – 476 с.
27. Adams G. D. J. Freeze-drying of biohazardous products. In: Biosafety in Industrial Biotechnology / G. D. J. Adams, P. Hambleton, J. Melling – London Blackie Academic and Professional, 1994. – P. 178–212. – https://doi.org/10.1007/978-94-011-1352-6_10
28. Affinity Chromatography. Principles and Methods : Handbook. – Uppsala : GE Healthcare Bio-Sciences, 2007. – 159 p.
29. Aslam B. Proteomics: Technologies and Their Applications / B. Aslam, M. Basit, M. A. Nisar et al. // Journal of Chromatographic Science. – 2017. – V. 55(2). – P. 182-196. – <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>
30. Chan M. Y. Lyophilization of Adjuvanted Vaccines: Methods for Formulation of a Thermostable Freeze-Dried Product / M. Y. Chan, T. S. Dutil, R. M. Kramer // Methods in Molecular Biology. – 2017. – V. 1494. – P. 2015-226. – https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6445-1_15
31. Clara separator disc stack centrifuge technology. – Alfa Laval, 2016. – [Internet resource] – URL: www.alfalaval.com
32. Hosseini P. Comparison of two gel filtration chromatography resins for the purification of foot-and-mouth disease virus as a purified vaccine antigen / P. Hosseini, H. Mahravani, M. Azimi, S. Shahsavandi // Vaccine Research. – 2016. – V. 3(3,4). – P. 44-49. – <http://dx.doi.org/10.18869/acadpub.vacres.3.7.6>
33. Huang X. Guideline for the extraction, isolation, purification, and structural characterization of polysaccharides from natural resources / X. Huang, C. Ai, H. Yao et al. // eFood. – 2022. – V. 3(6). – e37. – <https://doi.org/10.1002/efd2.37>
34. Keulen D. Recent advances to accelerate purification process development. A review with a focus on vaccines / D. Keulen, G. Geldhof, O. L. Bussy et al. // Journal of Chromatography A. – 2022. – V. 1676. – ID 463195. – <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463195>
35. Klyashchitsky B. A. Preparative isolation of polyphosphoinositides and other anionic phospholipids from natural sources using chromatography on adsorbents containing primary aminogroups / B. A. Klyashchitsky, I.xV. Mezova, Yu. M. Krasnopolsky, V. I. Shvets // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 1991. – V. 14. – P. 180-192.
36. Klyashchitsky B. A. Use of biospecific interactions of collagen, fibronectin and their fragments in affinity chromatography / B. A. Klyashchitsky, V. Kh. Miti-

- na, Yu. M. Krasnopolsky, V. I. Shvets // Journal of Chromatography. – 1992. – V. 577. – P. 267-273. – [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(92\)80247-n](https://doi.org/10.1016/0378-4347(92)80247-n)
37. Lin S. Recent advances on protein separation and purification methods / S. Lin, Z. Li, B. Yu et al. // Advances in Colloid and Interface Science. – 2020. – V. 284. – ID 102254. – <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102254>
 38. Luang J. H. T. Fundamental aspects of protein isolation and purification / J. H. T. Luang // Three Phase Partitioning. – 2021. – P. 23-58. – <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-824418-0.00013-8>
 39. Sim L.-J. Sticking in or Standing Out? Dichotomy in vaccine Purification By Chromatography / Sim L.-J., Ito T., Pattnaik P. // BioProcess International. – 2018. – [Internet resource] – URL: <https://www.bioprocessintl.com/sponsored-content/sticking-in-or-standing-out-dichotomy-in-vaccine-purification-by-chromatography>
 40. Shi L. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. / L. Shi // International Journal of Biological Macromolecules. – 2016. – V. 92. – P. 37-48. – <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.100>
 41. Zhao M. Affinity chromatography for vaccines manufacturing. Finally ready for prime time. / M. Zhao, M. Vandersluis, J. Stout et al. // Vaccine. – 2019. – V. 37(36). – P. 5491-5503. – <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.090>
 42. Gel Filtration: Principles and Methods. – Amsterdam Biosciences AB. – 120 p.
 43. Heath N. Rapid isolation and enrichment of extracellular vesicle preparations using anion exchange chromatography / Heath N., Grant L., Oliveira T. et al. // Scientific Reports. – 2018. – V. 8(1). – ID 5730. – <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24163-y>
 44. Hu Y. Application of membrane filtration to cold sterilization of drinks and establishment of aseptic workshop / Y. Hu, W. Wi // Food and Environmental Virology. – 2023. – V. 15(2). – P. 89-106. – <https://doi.org/10.1007 %2Fs12560-023-09551-6>

РОЗДІЛ 2. ІСТОРІЯ СТВОРЕННЯ ВАКЦИН. КЛАСИФІКАЦІЯ ВАКЦИН. АНТИГЕНИ ТА ІМУННА ВІДПОВІДЬ. ГАПТЕНИ. АД'ЮВАНТИ

2.1. Історія створення вакцин

Історія імунології – це приклад успіху суто емпіричного методу. Імунологія здобувала перемоги ще до того, як хтось припустив існування мікроорганізмів, від яких вона захищала. Імовірно, все почалося з давніх китайців і арабів, які багато століть тому помітили, що людина, яка перехворіла на віспу, рідко занедужує на неї знову. У Європу віспу було завезено у VI ст.н.е. Великі епідемії віспи забирали мільйони життів. У XVII столітті від віспи померло понад 60 млн європейців. У 1770 році в Індії померли 3 млн осіб, у 1782 році на віспу хворіло майже 90 % населення Італії.

В Англії практику щеплення від віспи запровадила леді Монтегю, дружина британського посла в Константинополі, яка під час перебування там зробила щеплення від віспи своєму синові. Повернувшись до Лондона у 1718 році, вона зробила рішучу спробу поширити щеплення від віспи серед своїх співвітчизників. Незважаючи на грім і блискавки, які обрушилися на неї, леді Монтегю випробувала щеплення на шести засуджених у Ньюгейтській в'язниці, а потім на сиротах з приходу Лондонської церкви Св. Якова. Справжній тріумф настав, коли принцеса Кароліна дозволила прищепити віспу двом донькам короля. З того часу практика щеплень значно поширилася. Доктор Вілсон, автор книги «Тіло і антитіло», писав: «У 1718 році одна принцеса як доказ коштувала стільки ж, скільки сотні тисяч звичайних дітей у 1956 році...». Як би там не було, щеплення швидко поширилися не тільки в Англії, а й по всій Західній Європі. Зазначалося, що здатність щеплення від віспи попереджати смерть, особливо молодих чоловіків і жінок, стала вирішальним чинником значного приросту населення Англії у першій половині XVIII століття. Але, зрозуміло, що і самі щеплення викликали смертність, до того ж чималу, оскільки сама процедура на той час була вкрай небезпечною, а щеплювальний матеріал цілком

міг дати поштовх до епідемії віспи. У зв'язку з цим почалися пошуки безпечнішого матеріалу для проведення щеплень. На території Російської імперії віспа була відома ще в XV столітті. У XVII столітті віспа забрала третину населення Сибіру, а у тих, хто перехворів, розвивались важчі ускладнення – сліпота і глухота. Так, у 1904–1913 роках на віспу хворіли понад 4 млн осіб, з них 400 тис. загинули, десятки тисяч – залишилися сліпими.

З початку 1771 року (Англія) до кінця XIX століття було запропоновано та апробовано 4 вакцини (вакцина проти віспи, холерна вакцина Хавкіна, антирабічна вакцина Пастера, тифозна вакцина Райта).

Основоположником вакцинології без сумніву можна вважати лікаря *Едварда Дженнера* (1749–1823). Дженнер виявив, що селяни, які працюють з великою рогатою худобою і перехворіли на коров'ячу віспу, не гинули від натуральної віспи. У 1776 році він використав матеріал пустули однієї з доярок, який він ввів хлопчику, восьмирічному Джеймсу Фіпсу, про життя якого до і після досліду нам нічого не відомо. За допомогою ланцету Дженнер взяв трохи рідини з гнійника жінки, яка заразилася коров'ячою віспою, і відразу зробив тим же ланцетом надрізи на руці хлопчика. Через кілька днів у Джеймса з'явилися жар і головний біль, а в місці надрізу утворився гнійник. Однак температура і всі симптоми швидко зникли, гнійник, проіснувавши кілька днів у вигляді маленької виразки, благополучно підсох. Хлопчик перехворів на коров'ячу віспу, після чого через шість тижнів Дженнер заразив його вірусом натуральної віспи. Хлопчик не захворів. На щастя для обох, Дженнера та Фіпса, імунітет справді виробився. Таким чином, практика вакцинації набула експериментальної основи. Ця процедура стала називатися *вакцинацією*, оскільки основний хвороботворний матеріал брався від корови (лат. – *vacca*). Дженнер почав проводити масові щеплення, що дозволило значно знизити смертність в Англії від натуральної віспи.

Таким чином, вакцинація проти віспи була першим усвідомленим масовим щепленням у світовій практиці. До 1800 року було вакциновано близько 100 000 чоловік. Сьогодні через 230 років ми можемо говорити про перемогу вакцинології над цим особливо небезпечним захворюванням. Підтвердженням цього є факт скасування обов'язкових щеплень проти віспи у зв'язку з повним глобальним викоріненням даного вірусу на Землі. Останній випадок натуральної віспи внаслідок природного зара-

ження мав місце у Сомалі 1978 року. В даний час вірус натуральної віспи розглядається світовим співтовариством як один з найімовірніших об'єктів застосування в біотерористичних акціях. Крім того, існує реальна загроза появи віспоподібного захворювання, про що свідчать численні спалахи захворювання людей на віспу мавп (Заїр) та віспу буйволів (Індія).

Значний внесок у розвиток вакцинології зробив *Луї Пастер* (1822–1895), який заслужено вважається основоположником імунології. З 1880 року Пастер розпочав проведення експериментів, спрямованих на штучне зниження вірулентності збудників інфекційних захворювань та одержання атенуованих штамів. Їм були отримані ослаблені штами збудників курячої холери та сибірської виразки. Пастер використовував принципи та методи атенуації бактерій при отриманні та практичному використанні вакцини проти сказу, про вірусну природу якого він міг тільки припускати. Отримавши так званий фіксований вірус сказу зі стандартним ступенем вірулентності, Пастер вводив його субоцепітально кроликам, викликаючи зараження. Потім спинний мозок цих кроликів піддавався висушуванню протягом різних проміжків часу, що викликало атенуацію вірусу та зменшення кількості живих частинок. Ці дослідження привели до створення антирабічних вакцин. І ось настав день, коли Пастер застосував своє мистецтво і свої відкриття вже не на тварині, а на людині: з Ельзасу до нього привезли хлопчика на ім'я Жозеф Майстер, якого покусав скажений собака. Пастер почав курс лікування, що складався з 13 ін'єкцій емульгованого матеріалу спинного мозку кролика, через три дні після того, як дитина була укушена. Хлопчик вижив і до кінця своїх днів працював воротарем Пастерівського інституту у Парижі.

Протягом багатьох століть холера була лихом Західної Європи, несучи сотні тисяч життів, тому не дивно, що розробка холерних вакцин наочно ілюструє розвиток імунології у роки її практичного застосування. Перші щеплення проти холери із застосуванням живих ослаблених мікроорганізмів виявилися надто небезпечним експериментом, що не дозволило розпочати реалізацію якихось широких програм. Однак завдяки невеликим змінам у технології виробництва вбитої вакцини (вібріон холери стали вбивати не високою температурою, а хімічною речовиною – фенолом) вдалося отримати вакцину, яка забезпечувала імунітет протягом приблизно одного року. Але для повної безпеки була потрібна повторна імунізація

кожні шість місяців, тому вакцина була придатна лише для використання напередодні епідемії. Тим часом хвороба в Європі була практично переможена, причому не програмами імунізації, а будівництвом каналізаційної мережі та водопроводу. Значний внесок у боротьбу з холерою та чумою зробив уродженець м. Одеси, учень Іллі Мечникова, бактеріолог та епідеміолог *Володимир Хавкін* (1860–1930). Вірний вченням Пастера про атенуацію мікробів для приготування вакцин, Хавкін приступив до створення препарату проти холери. Їм було доведено інфекційну природу холери та вперше розроблено вакцини проти холери (1892) та чуми (1896). Хавкін провів на собі досліди, що довели ефективність та безпечність цих вакцин. Як державний епідеміолог індійського уряду він брав участь у вакцинації населення в Індії під час епідемій холери і чуми.

Питаннями боротьби з черевним тифом займався англієць *Алмрот Райт* (1861–1947) – вчений, імунолог, який переміг черевний тиф. У 1887 році він застосував вакцинацію не просто як профілактичний захід, а як загальний метод лікування інфекцій. Райт визначав тип мікробів, що викликають місцеву інфекцію, культивував їх, вбивав та вводив отриману вакцину пацієнту.

З 1900 до 1960 року було розроблено 10 вакцин: БЦЖ-вакцина, вакцини проти кашлюку, правця, дифтерії, жива та інактивована вакцина проти поліомієліту, вакцини проти кору, паротиту, грипу та жовтої лихоманки. При ознайомленні з дослідженнями у сфері конструювання вакцин привертає увагу факт значної інтенсифікації у питанні створення та використання вакцин після 1970 року. У 1970–1975 роках були створені полісахаридні вакцини проти менінгококу А та С, вакцини проти краснухи та паротиту, жива та інактивована вакцини проти поліомієліту на основі людських диплоїдних клітин. Після 1975 року були запропоновані вакцини проти менінгококу В, пневмококів, псевдомонасу, герпесу 1 і 2, цитомегаловірусу, грипу, гепатиту А і В та ін. Одним з найважливіших досягнень вакцинології є створення вакцин на основі мРНК (2021–2022) , які дозволили розпочати боротьбу з пандемією COVID-19.

Ми докладно зупинилися на історії створення перших чотирьох вакцин, які використовуються цивілізацією для боротьби з особливо небезпечними інфекціями: черевним тифом, холерою, сказом, натуральною віспою, що забрали десятки мільйонів людських життів. Історія створення сучасних вакцин буде викладена у відповідних розділах цього видання,

присвячених окремим вакцинним препаратам. Висвітлити принципи конструювання, виробництва та контролю всіх існуючих сьогодні вакцин практично неможливо, тому ми зупинимося на вакцинах, які зараз застосовуються в Україні та входять до переліку *Календаря щеплень*, затвердженого МОЗ України.

Історію створення вакцин проти основних інфекцій можна подати у такому хронологічному порядку:

- ✓ віспа – 1798 рік;
- ✓ сказ – 1895 рік;
- ✓ чума – 1897 рік;
- ✓ дифтерія – 1923 рік;
- ✓ кашлюк – 1926 рік;
- ✓ туберкульоз – 1927 рік;
- ✓ правець – 1927 рік;
- ✓ жовта лихоманка – 1935 рік;
- ✓ поліомієліт (інактивована) – 1955 рік;
- ✓ поліомієліт (жива) – 1962 рік;
- ✓ кір – 1963 рік;
- ✓ епідемічний паротит – 1967 рік;
- ✓ краснуха – 1969 рік;
- ✓ гепатит В (плазмова) – 1981 рік;
- ✓ гепатит В (рекомбінантна) – 1986 рік;
- ✓ гемофільна В інфекція (Hb) – 1990 рік;
- ✓ гепатит А – 1992 рік;
- ✓ вітрянка – 1995 рік;
- ✓ кашлюк (ацелюлярний) – 1996 рік;
- ✓ ротавірус – 1999 рік;
- ✓ пневмокок – 2000 рік.
- ✓ вірус папіломи людини – 2006 рік;
- ✓ менінгокок серогрупи В – 2014 рік;
- ✓ малярія – 2021 рік;
- ✓ вірус Ебола – 2021;
- ✓ SARS-CoV-2 – 2021 рік.

На сьогоднішній день завдяки вакцинації можна захистити людину від більшості соціально-значущих інфекцій.

Необхідно зупинитись ще на одному питанні – *історії виробництва імунобіологічних препаратів в Україні з кінця XIX століття до наших днів*. У XX столітті в Україні існувало 5 підприємств із виробництва препаратів на основі бактерій та вірусів, які знаходились у Дніпропетровську, Києві, Одесі, Львові та Харкові. На сьогоднішній день в усіченому варіанті існує лише підприємство у м. Харкові. Історія цього підприємства є дуже показовою, за її допомогою можна простежити розвиток біотехнологічної промисловості в Україні за 130 років, починаючи з кінця XIX століття. У жовтні 2023 року підприємство «Біолік» могло б відзначити 125 років від дня заснування. «Біолік» – одне із найстаріших фармацевтичних підприємств України, і кожен період його розвитку є важливою віхою становлення як самого підприємства, так і всієї галузі виробництва імунобіологічних препаратів.

Розвиток підприємства «Біолік» є частиною історії світової фармацевтичної біотехнології. За минулі 125 років підприємство виробляло всі основні класи імунобіологічних препаратів: антитоксичні сироватки проти дифтерії, правця, гангрени, ботулізму та ін. інфекцій; вакцини проти дифтерії, правця, кашлюку, гепатиту В, сказу, туберкульозу та ін.; цитокіни – лейкоцитарний інтерферон та рекомбінантний інтерферон α -2b; пробіотики на основі аерококів, біфідобактерій, лактобактерій, кишкової палички; препарати фагів різної спрямованості; препарати крові людини – імуноглобуліни різної специфічності та форм введення, гістаглобулін та ін.; специфічні імуноглобуліни із крові тварин – антирабічний імуноглобулін; препарати для діагностики туберкульозу, сифілісу, гонореї та ін.; поживні середовища тощо.

2.2. Класифікація вакцин

Розглянемо класифікацію вакцин (рис. 2.1). Вакцини, наведені на рисунку, можна розділити на дві основні групи – *протівірусні та антибактеріальні*. У кожній групі присутні живі вакцини (кір, краснуха, епідемічний паротит, БЦЖ, поліомієліт), інактивовані вакцини (поліомієліт, кашлюк) та субодиничні – хімічні вакцини, рекомбінантні, анатоксини. Третьою важливою групою є *комбіновані вакцини*, у які можуть входити як протівірусні, так і протибактеріальні антигени, причому різних типів –

інактивовані, субодиничні та живі (АКДП-вакцина, «кір–краснуха–паротит», АКДП+гепатит В).

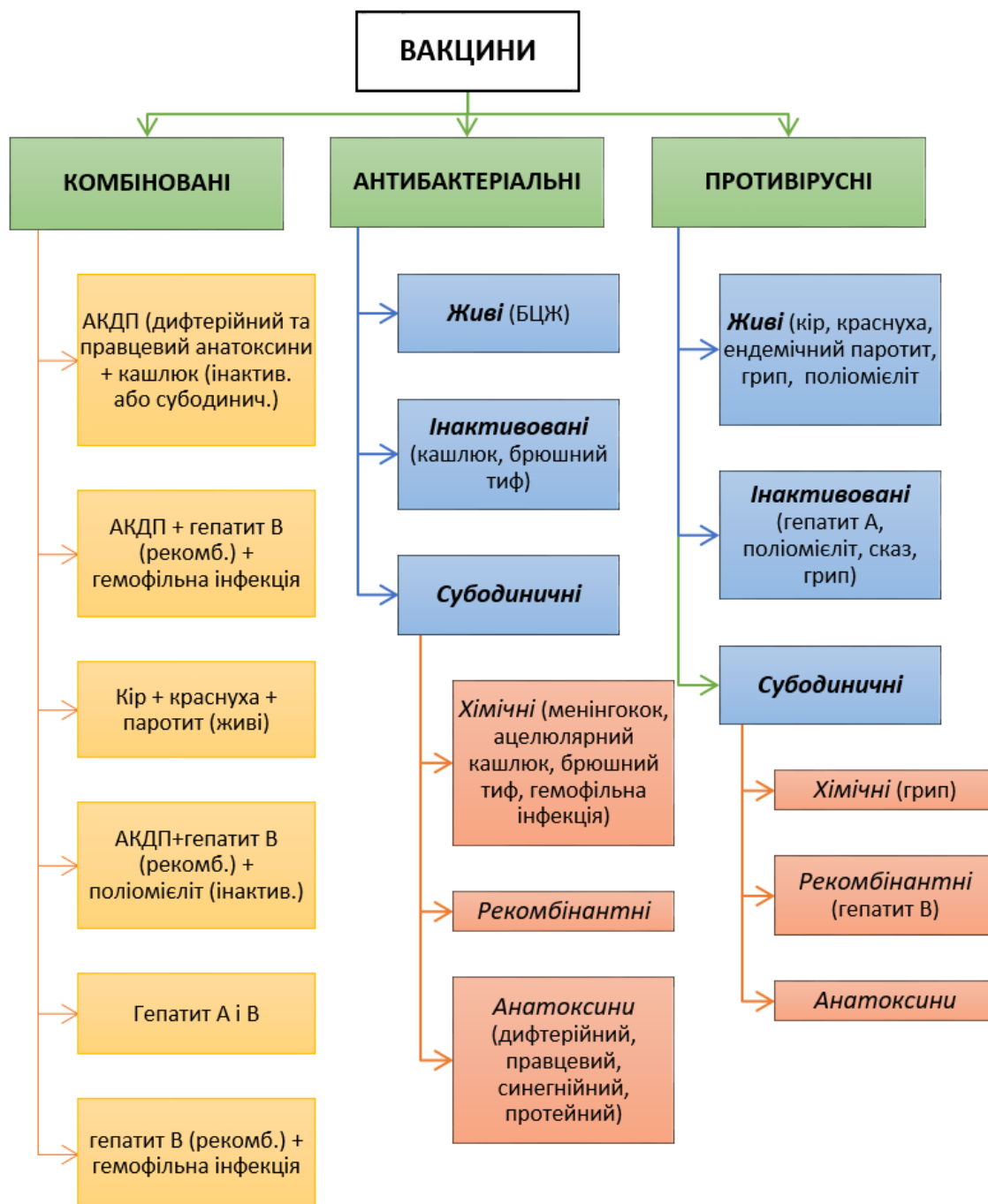


Рисунок 2.1 – Класифікація вакцин

Живі вакцини являють собою препарати, що складаються з атенуованих збудників інфекційних хвороб: бактерій та вірусів. *Атенуовані мікроорганізми* не здатні викликати специфічні захворювання, але зберігають здатність до розмноження в організмі вакцинованого та створення активного імунітету.

Атенуювання здійснюють такими методами:

- штучне отримання атенуйованих штамів збудників захворювання шляхом тривалого культивування на живильних середовищах за умов не оптимальних для росту;
- методом адаптації до нового господаря шляхом переведення вірусу або бактерії на інший вид тварини з відмінною сприйнятливістю;
- шляхом безпосереднього впливу мутагену на генетичний матеріал мікроорганізму;
- штучне отримання генетичних рекомбінантів, які зберегли імуногенність (при зниженій вірулентності);
- селекцією мутантів, які виникли спонтанно та характеризуються ослабленою вірулентністю, але зі збереженням специфічних протективних антигенів та імуногенності.

Інактивовані вакцини отримують шляхом інактивації вірусу або бактерій фізичними (температура, різні види опромінення та ін.) або хімічними методами (формальдегід, глутаровий альдегід, фенол та ін.). При такій обробці зберігається як цілісність вірусу або бактерії, так і їх протективні антигени, що забезпечують імуногенність вакцини.

Субодиничні вакцини являють собою препарати, які містять очищені індивідуальні протективні антигени, отримані з бактеріальних екзотоксинів (дифтерійний або правцевий анатоксини), капсульних полісахаридів (НІb-вакцина), або очищені антигени, наприклад, рекомбінантний білок (НВsAg) для профілактики гепатиту В.

Основні вимоги до якості вакцин можна сформулювати як *безпеку* та *імуногенність*, яка забезпечує високі протективні властивості та захист від циркулюючих штамів протягом кількох років.

Сьогодні до переліку обов'язкових календарних щеплень входять вакцини, антигенний склад яких практично незмінний, їх застосування дозволяє контролювати інфекційні захворювання, проти яких направлені ці вакцини. Створення високоефективних вакцин є достатньо важким завданням у тих випадках, коли антигенний склад вірусів або бактерій систематично змінюється (ВІЛ, грип та низка інших).

Жодному напрямку медичної науки людство не зобов'язане порятунком більшої кількості людських життів, ніж імунобіології. Профілактика захворювань за допомогою вакцин або застосування імунопрепаратів довела свою ефективність як найбільш економічний засіб попередження ін-

фекційних хвороб. Створення вакцин проти соціально значущих інфекцій привело до значного зниження захворюваності на дифтерію, правець, кір, поліомієліт, SARS-CoV-2 та зникнення віспи.

Основним завданням досліджень в галузі імунобіології є розробка безпечних та високоефективних імунобіологічних препаратів. Весь шлях створення таких препаратів був можливий тільки при використанні основних досягнень біотехнологічної науки – отримання антисироваток, відкриття анатоксинів та можливість їх отримання, виділення культур клітин та розробка методів їх культивування, атенуація вірусів та бактерій, виділення та очищення полісахаридів, рекомбінантні технології. Кожне відкриття біотехнології та імунології – це черговий крок до створення нових вакцин, причому не тільки для профілактики інфекційних захворювань.

Вакцинопрофілактика – це стимуляція імунної відповіді під час введення вакцинних препаратів з метою створення захисного імунітету до різних інфекцій. При цьому відбувається *активація імунної системи* за наступною схемою:

- ✓ захоплення макрофагами антигенних субстанцій;
- ✓ надання макрофагами інформації про антиген Т-лімфоцитам;
- ✓ проліферація та диференціація Т-клітин з появою регуляторних хелперів та супресорів;
- ✓ перетворення активованих В-клітин на плазматичні антитілопродукуючі клітини;
- ✓ формування клітин пам'яті;
- ✓ продукція специфічних антитіл;
- ✓ зниження рівня антитіл (із часом).

Процес антитілоутворення можна умовно розділити на такі *три фази*:

Перша фаза охоплює період часу з моменту введення антигена до формування антитілопродукуючих клітин. Тривалість цієї фази становить 12–24 години. У цей період ще можна впливати на імуногенез, посилюючи чи уповільнюючи його.

Друга фаза – це власне продукція антитіл, аж до максимального рівня відповідно до сили антигена. Тривалість цієї фази буває різною – від кількох днів до 3–5 тижнів, і вплинути на неї вже не можна.

Третя фаза починається після досягнення найвищого рівня імунної відповіді, коли концентрація антитіл повільно знижується протягом декі-

лькох місяців (шигелъоз, сальмонелъоз та ін.) або багатьох років (кір, дифтерія, правець та ін.). Імунна відповідь на введення антигена завжди суворо специфічна. Один і той самий антиген викликає імунну відповідь різної інтенсивності – від слабкого або навіть нульового до дуже сильного, відповідно до генотипу, і, навпаки, один і той же організм буває різною мірою реактивним по відношенню до різних антигенів.

Є суттєві *відмінності в імунній реакції на введення живих та інактивованих вакцин*, на первинне та повторне введення антигенів, які знаходяться у вакцинах. При первинній вакцинації в неімунному організмі вакцинний штам збудника, без сумніву, потрапляє в тропний орган, в якому відбувається його репродукція з наступним виходом у вільну циркуляцію та включенням ланцюга імунних реакцій, ідентичних послідовності реакцій при природній інфекції. Саме тому реакція на введення живих вакцин особливо часто виникає після інкубаційного періоду і проявляється ослабленим комплексом симптомів природної інфекції. Імунна відповідь у цьому випадку характеризується появою в крові антитіл класу IgM із наступним переходом на синтез антитіл класу IgG. При повторному введенні антигена (ревакцинація) характеристика імунної відповіді також залежатиме від типу вакцини (жива чи інактивована). *При введенні інактивованої вакцини* виникає бустерний (від англ. – *boost* – піднімати, підштовхувати) ефект завдяки включенню клітин пам'яті. При цьому майже відразу починається продукція специфічних антитіл, та його рівень буває значно вищим, ніж при первинному введенні. Третя доза антигена зазвичай ще більше посилює процес антитілоутворення, але це закономірність не нескінченна, оскільки сила імунної відповіді генетично детермінована. Наступні додаткові дози антигена, швидше за все, не призведуть до посилення антитілоутворення, і, ймовірно, можуть викликати ефект імунодепресії.

Принципово інші механізми *включаються при введенні живої вакцини як ревакцинуючої дози*, а саме:

- якщо у дитини зберігся рівень специфічних антитіл після вакцинації, то ревакцинуюча доза буде нейтралізована антитілами, що знаходяться в крові, і не відбудеться посилення специфічного антитілоутворення;

- якщо імунітет у дитини втрачено, але збереглися клітини пам'яті, то друга доза вакцини забезпечить швидку та виражену імунну відповідь;

➤ якщо у дитини відсутній імунітет та клітини пам'яті через використання неефективної вакцини (низька якість, порушення холодового ланцюга та ін.), то введення ревакцинуючої дози вакцини викличе ланцюг послідовних імунних реакцій, які характерні першій зустрічі з цим антигеном.

2.3. Антигени та імунна відповідь. Гаптени

Антигени – речовини, які несуть ознаки генетично чужорідної інформації, при введенні в організм викликають його імунну перебудову та специфічно взаємодіють з лімфоцитами та антитілами як *in vitro*, так і *in vivo*. Імунна перебудова організму у відповідь на введення антигенів може проявлятися як накопиченням, так і специфічним послабленням або придушенням імунної відповіді. Іншими словами, антигени здатні взаємодіяти з лімфоцитами та антитілами, а при потраплянні в організм – «запустити» процеси імуногенезу (імунологічна активність антигенів) або спричинити стан імунологічної толерантності (толерогенна активність антигенів).

Якщо антиген потрапляє в організм, який має спадкову схильність до надмірної імунної відповіді (гіперчутливість), його називають *алергеном*, а специфічну зміну стану організму, що є причиною виникнення патологічного імунологічного процесу, – *алергією*.

Залежно від імунологічної активності антигени поділяють на повноцінні антигени та гаптени.

Повноцінні антигени індукують імунну відповідь організму та специфічно реагують з імунокомпетентними клітинами та антитілами.

Гаптени взаємодіють *in vitro* та *in vivo* зі специфічними антитілами та лімфоцитами і можуть викликати імунну відповідь організму лише в тих випадках, коли вони штучно чи природно кон'юговані з іншими великими молекулами, що виступають у ролі носіїв гаптенів.

Існує кілька понять, що характеризують речовину як антиген:

1. *Чужорідність* – необхідна властивість, щоб речовина виступала антигеном для даного організму. Наприклад, білок плазми людини не буде для нього антигеном, тому що даний білок не є генетично чужим для людини. Але якщо цей білок ввести кролику, для якого він чужорідний, то спостерігатиметься імунна відповідь.

2. *Антигенність, або антигенна специфічність* – здатність антигена взаємодіяти з антигенспецифічними рецепторами Т- і В-лімфоцитів та антитілами. Ця взаємодія відрізняється унікальною специфічністю, тому лімфоцити здатні розрізняти особливості будови четвертинної та нижчих структур молекул, здійснюючи розпізнавання різних антигенних детермінант, тобто хімічних груп, що визначають специфічність антигена. Специфічність взаємодії антитіл або імуноглобулінових рецепторів клітин з антигеном обумовлена їхньою високою спорідненістю (*комплементарністю*) до певних ділянок молекули антигена, які називаються детермінантними ділянками, або антигенними детермінантами. Число детермінант на молекулі антигена змінюється залежно від розміру молекули та складності її будови. Чим більше детермінант має даний антиген, тим більше молекул антитіл він може зв'язати і тим вище його *валентність*. Валентність антигена зростає пропорційно до його молекулярної маси. Так, валентність сироваткового альбуміну (М.М. = 70 кДа) дорівнює 6; дифтерійного токсину (М.М. = 70 кДа) – 8; тиреоглобуліну (М.М. = 650 кДа) – 40; гемоціаніну (М.М. = 6500 кДа) – 230.

3. *Імуногенність* – здатність антигена викликати імунну відповідь. Детермінанти, які зумовлюють антигенну специфічність молекул антигена, можуть не збігатися з ділянками, які визначають їх імуногенність. Імуногенна активність антигена залежить від його фізико-хімічних властивостей та від здатності імунізованої тварини або людини відповідати на даний антиген. *За активністю* (за інтенсивністю антитілогенезу, який викликається антигенами) *антигени можуть бути сильні і слабкі*. Сильні антигени зазвичай виконують механічну функцію, забезпечуючи певну міцність клітинних структур; слабкі антигени здебільшого є біохімічно активними компонентами. До сильних антигенів відносять більшість структурних компонентів клітини, до слабких – ферменти, нуклеїнові кислоти, пептиди тощо. Антитіла проти структурних антигенів слабо впливають на життєдіяльність патогенних мікробів. Антитіла проти ферментів пригнічують життєдіяльність мікроорганізмів.

Досить висока молекулярна маса – умова оптимальної імуногенності антигенів. Наприклад, якщо молекулярна маса речовини нижче 10 кДа, вона, як правило, є слабоімуногенною. Більшість високоімуногенних білків мають молекулярну масу близько 100 кДа та вище. Доведено, що здатність викликати утворення антитіл більшою мірою характеризуються ре-

човини, які мають на поверхні заряджені функціональні групи, ніж антигени, позбавлені заряду. Відмічається, що чим складніша будова молекули антигена, тим він більш імуногенний. Це було переконливо підтверджено щодо синтетичних поліпептидів: якщо поліпептид побудований із залишків лише однієї амінокислоти, то він, зазвичай, слабоімуногенний; якщо ж поліпептид складається з залишків двох або трьох амінокислот, то він набуває імуногенних властивостей. Наявність в антигені ароматичних амінокислот (наприклад, тирозину або триптофану) також забезпечує імуногенність молекули.

Для розуміння процесів, що відбуваються при введенні вакцин, необхідно розглянути основні етапи інфекційного процесу.

Патогенність мікроорганізмів обумовлена наявністю трьох основних властивостей:

- 1) *вірулентності* – здатності жити, розмножуватися та синтезувати токсини в організмі людини чи тварини;
- 2) *інвазивності* – здатності долати тканинні бар'єри;
- 3) *токсигенності* – активності утвореного токсину.

У загальному вигляді *виникнення інфекційного процесу* відбувається в такий спосіб:

- ✓ патогенний високовірулентний мікроорганізм, проникнувши в організм за допомогою інвазивності, адгезується до рецепторів цитоплазматичної мембрани або проникає всередину клітини організму та адгезується на ендоплазматичних мембранах або інших структурах;
- ✓ використовуючи деякі ферментні ланки та метаболіти клітин господаря, він адаптується та починає швидко розмножуватися, а також продукувати токсини;
- ✓ втручання ферментних циклів мікроорганізму в ферментні цикли господаря та дія токсичних продуктів викликає захворювання.

Антигени клітин збудника інфекції вже через 12 годин викликають утворення антитіл до сильних структурних антигенів, але захисні механізми під управлінням антитіл проти сильних структурних антигенів не уповільнюють розмноження клітин збудника захворювання, оскільки на початковому періоді інфекційного процесу вони слабкі. Це дозволяє мікроорганізму за допомогою своїх ферментів (які внаслідок слабкої антигенності на початковому етапі інфекційного процесу не викликають утворення антитіл) і використовуваних ферментних ланок клітин господаря

жити, розмножуватися і синтезувати токсин. Сильні структурні антигени, викликаючи антитілогенез на себе, конкурентно придушують антитілогенез проти ферментів мікроорганізму. Внаслідок слабкої антигенності токсинів та конкурентного придушення антитілогенезу проти них сильними антигенами, утворення антитіл проти ферментів (токсинів) мікробів відбувається значно пізніше. Після того, як повністю сформувалися механізми антитілогенезу до сильних структурних антигенів, імовірно, починають формуватися механізми синтезу антитіл проти слабких антигенів, переважно ферментів. Антиферментні антитіла пригнічують трофічні ферментні цикли збудника інфекції, позбавляють його енергії, внаслідок чого він гине. З появою в організмі антитіл проти токсинів починається звільнення хворого організму від мікроорганізмів та одужання.

У мікроорганізмів антигени або зв'язані з клітиною (*ендоантигени*), або виділяються нею у зовнішнє середовище (*екзоантигени*). Серед ендоантигенів розрізняють антигени джгутиків (Н-антигени), війок, капсульні антигени (К-антигени), антигени клітинної стінки (О-антигени), внутрішньоклітинні антигени. Серед екзоантигенів розрізняють екзотоксини, гемолізینی, фібринолізини, ферменти. Поверхневі ендоантигени (джгутиків, капсули, клітинної стінки) характеризуються більшою антигенністю, ніж внутрішньоклітинні. *Імуногенність біополімерів, отриманих з мікробних клітин після виділення та очищення, значно слабшає.*

Джгутикові Н-антигени (від нім. *hauch* – дихання) – термолабільні білкові антигени, у яких носієм антигенності є флагелін.

Капсульні К-антигени розділяють за чутливістю до температури на А-антигени (найбільш термостабільні), В-антигени (менш термостабільні) і L-антигени (термолабільні). Вони у більшості випадків складаються з кислих полісахаридів.

Антигени клітинної стінки – це передусім О-антиген (від нім. *ohne hauch* – без дихання), який локалізується в клітинній стінці грамнегативних бактерій. О-антиген є комплексом ліпідів (в основному фосфоліпідів), білків і вуглеводів, що визначається як *ендотоксин*. Відповідно до існуючих уявлень, білок відповідає за імуногенність О-антигена, ліпід – за гострі неспецифічні токсичні ефекти, а полісахарид визначає антигенну специфічність.

Внутрішньоклітинні антигени – це антигени цитоплазматичних мембран, цитоплазми, мітохондрій, рибосом ядра та ін., які визначають

органоїдну специфічність. Ці антигени представлені білками та нуклеїновими кислотами.

Бактеріальні білкові токсини – група антигенів, яка належить до екзотоксинів. Значна частина токсинів – це ферменти, що мають протеолітичну, ліполітичну або коагулюючу активність.

Протективні антигени – це група імунологічно активних компонентів патогенних мікроорганізмів, яка включає антигени різної хімічної структури. Їх об'єднує здатність викликати продукцію захисних антитіл, що оберігають макроорганізм від розвитку патологічного процесу. До складу протективних антигенів належать представники всіх груп антигенів. Усі вакцини, які використовуються в даний час, містять у своєму складі протективні антигени.

Антигени вірусів. Антигенний склад вірусів є складним і залежить від структури вірусів. Віруси зазвичай є сильними імуногенами. Носіями їх антигенності найчастіше виступають білки та комплекси білків з вуглеводами, ліпідами та нуклеїновими кислотами. У вірусів розрізняють *поверхні антигени* (антигени, що мають першорядне значення для формування активного імунітету) та *внутрішні антигени* (антигени, які відіграють важливу роль у патогенезі інфекції; вони є чужорідними, алергенними та нерідко токсигенними речовинами). Обидві групи є *вірусоспецифічними антигенами*. Наприклад, для вірусу грипу це глікопротеїн гемагглютинін та фермент нейрамінідаза. Крім вірусоспецифічних антигенів, у вірусів формуються антигени клітини-господаря – *клітиноспецифічні антигени* віріону. Вони утворюються під час дозрівання та «відшнурування» вірусу з ядра та клітинної мембрани. Здатність вірусу включати в структуру своїх зовнішніх оболонок антигенні компоненти клітин, в яких вони репродукуються, є особливістю вірусів, що відрізняє їх від бактерій і всіх інших живих організмів.

Антигени поділяються на Т-залежні та Т-незалежні. Антигени, яким для початку утворення антитіл В-клітинами потрібна участь Т-лімфоцитів, називають *Т-залежними*. Антигени, які можуть викликати утворення антитіл В-клітинами без допомоги Т-лімфоцитів, називають *Т-незалежними антигенами*. До Т-незалежних антигенів належать високополімерні білки (флагелін, феритин), полісахариди, декстрини, синтетичні полімери тощо. Для Т-незалежних антигенів характерне багаторазове повторення однорідних детермінант на молекулі антигена, яка зазвичай має форму довгого,

іноді розгалуженого ланцюжка. Т-незалежні антигени легко індують антитілоутворення, проте антитіла до них мають відносно низький афінітет. До Т-незалежних антигенів належать і бактеріальні полісахаридні антигени. Цукри визначають імунологічну специфічність антигенів. Полісахариди, які знаходяться на поверхні грамнегативних бактерій, складаються з повторюваних олігосахаридних ланцюжків, які характерні для окремих видів бактеріальних антигенів і визначають їх специфічність. До Т-залежних антигенів відносяться білки та поліпептиди (альбуміни, глобуліни, бактеріальні білки тощо). Як правило, бактеріальна клітина містить Т-залежні та Т-незалежні антигени, а вірус – тільки Т-залежні антигени.

Головний комплекс гістосумісності. Антиінфекційний імунітет знаходиться під контролем генів, розташованих як у головному комплексі гістосумісності (англ. – *major histocompatibility complex*, МНС), так і поза ним.

Обговорюючи процеси імунної відповіді, необхідно зупинитися на вкрай важливому питанні – системі людських лейкоцитарних антигенів (англ. – *human leukocyte antigen*, HLA) і головному комплексі гістосумісності (МНС) людини, які є важливою частиною імунної системи, контрольованої генами, що локалізуються в 6-тій хромосомі. Ця хромосома кодує молекули клітинної поверхні та спеціалізується на презентації пептидів Т-клітинним рецепторам (англ. – *T-cell receptor*, TCR) на поверхні Т-клітин. Головний комплекс гістосумісності (МНС) є ділянкою, у якій густина локалізації генів є з однією з найвищих. У людини один ген сягає близько 18 000 пар нуклеотидів. У людини область МНС історично називається людський лейкоцитарний антиген (англ. – *human leukocyte antigen*, HLA), оскільки вона була відкрита під час вивчення відмінностей між білими клітинами крові у різних людей. Найбільш вивченою областю МНС є HLA, що знаходиться на короткому плечі 6-тої хромосоми між генетичними маркерами MOG і COL11A2 і включає близько 4 млн пар нуклеотидів. HLA містить понад 200 генів, багато з яких є надзвичайно поліморфними. Не всі ці гени пов'язані з імунітетом, у людини лише 40 % генів HLA кодують білки, залучені до імунної відповіді. І навпаки, є багато білків імунної системи, гени яких розташовані в інших хромосомах, наприклад, гени TCR знаходяться у 14-тій хромосомі, гени інтерферонів – у 9-тій і 12-тій хромосомах тощо.

Антиген-презентуючі молекули МНС поділяють на три основних класи: молекули МНС класу I, молекули МНС класу II, ділянка МНС класу III.

Молекули МНС класів I та II є основними учасниками клітинного імунітету. Основною функцією МНС-I та МНС-II молекул є зв'язування пептидних фрагментів, отриманих при внутрішньоклітинному розщепленні білкових молекул та презентація цих пептидів на поверхні клітин для розпізнавання TCR і NK-клітинними рецепторами (англ. – *nature killer cells*, природні кілери). Здебільшого це пептиди власних білків, якщо ж в організм потрапив патоген, то на поверхні клітин будуть присутні також і пептиди з чужих білків. Незважаючи на те, що частка чужих пептидів на клітинній поверхні дуже мала (одна молекула на десятки та сотні тисяч своїх пептидів), такі заражені клітини швидко розпізнаються Т-лімфоцитами та руйнуються імунною системою. Презентація власних білків на поверхні клітин надзвичайно важлива, імунна система постійно відстежує та знищує не лише інфіковані, а й пошкоджені чи змінені клітини.

МНС-I кодує мембрано-зв'язаний глікопротеїн, експресія якого викликається стресом: температурою, вірусною або бактеріальною інфекцією, онкогенною трансформацією тощо. МНС-I є сигналом імунної системи на ранню реакцію у відповідь на інфекцію або спонтанне виникнення модифікованих ракових клітин. На відміну від комплексів МНС-I, білки МНС-II експресуються виключно в так званих антиген-презентуючих клітинах (англ. – *antigen presenting cells*, APC): дендритні клітини, В-клітини та макрофаги. Пептиди комплексу МНС-II отримуються завдяки лізосомальному, а не протеосомному розщепленню. Локус HLA містить також гени трьох цитокінів родини фактора некрозу пухлини, TNF, гени білків системи комплементу (C2, C4a, C4b, CFB) та багато інших генів.

Молекули МНС-I у вигляді трансмембранних глікопротеїнів містяться на поверхні всіх ядровмісних клітин. Молекула МНС-I складається з важкого ланцюга альфа (М.М. = 44 кДа), що несе антигенну специфічність і нековалентно зв'язаний з молекулою бета-2-мікроглобуліну – легкий ланцюг (М.М. = 11,5 кДа). Важкий ланцюг складається з двох зв'язаних пептидних доменів, імуноглобулін-подібної ділянки та трансмембранного сегмента з цитоплазматичним хвостом. Кожен ланцюг контролюється окремим геном. Важкий ланцюг молекули МНС-I кодується

локусами HLA-A, HLA-B або HLA-C. Т-лімфоцити, які реагують на молекули МНС-I, експресують молекули CD8. Ці лімфоцити часто виконують цитотоксичну функцію, для чого їм потрібна здатність розпізнавати будь-які інфіковані клітини. Оскільки будь-яка ядровмісна клітина експресує молекули МНС-I, всі інфіковані клітини є антиген-презентуючими для CD8⁺ Т-лімфоцитів (CD8 зв'язується з неполіморфною ділянкою важкого ланцюга МНС-I). Деякі гени МНС-I кодують неklasичні МНС-молекули, наприклад, HLA-G (які можуть відігравати роль захисту плоду від імунної відповіді матері) і HLA-E (які являють собою пептиди до деяких рецепторів ЕКК).

Молекули МНС-II зазвичай представлені тільки на «професійних» антиген-презентуючих клітинах (В-лімфоцитах, макрофагах, дендритних клітинах, клітинах острівців Лангерганса), епітеліальних клітинах тимусу і активованих (але не тих, що знаходяться у стані спокою) Т-лімфоцитах. Ці клітини виконують функції допоміжних клітин, що у процесингу і презентації антигена. Більшість ядровмісних клітин можна стимулювати до експресії молекул МНС-II інтерфероном-гамма. Молекули МНС-II (М.М. = 60–65 кДа) складаються з 2-х нековалентно-зв'язаних поліпептидних ланцюгів (α (М.М. = 29 кДа) та β (М.М. = 34 кДа)), у кожному ланцюгу є пептид-зв'язуюча ділянка, імуноглобулін-подібна ділянка і трансмембранний сегмент з цитоплазматичним хвостом. Антигени II класу є продуктами експресії тісно зчеплених генів, що позначаються як зона HLA-D 6-тої хромосоми. Т-лімфоцити, які реагують на молекули МНС-II, експресують CD4⁺ і часто є Т-хелперами.

Кількість специфічностей, які серологічно виявляються, досить велика, і система HLA є найбільш поліморфною з усіх відомих генетичних систем людини. Молекули МНС класів I і II є найбільш імуногенними антигенами і розпізнаються в процесі *відторгнення алогенного транспланта*.

Регіон МНС класу III в геномі кодує молекули, які відіграють значущу роль при запаленні, а саме: компоненти комплементу C2, C4 та фактор В, фактор некрозу пухлин (ФНП)-альфа, лімфотоксин,; три білки теплового шоку.

Існує *дві системи генетичного контролю імунологічної стійкості організму до інфекцій*:

- ✓ контроль неспецифічної резистентності організму до інфекцій – ця резистентність залежить від функціонального стану макрофагів та контролюється генами, не пов'язаними з МНС;
- ✓ контроль розвитку набутого імунітету за рахунок генів МНС.

Генетичний контроль набутого імунітету здійснюється Іг-генами (англ. – *immune response*), що забезпечують силу імунної відповіді, регулюють клітинну взаємодію, кодують первинну структуру імуноглобулінів та рецепторів лімфоцитів. Імунологічна здатність до адекватної відповіді на введення в організм антигенів вакцини не пов'язана з особливостями самого антигена, а генетично контролюється у кожної людини Іг-генами МНС. Імуноглобуліни кодуються трьома не зчепленими групами структурних генів. До складу кожної групи генів входять набори генів, що кодують варіабельну та константну області імуноглобулінів. У генетичних особливостях окремих груп людей криється причина неоднорідності імунної відповіді, поява слабких та сильних реакцій на інфекцію та вакцинацію. Іг-гени – домінантні гени, вони контролюють: тимузалежне антитілоутворення, розвиток підвищеної чутливості уповільненого типу, Т-хелпери, рестрикування по МНС, проліферуючі Т-клітини та ефекторні Т-клітини. Продуктами Іг-генів є антигени класів I та II. Обидва класи антигенів беруть участь практично у всіх імунологічних реакціях. При вірусних інфекціях антигени МНС-I відіграють провідну роль у формуванні антигенспецифічних цитотоксичних лімфоцитів. В інших проявах антиінфекційного імунітету як продукти Іг-генів виступають антигени класу II, які ще навивають Ia (англ. – *I region associated*) антигенами.

Основними причинами слабкої імунної реакції на антиген є відсутність відповідного антигена гістосумісності, здатного давати комплекс з пептидом антигена та/або відсутність клону Т-лімфоцитів, здатного розпізнавати такий комплекс.

Таким чином, МНС беруть безпосередню участь в ініціації імунної відповіді, контролюючи молекули, що представляють антиген в імуногенній формі для його розпізнавання цитотоксичними Т-клітинами і Т-хелперами. Під контролем МНС проходять такі імунні процеси, як регуляція сили гуморальної (В-клітинної) та клітинної (Т-клітинної) імунної відповіді, забезпечення імуногенності прониклого або введеного в організм антигена, а також селекція специфічних Т-клітин у тимусі.

Таблиця 2.1 – Стадії розвитку імунної відповіді

Стадії імунної відповіді	Клітини, залучені до цієї стадії	Імунологічні процеси, які відбуваються на стадії
Процесинг і презентація антигена	Макрофаги	Сутність процесингу полягає у ферментативній переробці антигена, пептидні детермінанти якого стають доступними для розпізнавання Т-клітинами. Відбувається відновлення дисульфідних зв'язків, що дозволяє розгорнути білкову молекулу антигена. Ця стадія складається із трьох етапів: ендоцитоз антигена (фагоцитоз, піноцитоз); його розщеплення (процесинг) та подання (презентація) антигена Т-клітин. Нативний антиген взаємодіє із поверхнею допоміжної клітини за рахунок рецепторів неспецифічного зв'язування з мембраною клітини. Фагоцитарні і піноцитарні бульбашки, що утворюються, занурюються всередину клітини і зливаються з лізосомами. Завдяки кислому середовищу та наявності протеаз відбувається переробка антигена – розщеплення білкових молекул антигена на дрібні фрагменти (пептиди) чи окремі амінокислоти. Пептидні фрагменти взаємодіють з МРН-II антигенами, які утворюються у тій самій клітині. Комплекс МРН-II із фрагментом антигена за допомогою екзоцитозу транспортується на поверхню клітини, де розпізнаються Т-хелперами. Комплекс пептиду з антигенами МНС-II отримав назву суперантигена. Антигенність такого комплексу набагато вище в порівнянні з активністю пептиду і нативного антигена, який не піддався процесингу.
Проліферативна стадія	Дендритні клітини, клітини Лан	Стадія характеризується проліферацією, диференціюванням імунорегуляторних

Закінчення табл. 2.1

Стадії імунної відповіді	Клітини, залучені до цієї стадії	Імунологічні процеси, які відбуваються на стадії
	герганса, антигенреактивні лімфоцити, Т-хелпери, Т-супресори, В-супресори, ампліфаєри, контрсупресори	клітин та дією імунорегуляторних медіаторів клітинної взаємодії (цитокінів)
Ефекторна стадія	Т-кіллери, Т-ефектори, клітини ефектори підвищеної чутливості уповільненого типу, плазматичні клітини	Стадія полягає в активації ефекторних клітин, в результаті чого відбувається виділення неспецифічних ефекторних медіаторів, розвиток клітинних реакцій та утворення циркулюючих антитіл
Імунологічна пам'ять	Т-кіллери, Т-ефектори, клітини ефектори підвищеної чутливості уповільненого типу, плазматичні клітини, Т- і В-клітини пам'яті	Завдяки імунологічній пам'яті організм набуває здатності швидко реагувати на повторний контакт із антигеном. Вона характерна для клітинного та гуморального імунітету, залежить від формування дочірніх Т-клітин та, ймовірно, В-клітин. Малі лімфоцити під впливом антигена перетворюються на бласти, проходять серію мітозів і знову перетворюються на малі лімфоцити або на клітини пам'яті. Імунологічна пам'ять, особливо пам'ять Т-лімфоцитів, дуже стійка і може зберігатися багато років. При деяких інфекціях антитіла у крові зберігаються протягом десятиліть. Період напіврозпаду найстійкішого імуноглобуліну становить у середньому 25 днів. Таким чином, в організмі постійно відбувається ресинтез специфічних імуноглобулінів

Гаптени. У 1923 році К. Лайнштейнер запровадив поняття «гаптен», яке означає низькомолекулярні речовини, які не мають антигенності і набувають її при збільшенні молекулярної маси, що можливо при приєднанні до гаптenu, наприклад, білків. Гаптени – високо специфічні молекули. Вони не можуть приводити до вироблення антитіл і водночас специфічно зв'язуються з антитілами. Імуногенність властива гаптенам тільки після їх з'єднання з білками. За специфічність антигена відповідає гаптенна частина, а за імуногенність – білок-носій. Встановлено, що функція носія полягає у стимуляції Т-хелперів, які допомагають В-клітинам реагувати на гаптен. На практиці невеликі хімічні сполуки (гаптени) зазвичай не є хорошими імуногенами, однак при приєднанні до макромолекул (носіям) вони можуть набквати імуногенності. Імуноген повинен мати епітопи, які можуть розпізнаватись антиген-презентуючими клітинами та Т-клітинним рецептором, а також він повинен бути здатним до деградації. Гаптени та відповідні кон'югати «гаптен-носій» були необхідні для розробки чутливих кількісних та якісних імуноаналізів.

При конструюванні гаптенових кон'югатів необхідно враховувати такі фактори: сам гаптен, носій, стратегію зв'язування та щільність гаптenu (оскільки кількість гаптenu, приєданого до носія, впливає на силу імунної відповіді, спрямованої на новостворену антигенну детермінанту). Гаптенна щільність кон'югату також важлива для розробки імунологічних аналізів. Оптимальна щільність епітопу кон'югату для індукції сильної імунної відповіді або забезпечення найкращого імунологічного аналізу залежить від структури епітопу та характеру імунологічного аналізу. Як приклад наведемо участь гаптенів у алергічних реакціях на шкірі. Більшість контактних алергенів є хімічними речовинами з низькою молекулярною масою (< 500 Да, тобто є гаптенами), які здатні проникати через бар'єр рогового шару шкіри. Порушення бар'єрної функції шкіри, що часто зустрічається при запаленні шкіри і, зокрема, при atopічному дерматиті, може збільшити проникнення та, як наслідок, ризик сенсibilізації. Гаптени не є імуногенними самі по собі, але можуть ефективно розпізнаватись імунною системою при зв'язуванні з неспецифічним білком шкіри – носієм. При зв'язуванні гаптенів з білками шкіри (гаптенізація білків) утворюється або міцний ковалентний, або більш слабкий нековалентний зв'язок. Такий комплекс і викликає алергічний дерматит. Імунні комплекси, які містять антитіла, руйнують окремі клітини, що сприяє виведенню

до сусідніх клітин серотоніну, гістаміну та інших речовин. В результаті формується уповільнена гіперчутливість, при якій з антигеном реагують сенсibilізовані лімфоцити. Найчастіше алергічний дерматит є реакцією на повторну взаємодію з алергеном.

Часто зустрічаються гаптени, які є синтетичними сполуками, такі як консерванти або лікарські засоби. Багато лікарських препаратів відіграють роль гаптенів, які ковалентно зв'язуються із сироватковими або клітинними білками, включаючи білки, що входять до складу головного комплексу гістосумісності. Такий комплекс «білок-лікарський препарат» призводить до стимуляції продукції антитіл проти лікарського препарату та/або Т-клітинній відповіді проти лікарського препарату.

Питанням отримання композицій, що містять кон'югат гаптена з носієм, присвячено значну кількість досліджень. Запропоновано кон'югати «гаптен-носій» для індукції імунної відповіді на лікарський препарат, що викликає звикання або зловживання. Як гаптен використовувалися алкалоїди: героїн, морфін або нікотин. Такі продукти можуть використовуватися для індукції імунної відповіді проти гаптенів у профілактичних та діагностичних цілях. В результаті запропоновано створення композицій вакцин проти алкалоїдів, що дозволяє швидко знизити доступність гаптенів, наприклад, нікотину. Виникнення імунної відповіді може блокувати дію лікарського засобу шляхом запобігання його проникненню в ЦНС. Зменшуючи ейфорію пов'язану із застосуванням наркотичних препаратів, людина з залежністю до наркотику, більше не має мотиву для його вживання.

Особливий інтерес становлять дослідження, присвячені вивченню антитіл до токсичних алкалоїдів. Ліки рослинного походження давно використовуються у профілактиці та лікуванні захворювань людини, тепер і у профілактиці та боротьбі з COVID-19. Токсичні алкалоїди є одним з важливих інгредієнтів лікарських засобів рослинного походження, тому існує велика потреба у розробці недорогих та надійних методів аналізу для ефективного моніторингу токсичних алкалоїдів для забезпечення безпечного та раціонального використання лікарських засобів рослинного походження. Таким чином, антитіла до рослинних токсичних алкалоїдів дозволяють проводити діагностику та моніторинг цих сполук, наприклад, методом ІФА. Імунологічні аналізи мають суттєві переваги: вони швидкі, від-

носно недорогі та досить надійні для вимірювань у польових умовах, без дорогого спеціального обладнання для аналізу та обслуговування.

Як білки-носії для гаптенів використовують бичачий і людський сироваткові альбуміни тощо.

Технології отримання антитіл до гаптенів пройшли три покоління: отримання поліклональних антитіл, отримання моноклональних антитіл і низькомолекулярних фрагментів антитіл; отримання антитіл генноінженерними методами.

2.4. Ад'юванти

Основним завданням при отриманні антигенів, що використовуються у складі вакцин, є досягнення їх високого ступеня очищення від баластних домішок різної природи: білкових, ліпідних, ліпопротеїдних, полісахаридних та ін. Добре відомо, що дані сполуки здатні посилювати імуногенність речовин, що вводяться. Водночас їхня присутність небажана через посилення ними побічної дії вакцин. Саме цей факт змушує використовувати для конструювання вакцин імуностимулятори, що отримали назву «ад'юванти».

Термін «ад'ювант» походить від латинського слова *adjuvare*, що означає допомагати. Історія ад'ювантів почалася в 1920 році, коли французький вчений Г. Рамон виявив, що включення солей алюмінію до вакцин підвищує їх потенціал. Самі ад'юванти переважно імуногенності не мають.

До застосування ад'ювантів у вакцинології висуваються досить жорсткі вимоги:

- 1) ад'юванти повинні бути вільними від сторонніх домішок та не викликати побічних імунних реакцій;
- 2) ад'юванти не повинні бути онкогенами або алергенами та не повинні викликати появу відповідних сполук в організмі;
- 3) ад'юванти не повинні містити антигени, подібні до антигенів господаря (поява таких антигенів може призвести до аутоімунних реакцій);
- 4) після виконання своїх функцій ад'юванти повинні досить легко метаболізуватися.

Більшість дослідників вважають, що ад'юванти спричиняють комбіновану дію як на антиген, змінюючи його фізико-хімічні властивості і посилюючи імуногенність, так і безпосередньо на організм, викликаючи ряд неспецифічних реакцій, які або самі виконують захисні функції (запалення, плазмоцитарна функція), або на основі яких запускається процес імуногенезу, але вже під впливом присутності в організмі специфічного чужорідного агента. Вплив ад'ювантів на властивості антигена стосується зміни його структури, молекулярної маси, полімерності, розчинності та інших фізико-хімічних властивостей.

Сьогодні відома значна кількість *ад'ювантів, що відрізняються походженням (природні та синтетичні) та фізико-хімічними властивостями:*

- 1) мінеральні ад'юванти;
- 2) рослинні ад'юванти (наприклад, сапоніни). Ад'ювант QS21 виділений з південно-американського дерева *Quillaja Saponaria*. Імуностимулюючий комплекс ISCOM являє собою ад'ювантну фракцію *Quillaja Saponaria*, включену в частинки, що складаються з холестерину, фосфоліпідів і антигенів клітинних мембран. ISCOM вводили до складу вакцин проти вірусу грипу, вірусу папіломи людини, ВІЛ, збудника малярії, низки пухлин та ін.;
- 3) масляні ад'юванти (ад'ювант Фрейнда, мінеральні олії, тваринні та рослинні олії);
- 4) ад'юванти у формі емульсії (масло у воді);
- 5) цитокіни (наприклад, інтерлейкіни IL-1 α та IL-1 β) та пептиди;
- 6) мікробні ад'юванти (корпускулярні та субодиничні структури, білки, нуклеїнові кислоти, ліпіди, вуглеводи, ліпополісахарид-білкові комплекси);
- 7) синтетичні речовини (полінуклеотиди, пептиди);
- 8) складні штучні ад'ювантні системи (ліпосоми, мікрокапсули).
- 9) білки теплового шоку, які мають здатність доставляти антиген антигенпрезентуючим клітинам.

Ад'юванти потрібні при виробництві високоочищених вакцин на основі бактеріальних лізатів, анатоксинів, рекомбінантних, синтетичних та вірусних вакцин. Вибір ад'юванту при створенні вакцини залежить передусім від властивостей антигена: розміру молекули, її заряду і молекулярної маси, хімічної структури, ступеня розчинності тощо. Внаслідок взає-

модії ад'ювант не повинен змінювати специфічність антигенних властивостей вакцини та власне структуру антигена.

При всьому різноманітті відомих сьогодні ад'ювантів, *найбільш цікавими для нас є ад'юванти, які використовуються у складі комерційних вакцинних препаратів.* Тому ми зупинимося на кількох групах ад'ювантів, які найчастіше використовуються у складі вакцин.

Мінеральні ад'юванти. Як мінеральні ад'юванти найчастіше використовують гідроксид алюмінію, фосфат алюмінію, фосфат кальцію, хлористий кальцій. Мінеральні ад'юванти стимулюють переважно гуморальний імунітет, діючи на допоміжні клітини та лімфоцити. Імуногенність сорбованих препаратів підвищується у сотні разів. Ефективність сорбованих вакцин залежить від ступеня сорбції, співвідношення антигену та адсорбенту в процесі сорбції, іонної сили, рН, температури та часу сорбції.

При виробництві сорбованих препаратів сорбент додають на завершальних стадіях виготовлення вакцин у кількості, яка забезпечує максимальну сорбцію необхідної дози антигена. Найбільш повна сорбція антигена на гідроксиді алюмінію відбувається при значенні рН 6,7–7,3, на фосфаті алюмінію – рН 5,0–5,5. Встановлено, що білки вірусу грипу, адсорбовані на похідних алюмінію, викликають утворення значно вищих титрів антитіл проти вірусу грипу при значно меншій реактогенності порівняно з несорбованими вірусними препаратами. Ад'юванти на основі солей алюмінію створюють умови для депонування препарату, що призводить до уповільнення його всмоктування.

При роботі з цим видом ад'ювантів необхідно враховувати і негативні сторони їх використання: старіння гелю, розшарування при зберіганні, недостатню дисперсність та десорбцію антигена з ад'юванту при заморожуванні та відтаюванні препаратів.

Ад'юванти у формі емульсії «масло у воді». До цього виду ад'ювантів належать ад'юванти MF59 та AS03.

MF59 – безпечна та ефективна емульсія скваленового масла у воді. Ад'ювант представлений високоочищеною олією і легко метаболізується. MF59 ліцензований фірмою *Fluad* (Австралія) та використовується у тривалентній вакцині проти грипу, яка успішно застосовується для створення імунітету до грипу. MF59 викликає гуморальну та клітинну відповідь у немовлят та літніх людей. Цей ад'ювант викликає в 100 разів сильніший ефект, ніж використання ад'ювантна з алюмінієм. Встановлено, що MF59

не викликає депонування антигенів. Показана здатність MF59 викликати високий титр при синтезі IgG та клітинно-опосередковану імунну відповідь. MF59 сприяє експресії моноцитів, макрофагів та дендритних клітин та секреції хемокинів, які залучають більшу кількість лейкоцитів для зворотного захоплення більшої кількості вакцинних антигенів.

AS03 представляє систему «масло у воді», до складу якого входять сквален, α -токоферол, полісорбат-80. Ад'ювант AS03 був використаний при розробці вакцин проти малярії та грипу.

Віросомальні ад'юванти. Віросоми являють собою невеликі сферичні одношарові везикули з ліпідною мембраною діаметром близько 150 нм. Віросоми переносять білки вірусної оболонки, такі як нейрамінідаза та гемаглютинін вірусу грипу. Ці білки забезпечують зв'язування мембрани віросом з рецепторами клітинами, опосередковуючи рН-залежне злиття з імунними клітинами. Таким чином, віросоми транспортують свій вміст, а саме вакцинні антигени, безпосередньо до клітин-мішеней, викликаючи антиген-специфічну імунну відповідь. Віросоми є вірусоподібними частинками, які дозволяють презентувати вакцинні антигени МНС класу I та II, щоб викликати як В-клітинну, так і Т-клітинну імунну відповідь.

Синтетичні полііони. Розроблено нові синтетичні полііони із контрольованою структурою. Такі ад'юванти індукують Т-незалежну відповідь та дозволяють обійти генетичний контроль імунної відповіді. Така фенотипічна корекція забезпечує високий рівень відповіді навіть у пацієнтів із низькою реакцією на антиген. Протигрипозна вакцина «Гриппол» містить у своєму складі поліоксидоній, який є N-похідним поліетиленпіперозину з високою молекулярною масою. Проходять випробування ще дві вакцини з цим ад'ювантом: проти сальмонельозу та чуми. Авторами поліоксидонію проведено вивчення імуномодуючого впливу ад'юванту на імуногенність вакцини проти гепатиту А – *HEP-A-in-VAC*), В роботі були використані комерційна форма зазначеного препарату, адсорбована на гідроокисі алюмінію, та експериментальні серії вакцини, в які замість гідроксиду алюмінію було додано поліоксидоній. Оцінку імуногенності проводили за двома показниками: відсотком сероконверсії та титром антитіл.

Цікавий ад'ювант IC31 з контрольованою структурою, розроблений австрійською фірмою *Intercell*. Він набув застосування при випробуваннях протитуберкульозних вакцин. До складу ад'юванту входить короткий ка-

тійонний пептид KLK та олігодеоксинуклеотид ODN1a. Розробники встановили індукування ад'ювантом Т-незалежної відповіді.

ASO4 (агоніст TLR4, адсорбований на алюмінії). Для розробки нових ад'ювантних систем використано різні агоністи Toll-подібних рецепторів (англ. – *Toll-like receptor*, TLR) адсорбованих на алюмінії. Ад'ювантна система ASO4 схвалена для використання в складі вакцин проти вірусу папіломи людини – *Cervarix* та вірусу гепатитів В – *Fendrix*. Ця система включає адсорбент на основі алюмінію з ліпополісахаридом, який являє собою ліпід А (3-О-дезацил-4'-монофосфориліпід А), виділений із клітин *Salmonella minnesota*. Підтверджено, що ліпід А зберігає здатність стимулювати вроджений імунітет шляхом взаємодії з TLR4. Ад'ювант ASO4 запропонований і увійшов до складу ряду вакцин фірми *GlaxoSmithKline* (Бельгія).

Ад'юванти для мукозальних вакцин. Ад'юванти у складі мукозальних вакцин виконують дві основні функції: доставляють антиген та є імуностимулюючими молекулами. Наприклад, хітозан і його похідні можуть виконувати обидві функції. До цих ад'ювантів належать: термолабільний ентеротоксин (LT) *E.coli*, холерний токсин (CN) та їх мутанти CY/LT. Ці токсини стимулюють антиген-специфічну клітинну та гуморальну імунну відповідь. Важливо те, що ад'юванти стимулюють антиген-специфічні антитіла IgA та клітини довготривалої пам'яті до вакцинних антигенів при введенні через слизові оболонки. Докладніше ад'юванти для мукозальних вакцин розглянуті в розділі 3.7.

Ліпосоми. Створення штучних мембран-ліпосом є одним із перспективних напрямків сучасної нанобіотехнології. Ліпосомальні носії мають ряд безперечних переваг:

- захищають клітини організму від токсичної дії лікарських засобів;
- пролонгують дію введеного в організм лікарського засобу;
- захищають лікарські речовини від деградації;
- сприяють прояву орієнтованої специфічності за рахунок селективного проникнення з крові в тканини;
- змінюють фармакокінетику лікарських препаратів, підвищуючи їхню фармакологічну ефективність;
- дозволяють створити водорозчинну форму низки біологічно активних речовин, збільшуючи тим самим їх біодоступність.

У зв'язку з вищевикладеним стає зрозумілим інтерес, який виник у останнє десятиліття до ліпосом як до перспективних ад'ювантних компонентів. Одна з основних вимог до ад'ювантів – їхня здатність розщеплюватись та виводитися з організму. Ліпосоми повною мірою відповідають цим вимогам, оскільки вони складаються з природних або (рідше) синтетичних фосфоліпідів (фосфатидилхоліну, фосфатидилінозиту, фосфатидилсерину та ін.) з певною кількістю природного холестерину, а отже, легко біодеградують і не шкодять організму. Крім того, методи очищення ліпідів дозволяють отримувати високоочищені компоненти, в яких кількість домішок не перевищує 5–10 %, причому ці домішки також є фосфоліпідної природи. Субстанції для ліпосом апірогенні та нетоксичні. Важливим є можливість отримання вакцин з ліпосомальними ад'ювантами, які можуть легко піддаватися стерилізуючій фільтрації, на відміну від мінеральних сорбентів. Це дозволяє проводити стерилізуючу фільтрацію на кожному етапі отримання вакцинних препаратів, що може дозволити в деяких випадках відмовитися від консервантів. Ліпосоми знижують токсичність вбудованих антигенів і мають хорошу біосумісність.

Якщо введені у водному розчині антигени призводять до негативної або дуже слабкої імунної відповіді, то їх інкапсулювання у ліпосоми дозволяє отримати високі титри специфічних антитіл. Наприклад, при підшкірній ін'єкції морським свинкам поверхневого антигена вірусу гепатиту В (HBsAg) отримані високі титри антитіл, що захищають тварин від інфікування вірусом гепатиту В. Показано, що HBsAg, включений в ліпосоми, які складаються з яєчного фосфатидилхоліну, холестерину та додецилфосфату у співвідношенні 7:2:1, призводить до утворення титрів антитіл у 750 разів більших, ніж після імунізації вільним розчином антигена.

Особливий інтерес викликають дані щодо імуногенності ліпосомальної вакцини з антигенними пептидами, виділеними з глікопротеїну вірусу лімфоцитарного хоріомеїнігіту. Інкапсульовані в ліпосоми пептиди мали високу імуногенність при внутрішньошкірному введенні і викликали захисний протівірусний імунітет. Після внутрішньошкірної ін'єкції ліпосоми утворювали депо антигена, яке полегшувало тривале завантаження антигена дендритними клітинами практично лише до місцевих лімфовузлів. Імуногенність ліпосомальної пептидної вакцини ще більше підвищувалася при введенні в ліпосоми імуностимулюючих олігонуклеотидів, що також призводило до значного активування дендритних клітин. Запропо-

нована ліпосомальна пептидна вакцина викликала захисний протипухлинний імунітет. Враховуючи, що реакції протипухлинних і противірусних Т-клітин викликаються переважно дендритними клітинами, які транспортують антиген з периферії в організовані лімфоїдні тканини, можна припустити, що активувація дендритів ліпосомальними пептидними вакцинами свідчить про їх високу імуноактивність.

З метою вивчення можливості застосування ліпосомальних вакцин для пероральної імунізації готували ліпосоми з фосфатидилхоліну, які містять бичачий сироватковий альбумін як антиген. Ліпосоми були покриті полісахаридом, виділеним із дріжджоподібного гриба. Він був представлений у природній та модифікованій у пальмітинове похідне формі. Імуностимулюючу дію вивчали шляхом визначення вмісту імуноглобулінів А та G у сироватці тварин після перорального введення отриманих ліпосом. Використання ліпосомального препарату приводило до вищих титрів антиальбумінових імуноглобулінів у порівнянні з вільним альбуміном, причому модифікований полісахарид приводив до значно вищих титрів, ніж при імунізації природною сполукою. Отримані результати дають підставу припустити, що ліпосоми, покриті хімічно модифікованим полісахаридом, можуть бути використані як потенційні ад'юванти для ефективної пероральної імунізації.

Існуючі вакцини проти грипу, які мають практичне застосування, є переважно вакцинами з інактивованого вірусу. Існує три види вакцин: вакцини із цілісного вірусу, вакцини із фрагментованого вірусу та вакцини на основі окремих антигенних фрагментів вірусу грипу, наприклад, гемаглютиніну та нейрамінідази. Для підвищення імуногенної активності використовують ад'юванти ліпосомальної природи. Вивчення нешкідливості та імуногенності комерційних протигрипозних вакцин проводили на двох групах хворих. Першій групі вводили вакцину, що містить гемаглютинін, а другій групі – вакцину, отриману шляхом введення гемаглютиніну в мембрану ліпосом, що складаються з природного фосфатидилхоліну. Для дослідження використовували тривалентну вакцину. Обидві вакцини викликали однакове достовірне підвищення середнього титру протигемаглютинінових антитіл. Однак достовірно більша кількість осіб, імунізованих ліпосомальною вакциною, демонстрували більш ніж чотириразове підвищення титру проти вірусу грипу штамів «Сінгапур» та «Пекін» порівняно з комерційною вакциною. Відсоток хворих, у яких титр при імуні-

зації ліпосомальною вакциною досягав захисної величини, був також значно вищим. Особливе клінічне значення мав той факт, що у 68,4 % осіб, імунізованих ліпосомальною вакциною, досягався захисний рівень антитіл проти всіх трьох компонентів вакцини, на відміну від 38 % при вакцинації звичайною вакциною.

Сьогодні проводиться вивчення інтраназального застосування протигрипозної вакцини *Invivac* замість загальноприйнятого внутрішньом'язового або підшкірного.

Ключовими аспектами, які впливають на розробку нових ефективних ад'ювантів та вакцин, призначених для людини, є безпечність, високий рівень чистоти та фізико-хімічні характеристики залишкового складу ад'ювантів. Ліпосоми як ад'юванти показали себе безпечними в клінічних умовах у складі вакцин на основі для вірусних та бактеріальних антигенів. В клінічних умовах були підтверджені тести контролю якості, що встановили високий рівень очищення, безпеки та стабільності ліпосомальних вакцин. Ліпосоми можна розглядати як основні кандидати для покращення імуногенності антигенів з гідрофобними ділянками, а також розчинних немембранних протеїнів. Розташування антигена (абсорбований на поверхні або приєднаний до ліпосомальної поверхні за допомогою ковалентних зв'язків, або інкапсульований у внутрішній об'єм ліпосоми) має важливе значення і значною мірою визначає імунобіологічні властивості вакцин.

Таким чином, накопичені дані свідчать про високу ад'ювантну дію віросом/ліпосом. Негативно заряджені ліпосоми стимулюють вищі показники титрів антитіл, ніж позитивно заряджені. На інтенсивність імунної відповіді впливає спосіб введення препаратів. Найвищі титри антитіл виявляються при підшкірному введенні ліпосомальних вакцин. На відміну від інших ад'ювантів, на місці ін'єкції не відбувалося утворення гранульом. Ще одна перевага застосування ліпосом як імунологічних ад'ювантів полягає в тому, що у випадку інкапсульованого всередину ліпосоми антигена можна значною мірою уникнути реакцій гіперчутливості.

Ліпосомальні ад'юванти знайшли широке застосування при вакцинації людини та тварин. В даний час ведуться розробки ліпосомальних вакцин проти грипу, дифтерії, правця, гепатитів А і В, кишкових інфекцій та ряду інших (див. розділ 5.4).

Запитання для самоконтролю

1. Дайте класифікацію вакцинним препаратам.
2. Які основні підходи до атенуації вакцинних штамів існують?
3. Опишіть основні стадії процесу антитілоутворення.
4. Чому гаптени не є повноцінними антигенами?
5. Чим обумовлена патогенність мікроорганізмів?
6. Яку роль в розвитку імунної відповіді відіграє основний комплекс гістосумісності?
7. Які вимоги висувають до ад'ювантів у вакцинології?

Список джерел інформації до розділу 2

1. Бабич Є. М. Динаміка формування гуморального імунітету при пероральному введенні ліпосомальних і модифікованих форм соматичних антигенів збудників дифтерії та кашлюка / Є. М. Бабич, В. І. Белозерський, Ю. М. Краснопольський та ін. // Експериментальна і клінічна медицина. – 2004. – № 2. – С. 120–123.
2. Бесчасний С. Г. Імунологія : навч. посіб. / С. Г. Бесчасний, О. М. Гасюк – Херсон : ФОП Вишемірський, 2019. – 196 с.
3. Герасименко В. Г. Біотехнологія: Підручник / В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін. – Київ : Фірма «ІНКООС», 2006. – 647 с.
4. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1-3.
5. Краснопольский Ю. М. Биотехнология иммунобиологических препаратов: монография / Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская. – Харьков : Фармитек, 2008. – 312 с.
6. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов : учеб. пособ. / Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2009. – 351 с.
7. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ. Часть I : учеб. пособ. / Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2012. – 303 с.
8. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ. Часть II : учеб. пособ. /

- Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2013. – 192 с.
9. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: аспекты фармацевтической химии : учеб. пособ. / Ю. М. Краснопольский, О. В. Звягинцева. – Харьков : НТУ "ХПИ", 2018. – 247 с.
 10. Краснопольський Ю. М. Фармацевтична біотехнологія: Біотехнології виробництва готових лікарських форм : навч. посіб. / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : ТОВ «ДРУКАРНЯ МАДРИД», 2020. – 279 с.
 11. Краснопольський Ю. М. Фармацевтична біотехнологія: сьогодення та майбутнє : навч. посіб. / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : ТОВ «Друкарня Мадрид», 2022. – 151 с.
 12. Краснопольський Ю. М. Створення систем доставки антигенів та ліків на основі штучних і природних ліпідних наночастинок: ліпосоми та екзосоми : монографія / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : Друкарня Мадрид, 2023. – 179 с.
 13. Краснопольський Ю. М. Харківське підприємство «Біолік» – 115 років на службі здоров'я людей / Ю. М. Краснопольський, І. В. Волчик // Фармаком. 2013. № 4. С. 11-16.
 14. Краснопольський Ю. М. Харківське підприємство «Біолік» – 115 років на службі здоров'я людей / Ю. М. Краснопольський, І. В. Волчик // Фармаком. 2014. № 1. С. 9-18.
 15. Чернишева Л. І. Імунопрофілактика інфекційних хвороб: навч.-метод. посіб. / Л. І. Чернишева, Ф. І. Лаптії, А. Н. Волока та ін. – Київ : «Медицина», 2022. – 336 с.
 16. Erkes D. A. Hapten-induced contact hypersensitivity, autoimmune reactions, and tumor regression: plausibility of mediating antitumor immunity / D. A. Erkes, S. R. Selvan // Journal of immunology research. – 2014. – V. 2014. – ID 175265. – <https://doi.org/10.1155/2014/175265>
 17. Facciola A. An overview of vaccine adjuvants: current evidence and future perspectives / A. Facciola, G. Visalli, A. Lagana, A. Di Pietro // Vaccines. – 2022. – V. 10(5). – ID 819. – <https://doi.org/10.3390/vaccines10050819>
 18. Lemus R. Conjugation of haptens / R. Lemus, M. H. Karol // Methods in molecular medicine. – 2008. – V. 138. – P. 167–182. – https://doi.org/10.1007/978-1-59745-366-0_14
 19. Milligan G. N. Vaccinology : an essential guide / G. N. Milligan, A. D. T. Barrett. – John Wiley & Sons Ltd, 2015. – 390 p.
 20. Ren Z. Progress in immunoassays of toxic alkaloids in plant-derived medicines: a review / Z. Ren, H. Zhang, Z. Wang et al. // Toxins. – 2022. – V. 14(3). – ID 165. – <https://doi.org/10.3390/toxins14030165>

21. Rustemeyer T. Immunological Mechanisms in Allergic Contact Dermatitis / T. Rustemeyer // Current Treatment Options on Allergy. – 2022. – V. 9. – P. 67-75. – <https://doi.org/10.1097/aci.0000000000000142>
22. Shnawa I. Vaccine technology at A Glance : e-Book ID: VTG-19-103 / I. Shnawa. – London : Boffin Access Limited, 2019. – 66 p. – [Internet resource] – URL: <https://www.boffinaccess.com/public/ebooks/vaccine-technology.pdf>
23. Verma S. K. New-age vaccine adjuvants, their development, and future perspective / S. K. Verma, P. Mahajan, N. K. Singh et al. // Frontiers in immunology. – 2023. – V. 14. – ID 1043109. – <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1043109>

РОЗДІЛ 3. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ОТРИМАННЯ СУЧАСНИХ ВАКЦИННИХ ПРЕПАРАТІВ

3.1. Живі вакцини

Деякі живі вакцини наближаються до «ідеальної вакцини», оскільки при використанні однієї або двох доз здатні стимулювати захист на все життя з мінімальною реактогенністю. Такі вакцини можуть бути доступні у випадках, коли природна інфекція дає господареві захист на все життя. Такі вакцини складаються з мікроорганізмів (зазвичай вірусів), які реплікуються в організмі господаря так само, як і природний мікроорганізм, тобто вакцина може стимулювати імунну реакцію, аналогічну тій, що викликає природна інфекція.

Жива вакцина атенується. Це означає, що її здатність викликати захворювання виключається. Необхідно забезпечити, щоб жива вакцина не залишалася ні недостатньо атенуваною (тобто не зберігала навіть мінімальну патогенність), ні надмірно атенуваною (тобто не була недостатньо інфекційною для функціонування як вакцина). Живі вакцини зазвичай викликають як гуморальний імунітет (антитіла), так і клітинний (наприклад, цитотоксичні Т-лімфоцити). Однак, крім вірусних вакцин, перспективним є створення живих вакцин на основі бактерій. Важливою перевагою живих бактерій як вакцини є можливість використання імунної відповіді особливого фізіологічного компартменту, а саме системи слизових оболонок. Вакцини, які доставляються через слизові оболонки, призначені для стимуляції місцевих та системних імунних відповідей, тоді як препарати, які використовують інші типи введення, стимулюють переважно системний імунітет.

Стратегії вакцинації через слизову оболонку, як правило, пов'язані з меншими побічними ефектами, забезпечують легше введення та можуть знизити витрати на виробництво та впровадження препаратів. Хоча різні ділянки слизової оболонки розділені просторово, вони імунологічно пов'язані, так що імунні відповіді, індуковані в одній ділянці, також мо-

жуть спостерігатися і на інших віддалених тканинах слизової оболонки. Секреція IgA і IgM є основною ефекторною відповіддю, що проявляється асоційованими зі слизовою оболонкою лімфоїдними тканинами. Більше 90 % інфекцій у людей починаються на слизових оболонках. Лінія захисту в цих тканинах бажана для більш високого рівня захисту, і цього легше досягти за допомогою вакцинації через слизові оболонки.

Хоча ці властивості роблять живі вакцини вельми бажаними, але *технічно це недосяжно для більшості розроблюваних зараз вакцин*. Якщо жива вакцина буде недостатньо атенуйована, то згодом вона може викликати своє природне захворювання з низькою частотою, тоді як повна атенуація значною мірою знижує імуногенність. Завдяки тому, що жива вакцина може реплікуватися, існує потенційна можливість її перетворення на більш властиву їй патогенну форму. Живі вакцинні штами можуть передаватися з вакцини не вакцинованій людині, що може мати досить серйозні наслідки у разі, якщо реципієнт має імунодефіцит або проходить хіміотерапевтичне лікування раку.

Методи біотехнології та генної інженерії дозволили ідентифікувати та видалити важливі гени вірулентності, що призвело до атенуації патогенних бактерій та дозволило створити вектори, які не здатні повернутися до своїх вірулентних форм. Наприклад, декілька мутацій були описані для різних серотипів *Salmonella enterica* (серовари *Typhi* і *Typhimurium*), причому найчастіше використовується мутація *aroA*, яка блокує здатність мікроорганізму синтезувати ароматичні сполуки. Це робить бактерії нездатними розмножуватися в організмі господаря, зберігаючи при цьому здатність проникати в тонкий кишечник і зберігати інфекцію досить довго, щоб продукувати антиген і викликати ефективну імунну відповідь.

3.1.1. Класичні стратегії

Термін «*класичні стратегії*» стосується технічних стратегій, у яких не використовується технологія рекомбінантних ДНК. Виробництво живих вірусних вакцин ґрунтується на ефективному розмноженні вірусу в клітинній культурі.

Атенуація in vitro. Розробка живих атенуйованих бактеріальних вакцин класичними методами шляхом культивування бактерій *in vitro* для їх атенуації при збереженні імуногенності не завжди є успішною. Конкурен-

тний або селективний тиск на бактерії, що робить їх менш вірулентними під час пасажування *in vitro*, може бути не достатньо великим, бактерії можуть припинити експресувати фактори вірулентності *in vitro*, але повернутися до їхньої експресії *in vivo* (реверсія).

Однією з найпоширеніших живих бактеріальних вакцин, розробленою на серійних пасажах *in vitro*, є вакцина проти туберкульозу. У перші десятиліття ХХ ст. найважливішою спробою створення живих вакцин була розробка вакцини проти туберкульозу, відома як БЦЖ – бацила Кальметта-Герена (лат. – *Bacillus Calmette–Guerin*, BCG), названа на честь двох французьких учених, які отримали ослаблений штам туберкульозних бактерій. Вакцина була отримана протягом 13 років шляхом багаторазових серійних пасажів (231 послідовний пересів *in vitro*) штаму *Mycobacterium bovis*. БЦЖ фактично була першою живою бактеріальною вакциною, яка була застосована у великих масштабах на людях (її повсюдне використання було відстрочено трагічною подією в Німеччині, де партія вакцини виявилася зараженою). Досвід показав, що вакцини, виготовлені з цих ослаблених туберкульозних бацил, абсолютно безпечні, і з 1950 року у Великій Британії та більшості інших країн почалися широкі компанії з імунізації школярів. Сьогодні імунізація вакциною БЦЖ новонароджених проводиться на 3–7 день життя внутрішньошкірно. Ревакцинацію проводять дітям віком 7 та 14 років. Щороку вакциною БЦЖ прищеплюються близько 100 млн осіб.

Вакцина БЦЖ являє собою ліофілізовані живі мікобактерії вакцинних штамів, ліофілізовані у стабілізаторі – глютамініаті натрію. В одній дозі (0,05 мг) вакцини міститься $1,5\text{--}6,0 \times 10^5$ живих мікробних клітин. Усього зареєстровано 16 субштамів БЦЖ (відомо понад 30). Субштами розрізняються за морфологією клітин і колоній (від довгих паличок до кокоподібних форм), залишкової вірулентності, імуногенності, антигенного складу. Так, субштам *Tokyo-172*, отриманий в Японії, характеризується дуже дрібними клітинами, низькою залишковою вірулентністю, зниженою імуногенністю та незначною реактогенністю. Такі субштами прийнято називати «слабкими». «Сильні» субштами відрізняються більшою залишковою вірулентністю та високою захисною здатністю. Водночас ці штами більш реактогенні (штами, використовувані у Франції – *Pasteur 1173 P2*, Данії – *Copenhagen 1331*, Болгарії – *Sofia SL 222* та ін.). Вакцини, виготовлені із «сильних» субштамів, викликають великий відсоток гнійних лім-

фаденітів при вакцинації. Раніше в Україні використовували тільки вироблену в Росії вакцину, в якій використаний субштам БЦЖ *Russia-1*, що містить 4 антигени, які відсутні у більшості інших субштамів, що займає при високій імуногенності середнє положення залишкової вірулентності серед інших субштамів, тобто при високих захисних властивостях вакцина має невисоку реактогенність. В даний час для вакцинації дітей в Україні використовують вакцину БЦЖ SSI виробництва Данії (Державний серологічний інститут, штаб *Copenhagen 1331*, що належить до сильних штабів), вакцину БЦЖ виробництва Індія (Serum Institute of India, штаб *Moscow 361-1*) та ін.

Наявні вакцини БЦЖ відрізняються переносимістю, імуногенністю та ступенем ефективності захисту у клінічних випробуваннях. Вакцини БЦЖ зазвичай мають прийнятні профілі переносимості. Можна очікувати, що для атенуації нового бактеріального штабу будуть застосовуватися методики рДНК-технології. Тому, враховуючи наявні технічні та регуляторні стандарти, дуже малоймовірно, що буде розроблено нову живу бактеріальну вакцину, атенувану із застосуванням виключно класичної стратегії.

Застосування першої класичної стратегії для вірусів стало можливим у 1950-х роках, разом із можливістю вирощування вірусів у культурах клітин. Цей підхід є емпіричним, тобто вірус дикого типу, ізольований з людської інфекції, проходить пасажі *in vitro* через один або більше типів клітин з метою ослаблення його патогенності. У такому разі може мати місце селективний тиск у бік меншого пошкодження клітин. Механізм, завдяки якому в ході атенуації відбуваються мутації, не до кінця зрозумілий. У деяких випадках (наприклад, вірус поліомієліту) можна було продемонструвати атенуацію на приматах, хоча в більшості випадків атенуація підтверджується лише в ході інтенсивних клінічних випробувань. Успіх даного емпіричного підходу, який застосовувався як для вакцин для перорального введення (вакцина вірусу поліомієліту (OPV) для перорального введення), так і для вакцин, що вводяться ін'єкційним (парентеральним) шляхом (кір, епідемічний паротит, краснуха, вітряна віспа), підтверджується кількістю наявних ліцензованих вакцин. Реактогенність таких вакцин є досить низькою для того, щоб деякі з них (поліомієліт, кір) були широко прийняті в усьому світі у звичайній педіатричній практиці. Завдя-

ки інтенсивним програмам імунізації OPV, поліомієліт рухається у бік викорінення у всьому світі.

Необхідно відзначити, що для профілактики оперізуючого лишая (герпесу) використовуються дві вакцини: атенуйована вакцина – *Zostavax* (Merck&Co., США) і ад'ювантна ліпосомальна рекомбінантна вакцина – *Shingrix*® (GlaxoSmithKline, Бельгія). Оперізуючий лишай або оперізуючий герпес є нейротропним захворюванням, яке виникає в результаті реактивації латентного вірусу, що викликає вітряну віспу. Використання атенуйованої вакцини доступне в більшості країн. Однак її ефективність знижується у людей віком 70 років і більше. З метою забезпечення більш високої імуногенності у людей похилого віку запропонована ад'ювантна ліпосомальна рекомбінантна вакцина *Shingrix*®. Вона схвалена і застосовується в США, Канаді, Японії та Європі. Вакцина *Shingrix*® демонструє більш високу імуногенність порівняно з атенуйованою вакциною проти оперізуючого лишая (вірусу герпесу), при аналогічних побічних ефектах.

3.1.2. Реасортантні геноми

Вірус-реасортант, отриманий після спільного інфікування культури двома різними вірусами із сегментованими геномами, містить гени обох батьківських вірусів.

Ротавірусна інфекція викликає гострий гастроентерит і є однією з основних причин смертності від важкої зневоднюючої діареї у дітей молодше 5 років у всьому світі. Живі вакцини проти ротавірусного гастроентериту першого покоління являли собою атенуйовані штами ротавірусів тварин: ротавіруси мавп RRV (*Rhesus Rotavirus Vaccine Strain MMU G3P5B*); бичачий ротавірус NCDV (*Bovine Rotavirus Vaccine Strain RIT 4237 G6 [P6] UK G6 [P5]*) та WC3 (*Bovine Rotavirus Vaccine Strain WC 3 G6 P7*) та ін.

Ефективність вакцини проти ротавірусного гастроентериту на основі штаму RIT 4237 варіювала від 0 до 64 %, а проти важких форм – від 0 до 84 %. Вакцини не приводили до захисту проти інфекції. Згодом виробничі штами були використані для отримання вакцин другого покоління. З них були отримані реасортанти епідеміологічно важливих штамів ротавірусу людини G1-G4 та штамів ротавірусів тварин, здатних розмножуватися в кишечнику людини, не викликаючи захворювання.

Для підвищення ефективності ротавірусів тварин були ізольовані ротавіруси-реасортанти, що містять переважно гени ротавірусів тварин, які несуть фенотип атенуації для людини, а також ген(и) поверхневого білка ротавірусів людини, які стимулюють вироблення серотип-специфічних антитіл. Ці ротавіруси-реасортанти мали більшу ефективність як можлива вакцина, ніж батьківські віруси тварин. Квадривалентна реасортантна ротавірусна вакцина (на основі ротавірусу резуса) була ліцензована в 1998 р. Однак, внаслідок підвищеного рівня проникнення в тканини (1 : 10000), що спостерігався відразу після імунізації, застосування вакцини було припинено. Цей досвід показує, що *безпе́чність є ключовою проблемою розробки нових живих вакцин*.

В наш час активно використовуються вакцини проти ротавірусної інфекції на основі реасортантних штамів ротавірусу. Це вакцини *RotaTeq®* та *RotaRix®* (Merck, США). *RotaTeq®* містить антигени п'яти реасортантних штамів ротавірусу, геноми яких експресують білки VP7 (G1-G4) та VP4 ротавірусу людини та білки VP7 та VP4 ротавірусу теляти. Таким чином, вакцина *RotaTeq®* містить живі реасортанти людського та бичачого типу, представлена наступною композицією: реасортант G1 – не менше $2,0 \times 10^6$ інфікуючих одиниць (ІО); реасортант G2 – не менше $2,8 \times 10^6$ ІО; реасортант G3 – не менше $2,2 \times 10^6$ ІО; реасортант G4 – не менше $2,0 \times 10^6$ ІО; реасортант РІА – не менше $2,3 \times 10^6$ ІО. Як допоміжні речовини у вакцині використані сахароза, натрію цитрат дигідрат, натрію гідроксид, полісорбат 80.

Аналогічний підхід був застосований до вакцин проти грипу, в яких новий відібраний вірус грипу надавав гени, що кодують імуногенні поверхневі глікопротеїни (гемаглютинін та нейрамінідазу), а атенуований вірус забезпечував решту генів, а також фенотип атенуації. Такі реасортантні віруси грипу можуть бути адаптовані до росту в клітинних лініях ссавців, таких як MDCK12 (лінія клітин нирок собаки), як клітинний субстрат замість курячих яєць. Запропоновано вакцинні штами живої протигрипозної вакцини на основі штамів реасортантів, отриманих на основі холодо-адаптованих мутантів-донорів атенуації. Ці донори характеризуються холодо-адаптованістю, тобто здатністю розмножуватися при зниженій температурі в лабораторних тваринах та людині.

Переважає більшість сезонних та пандемічних вірусів мають реасортантне походження. Це передусім стосується і сучасного вірусу грипу

H1N1v-2009, що спричинив пандемію грипу. Тому, з метою запобігання появі реасортантів з новими властивостями, застосування живих протигрипозних вакцин обмежене на підйомі захворюваності на грип і, тим паче, в умовах пандемії грипу.

3.1.3. Термочутливі мутанти

Вірусні мутанти відбираються за їх здатністю до росту за різних температур. Ці віруси називаються *термочутливими* (ts) – нездатними до росту при підвищених температурах, або *адаптованими до холоду* (ca) – відібраними за здатністю до росту *in vitro* при температурах нижче фізіологічних (37 °C), тобто до 25 °C. Ідея цього підходу полягає в тому, що віруси будуть менш активними при рості *in vivo*, ніж їхні батьківські форми (віруси дикого типу), а отже, менш вірулентними та фенотипно атенуйованими. У США жива інтраназальна вакцина була схвалена FDA у червні 2003 р. та дозволена для використання у віковій категорії від 5 до 49 років. Завдяки багаторазовим пасажам на курячих ембріонах в умовах зниженої температури стало можливим отримання ослабленого вірусу, який не реплікується при високих температурах, характерних для легень людини, але здатний розмножуватися в носоглотці при температурі 34 °C, викликаючи локальну інфекцію, що призводить до вироблення секреторної та генералізованої імунної відповіді. У зв'язку з тим, що вакцинація живою грипоною вакциною нагадує природну транзиторну інфекцію, вона має досить високу ефективність і характеризується 94 %-вою сероконверсією у дітей, а в комбінації з інактивованою вакциною викликає позитивну імунну відповідь у 68 % літніх людей.

3.1.4. Хімічний мутагенез

Ще однією методикою створення атенуйованого штаму є хімічний мутагенез із наступною селекцією. Таким чином був отриманий штам Ty21a *Salmonella typhi*, призначений для запобігання черевному тифу. Дозвіл на використання атенуйованого штаму отримано на основі даних про його безпечність та ефективність.

3.1.5. Рекомбінантні віруси

Підвищена стабільність фенотипу атенуації досягається внаслідок створення модифікацій або делецій у вірусних генах, досить великих для того, щоб повернення до вихідного стану шляхом зворотних мутацій було неможливим або малоімовірним. Натомість атенуовані віруси, отримані із застосуванням класичних стратегій, можуть мати лише точкові мутації, а отже, і здатність до повернення у вихідний стан.

Наприклад, у гені вірусу простого герпесу (HSV), що кодує глікопротеїн, необхідний для прояву інфекційності, була створена мутація. Даний глікопротеїн вводиться у вірус клітинної лінії в ході культивування *in vitro*, і завдяки цьому отриманий вірус може ініціювати інфекцію *in vivo*, але не здатний поширюватися, що забезпечує його молекулярну атенуацію.

3.1.6. Рекомбінантні бактерії

Конструювати атенуовані бактерії складніше, ніж віруси через значно більший розмір бактеріальних геномів. Стратегія полягає у виявленні гену(ів), відповідальних за бактеріальну вірулентність або колонізацію та виживання, а потім – видалення гена (переважний варіант), або виключення / модулювання його експресії *in vivo*. Як і для вірусів, може існувати баланс між вірулентністю та активністю бактеріального штаму як вакцини, що означає можливість надмірної атенуації бактеріального штаму до такої міри, коли він більше не здатний реплікуватися у достатній кількості для стимуляції ефективної імунної відповіді.

Атенуація штамів *Vibrio cholerae* була зроблена шляхом рДНК-направленої делеції генів, які кодують фактори вірулентності, такі як холерний токсин. Живі атенуовані вакцини проти холери, виготовлені у такий спосіб, пройшли клінічну оцінку, і одна з них була ліцензована. Щоб закріпити атенуацію, знизивши таким чином імовірність повернення у вихідний стан, бажано делетувати два або більше незалежних генів або генетичних локусів, що беруть участь у забезпеченні вірулентності.

3.1.7. Рекомбінантні вектори

Іншим застосуванням технології рДНК у створенні нових живих вакцин є конструювання вірусів як векторів для «чужорідних» поліпептидів інших патогенних мікроорганізмів. Метою створення таких векторів є презентація чужорідного антигена імунній системі в контексті живої інфекції, щоб імунна система реагувала на антиген як на живий імуноген, і таким чином виробляла більш широкий імунітет (гуморальний і клітинний) на відповідний патогенний для людини мікроорганізм. Рекомбінантний поліпептид експресується в інфікованій клітині або транспортується до клітинної поверхні з метою стимулювання вироблення антитіл, або розпадається на пептидні фрагменти, які транспортуються до клітинної поверхні. Ця стратегія також має потенційну перевагу ампліфікації імуногенного сигналу при реплікації живого вектора.

Вірусні вектори. Прототипом вірусного вектора є вірус коров'ячої віспи. У вірусі коров'ячої віспи експресували десятки різних рекомбінантних поліпептидів. Щонайменше на 25 моделях для різних інфекцій було показано, що вакцинація тварин може захистити їх від патогенного мікроорганізму, що кодує рекомбінантний поліпептид. Рекомбінантні віруси коров'ячої віспи, які експресують пухлинні антигени, також мали захисні функції в дослідженнях з введенням антигенного стимулу на моделі раку гризунів. Враховуючи відомі ускладнення при імунізації проти віспи, тяжчі у людей з ослабленим імунітетом, вірус коров'ячої віспи був сам по собі сконструйований таким чином, щоб знизити його вірулентність без зменшення ефективності живого вірусного вектора. Цитокіни можуть впливати на природу чи величину імунної реакції. З метою селективного маніпулювання типом імунної відповіді на вакцинний антиген у контексті вакцинації живим вектором був сконструйований рекомбінантний вектор, що експресує як цитокін, так і рекомбінантний вакцинний антиген. Віруси віспи свійської птиці та канарки розробляються як живі вектори, здатні інфікувати клітини людини, але не дають інфекційного вірусного потомства. Ця нездатність до поширення дозволяє класифікувати ці вірусні вектори також як вакцини на основі ДНК.

Інші віруси ссавців також стали основою для конструювання живих векторів. Штами аденовірусів, які широко використовуються як вакцини серед військовослужбовців з метою запобігання гострим респіраторним

захворюванням, були сконструйовані таким чином, щоб експресувати чужорідні поліпептиди, та стимулювали захисний імунітет на кількох вірусних моделях антигенного стимулу у тварин. Оптимізація експресії рекомбінантних поліпептидів залишається важливим технічним завданням для всіх цих живих вірусних векторів.

РНК віруси можуть бути сконструйовані аналогічним чином. *Sindbis* та іншим α -вірусам приділяли велику увагу завдяки їх широкому спектру, здатності інфікувати клітини, які не діляться, а також потенційно високому рівню експресії в перерахунку на клітину. Зважаючи на ці властивості, з вірусом *Sindbis* була розроблена вакцина на основі нуклеїнової кислоти.

Бактеріальні вектори. На основі патогенних бактерій можна конструювати живі рекомбінантні вектори для експресії чужорідних поліпептидних антигенів. Найчастіше цей підхід використовували для конструювання шлункових патогенних організмів таким чином, щоб вони могли індукувати імунітет слизових оболонок проти чужорідного поліпептиду при пероральному введенні.

У сфері розробки живих бактеріальних векторів максимальні зусилля щодо розробки штамів, імунології, молекулярних розробок та клінічних випробувань були сконцентровані на *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* та *Shigella flexneri*, вони також були перетворені на рекомбінантні вектори для перорального введення для клінічної оцінки. Проблемою таких живих атенуйованих векторів залишається збереження достатньої вірулентності для реплікації в травному тракті та експресія чужорідних поліпептидів на необхідному рівні, а також досягнення достатньої атенуації для забезпечення хорошої переносимості. Здатність деяких з цих видів бактерій реплікуватися всередині клітини може посилити здатність експресованих чужорідних поліпептидів стимулювати клітинні імунні реакції проти відповідних патогенних організмів.

У цьому розділі розглянуто живі вакцини на прикладі вакцини БЦЖ. Крім того, у розділі 3.1 докладно представлені дані про біотехнологічні аспекти отримання вакцини БЦЖ на основі атенуйованих мікобактерій.

Сьогодні вакцинологія використовує кілька бактеріальних живих вакцин, крім вакцини БЦЖ. Як живі бактеріальні вакцини розглянемо вакцини *Vaxchora*® і *Vivotif*®.

Vaxchora® – жива пероральна вакцина проти холери. Вакцина являє собою суспензію живої бактеріальної атенуйованої вакцини для перораль-

ного введення, що містить штам *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR. Штам CVD 103-HgR був сконструйований з класичного штаму холери *Inaba* серогрупи O1 569B шляхом делеції послідовності каталітичного домену обох копій гена *ctxA*, що запобігає синтезу активного токсину холери. Цей атенуований штам зберігає здатність синтезувати імуногенну нетоксичну В-субодиницю холерного токсину (кодується геном *ctxB*). Крім того, в локус гена гемолізину (*hlyA*) був вставлений маркер, щоб зробити можливим диференціювання вакцинного штаму від *V. cholerae* O1 дикого типу.

Вакцинний штам вирощують у ферментерах у контрольованих умовах на середовищі, що містить казамінові кислоти (суміш амінокислот і коротких пептидів, отриманих при кислотному гідролізі казеїну), дріжджовий екстракт, мінеральні солі та піногасник. Бактерії збирають шляхом фільтрації, піддають діафільтрації і концентрують перед додаванням стабілізуючого розчину, що містить антиоксидант (аскорбінову кислоту), гідролізований казеїн з коров'ячого молока, кріопротектор (сахарозу) та хлорид натрію як стабілізатор. Стабілізовані бактерії ліофілізують, подрібнюють і змішують із сухою лактозою (вологопоглинач та наповнювач). Суміш активних компонентів розфасовують у пакети. Окремо у пакетах виготовляють буферний компонент шляхом змішування сухих компонентів: бікарбонату натрію (нейтралізатор шлункового соку), карбонату натрію, аскорбінової кислоти (буфер і нейтралізатор хлору у воді) та висушеної лактози (засіб для підвищення плинності). Один пакет із буферним компонентом та один пакет із активним компонентом упаковують в окремі коробки з разовою дозою. Вакцину зберігають при температурі від 2°C до 8°C. Після відновлення *Vaxchora*® містить від 4×10^8 до 2×10^9 колонієутворюючих одиниць (КУО) живих атенуованих *V. cholerae* CVD 103-HgR. Отримана суспензія має бути трохи каламутною і може містити білі частинки. *Vaxchora*® – це вакцина, призначена для активної імунізації проти захворювання, що викликається *V. cholerae* серогрупи O1, у дорослих віком від 18 до 64 років, що знаходяться в районах, уражених холерою. У результаті імунізації виявляються нейтралізуючі антитіла.

Vivotif® – жива атенуована вакцина проти черевного тифу *Ty21a*, призначена тільки для перорального введення. Вакцина містить атенуований штам *Salmonella typhi* Ty21a(1,2). *Vivotif*® виробляється компанією *RaxVax Berna GmbH*, Швейцарія. Вакцинний штам вирощують у ферментерах у контрольованих умовах на поживному середовищі, що містить гід-

ролізат дріжджів, казамінові кислоти, декстрозу та галактозу. Бактерії збирають центрифугуванням, змішують зі стабілізатором, що містить сахарозу, аскорбінову кислоту та амінокислоти, ліофілізують. Ліофілізовані бактерії змішують з лактозою і стеаратом магнію, поміщають в желатинові капсули, покриті розчином для надання їм стійкості до розчинення в шлунковому соці. Потім лососеві/білі капсули з кишковорозчинною оболонкою упаковують у блістер по 4 капсули. Продукт зберігають при температурі від 2 °С до 8 °С. Склад однієї капсули показано в таблиці 3.1. *Vivotif®* показана для імунізації дорослих і дітей старше 6 років проти захворювання, викликаного *S. typhi*.

Таблиця 3.1 – Склад однієї капсули *Vivotif®* з кишковорозчинною оболонкою

Назва компоненту	Кількість на одну капсулу
Життєздатних <i>S. typhi</i> Ty21a	2,0–10,0×10 ⁹ КУО
Нежиттєздатних <i>S. typhi</i> Ty21a	5–50×10 ⁹ бактеріальних клітин
Сахароза	3,3–34,2 мг
Аскорбінова кислота	0,2–2,4 мг
Суміш амінокислот	0,3–3,0 мг
Лактоза	до 180–200 мг
Магнію стеарат	3,6–4,0 мг

Важливою перевагою використання живих бактерій як вакцин є можливість використання імунної відповіді особливого фізіологічного компартменту, а саме системи слизових оболонок. Вакцини, які доставляються через слизові оболонки, призначені для стимуляції місцевих та системних імунних відповідей, тоді як препарати, для яких використовуються інші шляхи введення, стимулюють переважно системний імунітет. Стратегії вакцинації через слизову оболонку, як правило, пов'язані з меншими побічними ефектами, забезпечують легше введення та можуть знизити витрати на виробництво та впровадження.

У цьому розділі ми розглядаємо створення живих вакцин на основі роду *Salmonella*. На нашу думку, інтерес становлять живі вакцини на основі бактерій *Salmonella* для лікування пухлинних захворювань. У ході еволюції бактерії *Salmonella* здатні виживати та розмножуватися в організмі господаря – людини або тварини. Існує можливість використання вза-

ємодії цих бактерій із імунною системою господаря, що дозволяє запропонувати модифіковані терапевтичні вакцини на основі сальмонели. Генотип сальмонел можна модифікувати для зниження токсичності та для розвитку або посилення терапевтичної ефективності. Терапевтичні вакцини на основі сальмонели є привабливою альтернативою традиційним методам лікування раку (хіміотерапія, променева терапія та пасивна імунотерапія). Живі бактерії мають природну здатність відчувати зовнішнє середовище і проникати в тканини-мішені. Відповідні штами сальмонел, введені в експериментальну тваринну модель пухлини, вибірково накопичуються в солідних пухлинах і пригнічують їх ріст. Більше того, бактерії можуть досягати ділянок пухлини, недоступних для інших терапевтичних засобів, які пасивно дифундують, наприклад, ішемізованих ділянок. Бактерії роду *Salmonella* можуть продукувати та локально вивільняти природний або рекомбінантний протираковий агент, що посилює їх терапевтичний ефект. Безпечність штаму *S. typhimurium* VNP20009 підтверджено клінічними випробуваннями. Однак високого терапевтичного ефекту не виявлено, що може бути пов'язане з недостатньою колонізацією пухлини бактеріями. Для посилення колонізації солідних пухлин бактерії штаму VNP20009 були забезпечені здатністю експресувати на поверхні фрагмент антитіла, специфічного до карциноембріонального антигена, який знаходиться на пухлинних клітинах людини. Крім того, для посилення протиракової активності генетичний матеріал VNP20009 був сконструйований таким чином, щоб надмірно продукувати ендогенний проапоптотичний білок, націлений на ракові та імунні клітини, що сприяють росту пухлини.

3.2. Біотехнологія одержання рекомбінантних препаратів

Сферою біотехнології, яка розвивається найактивніше, є фармацевтична біотехнологія. Світовий ринок фармацевтичної продукції, одержаної за допомогою біотехнологічних методів, становить половину всього фармацевтичного ринку. Істотним сегментом фармацевтичної біотехнології є генно-інженерні препарати, одержані з використанням технології рекомбінантних ДНК. Причому застосування генної технології використовується для отримання не тільки вакцин моноклональних антитіл, цитокінів, різних біологічних факторів, але й антибіотиків, вітамінів та інших лі-

карських АФІ. У цьому розділі ми зупинимося на біотехнології рекомбінантних ДНК, продуцентах, які використовуються для цього, та основних технологічних принципах отримання рекомбінантних продуктів.

3.2.1. Продуценти для генно-інженерної біотехнології

Як продуценти, що використовуються в біотехнології рекомбінантних ДНК, застосовуються як прокаріотичні, так і еукаріотичні клітини. Перші рекомбінантні імунобіотехнологічні лікарські препарати, у тому числі інтерферони, були зареєстровані у 80–90 рр. XX століття, причому, як видно з таблиці 3.2, для їх отримання були використані різні системи продуцентів. Кількість рекомбінантних продуктів збільшується з кожним роком. Наприклад, на сьогодні було отримано за допомогою ДНК технологій більше 60 імунобіологічних препаратів і десятки фармацевтичних препаратів. Спектр організмів, що використовуються як рекомбінантні клітинні платформи («фабрики»), розширюється від переважно *E. coli* на ранньому етапі до ряду альтернативних бактерій, дріжджів, клітин комах, клітин рослин і, особливо, клітин ссавців (табл. 3.3), які здатні отримувати вигоду з шляхів метаболізму і процесингу білків аналогічних тим, які є у клітинах людини.

Таблиця 3.2 – Рекомбінантні білкові препарати, схвалені у 1980-х рр.

Продукт	Продуцент	Терапевтичні показання	Рік
Хумулін	<i>E. coli</i>	Діабет	1982
Протропін	<i>E. coli</i>	Дефіцит гормону росту	1985
Роферон А	<i>E. coli</i>	Волосистоклітинний лейкоз	1986
Інтрон А	<i>E. coli</i>	Рак, гострокінцеві кондиломи, гепатит	1986
Рекомбівакс	<i>S. cerevisiae</i>	Гепатит В	1986
Ортоклон ОКТ 3	Гібридомна клітинна лінія	Реверсія гострого відторгнення нирки і трансплантата	1986
Хуматроп	<i>E. coli</i>	Дефіцит гормону росту	1987
Активіза (Альтеплаза)	СНО*	Гострий інфаркт міокарда	1987
Епоген (Епоетин альфа)	СНО*	Анемія	1989

Примітка. * СНО – клітинна лінія, яєчника китайського хом'ячка.

Бактеріальні клітини. Для виробництва гетерогенного білка в промислових умовах бактерії є дуже привабливими, їх відрізняє висока продуктивність і низька собівартість культивування. Переваги та недоліки різних штамів-продуцентів (бактерій та дріжджів) рекомбінантних продуктів наведені в табл. 3.3.

Таблиця 3.3 – Характеристика штамів-продуцентів рекомбінантних білків

Продуценти	Переваги	Недоліки
Бактерії: <i>E. Coli</i> , <i>B. subtilis</i>	1. Швидкий ріст культури (6–12 годин від початку посіву до закінчення індукції). 2. Відносно високий вихід цільового продукту (100–2000 мг/л). 3. Низька вартість ростового середовища. 4. Низька ціна ферментації. 5. Можливість одержання мікрокристалів цільового білка (тількия включення)	1. Ускладнений біосинтез великих поліпептидів (понад 50 кДа). 2. Відсутня система глікозилювання. 3. Обмежені можливості секреції білків. 4. Ряд гетерологічних білків токсичні для клітин. 5. Багато гетерологічних білків утворюють лише тільця включення. 6. Ускладнено утворення дисульфідних зв'язків
Дріжджі: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia pastoris</i>	1. Відносно швидкий ріст культури (3–5 діб від початку посіву до закінчення індукції). 2. Високий вихід цільового продукту (до 40 г/л). 3. Дуже низька ціна ростового середовища (гліцерин, метанол, аміак). 4. Помірна вартість ферментації. 5. Можлива експресія великих поліпептидів (понад 50 кДа). 6. Можливе глікозилювання.	1. N-глікозилювання дає імуногенні олігосахариди. 2. Не всі білки ефективно секретуються

Закінчення табл. 3.3

Продуценти	Переваги	Недоліки
Дріжджі: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia pastoris</i>	7. Секреція білка здійснюється у ростове середовище та низький рівень секреції протеаз	

Проте є й певні проблеми, властиві бактеріальним системам експресії. Серйозною проблемою для створення вакцин в даній системі є імуногенність бактеріальних компонентів таких як ліпополісахариди з клітинної стінки, або нездатність адекватно згортати складні білки або ті, що піддаються посттрансляційним модифікаціям при синтезі в природних джерелах. З метою видалення ліпополісахаридів із вакцин та інших білкових препаратів доводиться використовувати додаткові технологічні прийоми та методи. Ще одним складним питанням при використанні бактерій, наприклад, *E. coli*, є нерозчинність рекомбінантних білків та утворення ними тілець включення, які надалі вимагають спеціальної обробки. Ці фактори обмежують використання бактеріальних систем експресії. Оскільки тільки включення можуть містити велику кількість згорнутих видів білків, стратегії прямого використання цих білкових агрегатів у складі рекомбінантних антигенів або імуномодуляторів становлять безперечний інтерес.

E. coli є найефективнішим господарем для виробництва рекомбінантного білка серед відповідних видів бактерій через її високу швидкість росту, широкий набір генетичних інструментів і широкий спектр різних штамів, створених для вирішення більшості виробничих завдань. В даний час на світовому фармацевтичному ринку присутні чотири рекомбінантні препарати для застосування людиною, в яких використовуються бактерія *E. coli* як система експресії (табл. 3.2). З представлених у таблиці 3.2 даних зрозуміло, що *E. coli* залишається основною системою експресії для рекомбінантної продукції у бактеріях.

Бактерія *E. coli* являє собою грамнегативну непатогенну рухливу паличку довжиною менше 1 мкм. Її основним середовищем існування є кишечник людини, але вона також може висіватися з води та ґрунту. Завдяки здатності розмножуватися простим поділом на середовищах, що містять тільки іони Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ , Cl^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} , мікроелементи та джерело вуглецю (наприклад, глюкозу). *E. coli* стала улюбленим об'єктом

для наукових досліджень. При культивуванні *E. coli* на збагачених рідких поживних середовищах, що містять амінокислоти, вітаміни, солі, мікроелементи та джерело вуглецю, час генерації (тобто час між утворенням бактерії та її поділом) у логарифмічній фазі росту при температурі 37 °С, становить приблизно 22 хв. *E. coli* можна культивувати як в аеробних, так і в анаеробних умовах. Однак для оптимальної продукції рекомбінантних білків *E. coli* (як і інші мікроорганізми) зазвичай вирощують в аеробних умовах. Крім *E. coli* у біотехнології використовують низку інших мікроорганізмів: *Acremonium chrysogenum*, *Bacillus brevis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp., *Streptomyces* spp., *Trichoderma reesei*, *Xanthomonas campestris*, *Zymomonas mobilis* та ін.

Водночас проводяться роботи, що підтверджують можливість використання інших бактерій, наприклад, грамнегативних. Серед них цікавою є *Pseudomonas fluorescens* – облігатний аероб. Ця бактерія становить особливий інтерес оскільки не належить до ацетогенних (не виділяє ацетат як кінцевий продукт) бактерій і дуже помірно споживає кисень. При синтезі гетерогенних білків ця бактерія досягає достатньо високих виходів продукту. Проведено експерименти з отримання вакцинних препаратів на основі двох рекомбінантних білків, які продукуються *P. fluorescens*. Ці білки успішно викликали захист від інфекцій малярії та сибірки на моделях мишей і кроликів відповідно. Нас сьогодні відомі й інші грамнегативні бактерії, що використовуються як системи експресії: *Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutropha*, *Burkholderia glumae* та *Acinetobacter* sp.

Загалом використання бактерій як системи експресії для виробництва вакцин має тенденцію до збільшення. Інженерія та подальша адаптація вільних від ендотоксинів штамів *E. coli* може вирішити одну з основних проблем цієї системи експресії. З іншого боку, зусилля, які докладаються в даний час, для експорту системи N-глікозилювання *Campylobacter jejuni* в *E. coli* можуть стати проривом у виробництві антигенних білків для цілей вакцинації.

Бактерії, які використовуються в технології рекомбінантних ДНК, можна розділити на дві групи:

- ✓ мікроорганізми як джерела специфічних генів;
- ✓ мікроорганізми, створені генно-інженерними методами на вирішення певних завдань.

До специфічних генів належить, наприклад, ген, що кодує термостабільну ДНК-полімеразу, яка використовується в широко застосовуваній полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР). Цей ген був виділений з термофільних бактерій і клонований *E. coli*. До другої групи мікроорганізмів належать, наприклад, різні штами *Corynebacterium glutamicum*, які генетично модифіковані з метою підвищення продукції промислово важливих амінокислот.

Дріжджові клітини. Білки антигенів, призначених для імунізації, можуть потребувати природних посттрансляційних модифікацій, щоб забезпечити нативну укладку і створити тривимірну структуру з належним представленням епітопу, особливо тих білків, які є конформаційними, а не залежними від послідовності. Дріжджі вважаються ефективною системою для розробки рекомбінантних вакцин для людини, оскільки здатні вирішити проблему укладання білків, перевершуючи у цьому питанні бактерії. Так, синтезований бактеріальною клітиною еукаріотичний білок часто доводиться піддавати ферментативної модифікації, приєднуючи до білкової молекули низькомолекулярні сполуки (у багатьох випадках це необхідно для правильного функціонування білка). На жаль, *E. coli* та інші прокаріоти не здатні здійснювати ці модифікації, тому для отримання повноцінних еукаріотичних білків використовують *Saccharomyces cerevisiae*.

Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* – це непатогенні одноклітинні мікроорганізми з діаметром клітини приблизно 5 мкм, які у багатьох аспектах є еукаріотичним аналогом *E. coli*. Їх генетика, молекулярна біологія та метаболізм детально вивчені. *S. cerevisiae* розмножуються брунькуванням і добре ростуть на такому ж простому середовищі, як і *E. coli*. Їх здатність до перетворення цукру на етанол та вуглекислий газ здавна використовувалася для виготовлення алкогольних напоїв та хліба. Щорічно у світі витрачається 1 млн тон *S. cerevisiae*. У 1996 році було визначено повну нуклеотидну послідовність всього набору хромосом *S. cerevisiae*, що ще більше підвищило цінність цього мікроорганізму для наукових досліджень.

Виробництво рекомбінантних білків здійснюють на кількох видах дріжджів: *Hansenula polymorpha*, *Komagataella phaffii* (також відомі як *Pichia pastoris*), *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Arxula adeninivorans*, *Yarrowia lipolytica*. Представлені дріжджі за їх метаболізмом можна розділити на метилотрофні та неметилотрофні.

Завдяки своїй непатогенній природі та відсутності токсинів *S. cerevisiae* є однією із систем експресії дріжджів, що найчастіше використовуються для отримання біофармацевтичних продуктів. Однак до основних недоліків *S. cerevisiae* належить N-гіперглікозилювання білків і низька ефективність секреції. Припускають, що манозильовані глікопротеїни *S. cerevisiae* виявляють підвищену імуногенність, оскільки вони специфічно взаємодіють з рецепторами зв'язування манози, виявленими на антигенпрезентуючих клітинах, таких як дендритні клітини та макрофаги.

У *P. pastoris* були ідентифіковані гени, що беруть участь у процесі гіперманозилування, а мутації в цих генах можуть знижувати продукцію небажаних глікоформ. Отже, глікопротеїни, отримані з *P. pastoris* можуть діяти як ад'юванти. *P. pastoris* – метилотрофні дріжджі, які зарекомендували себе як чудова система-господар для рекомбінантної експресії. Ця дріжджова система не лише недорога, а й швидка з точки зору часу експресії, а також котрансляційного та посттранскрипційного процесингу. Культивування цього виду дріжджів в біореакторах дозволяє отримувати велику кількість рекомбінантного білка з культур клітин високої густини.

У таблиці 3.4 наведено антигени, отримані на системах експресії дріжджів. Сьогодні проводяться роботи зі створення рекомбінантних вакцин для профілактики черевного тифу, що викликається *Salmonella enterica* CRM137, субодиночна вакцина LipL32 проти лептоспірозу, що викликається *Leptospira interrogans*, NS1-вакцина на основі вірусоподібних частинок (VLP, від англ. – *virus-like particles*) проти вірусу Зіка, HEV-VLP проти гепатиту Е та ряд інших. Найбільш ефективними продуцентами рекомбінантних білків є *P. pastoris* та *H. polymorpha*. Сьогодні з використанням дріжджових клітин отримані вакцини, інтерферони, інтерлейкіни та інші АФІ.

Еукаріотичні клітини. При всіх відмінностях між типами еукаріотів, методичні підходи до культивування клітин комах, рослин і ссавців мають багато спільного. Спочатку беруть невеликий шматочок тканини даного організму і обробляють його протеолітичними ферментами, які розщеплюють білки міжклітинного матеріалу (при роботі з рослинними клітинами додають спеціальні ферменти, які руйнують клітинну стінку). Клітини, що вивільнилися, поміщають у складне середовище, яке містить амінокислоти, антибіотики, вітаміни, солі, глюкозу і фактори росту. В цих умовах клітини діляться доти, доки на стінках ємності з культурою не

утворюється *клітинний моношар*. Якщо після цього не перенести клітини в ємності зі свіжим культуральним середовищем, ріст припиняється. Зазвичай вдається переносити (перевивати, субкультивувати) і підтримувати до 50-100 генерацій вихідної (*первинної*) культури, потім клітини починають втрачати здатність до поділу та гинуть. Часто деякі клітини первинних клітинних культур, що перевиваються, зазнають генетичних змін, в результаті яких прискорюється їх ріст. Культури клітин, які при цьому набувають селективних переваг, виявляються здатними до необмеженого росту *in vitro* та називаються *стійкими клітинними лініями*. У більшості клітин, здатних до необмеженого росту, є значні хромосомні зміни, зокрема, відзначається збільшення числа хромосом і втрата інших. У біотехнології стійкі клітинні лінії іноді використовують для розмноження вірусів і виявлення білків, які кодуються клонованими послідовностями ДНК. Крім того, вони застосовуються для великомасштабного виробництва вакцин та рекомбінантних білків. Рослини є життєздатною платформою для експресії, особливо виробництва антитіл. Глікозилювання особливо важливе для рекомбінантних білків, при цьому біотехнологи докладають значних зусиль для гуманізації глікозилювання рослин та забезпечення безпечної імуногенності.

Клітини комах. Ще однією платформою системи експресії є бакуловіруси клітин комах, за допомогою яких також можливе отримання білкових молекул, зокрема антигенів. Показано, що клітини комах можуть рости в суспензійній культурі із високою щільністю клітин. Крім того, ця система дозволяє вводити кілька генів в кістяк бакуловірусного геному під контролем сильних вірусних промоторів і використовувати рекомбінантний бакуловірус як вектор трансдукції для клітин ссавців в системі експресії. Клітини комах відтворюють більшість посттрансляційних модифікацій клітин ссавців, характерне глікозилювання приводить до синтезу глікопротеїнів без сіалової кислоти. Іншим недоліком у порівнянні з системами експресії на основі клітин ссавців є необхідність контролю та підтримки запасу вірусу, оскільки експерименти з експресії ґрунтуються на періодичній процедурі, і кожен режим зараження передбачає контроль клітинної культури, а також кількісну оцінку вірусу. Хоча ця платформа вважається більш біобезпечною, ніж експресійна система на основі клітин ссавців, були виявлені інфекційні агенти з потенційним ризиком для здоров'я людини та тварин, для яких необхідно провести скринінг.

Як і в системі експресії ссавців, білковий продукт може накопичуватися всередині клітини або виділятися у середовище шляхом додавання оптимізованих сигналів секреції комах у рекомбінантний ген. Використання бакуловірусів як системи експресії дозволяє виробляти вакцини як для людини (таблиця 3.4), так і для ссавців (для боротьби з патогенами свиней – вірус африканської чуми, цирковірус, протопарвовірус). Для людини добре зарекомендували себе дві вакцини проти вірусу папіломи – *Gardasil®* (Merck, США), отримана на культурах дріжджів різних штамів (*S. cerevisiae*, *H. polymorpha*), та *Cervarix®* (GlaxoSmithKline, Бельгія), отримана на основі системи експресії бакуловірус/клітини комах.

Розробляється декілька стратегій для покращення бакуловірусної системи експресії клітин комах, включаючи гуманізацію патерну (моделі) глікозилювання, затримку процесу апоптозу в інфікованих клітинах, оптимізацію шляху секреції та контроль протеолізу. Іншою цікавою стратегією, яка наближає цю систему експресії до системи на основі клітин ссавців, є визначення тимчасових процедур експресії генів або стабільних трансгенних клітинних ліній з використанням сильних промоторів комах. Таким чином, клітини комах та бакуловіруси є гнучкою платформою експресії, яка підтримує продукцію складних гетерологічних білків. Синтезовані білки приймають конформації, сумісні з утворенням комплексів вищого порядку, що має потенціал для розробки нановакцин.

Прикладом ліцензованих вакцин, отриманих за допомогою бакуловірусів, є вакцина *FluBlok®* (Sanofi Pasteur, США) – протигрипозна рекомбінантна квадριвалентна гемаглютинінова (rHA) вакцина, отримана в культурі клітин комах з використанням бакуловірусної системи експресії. Вакцина являє собою альтернативу існуючій інактивованій протигрипозній вакцині на основі яєць. Як показано авторами, виробничий процес вакцини *FluBlok®* дає можливість для безпечного та швидкого виробництва вакцини. *FluBlok®* не містить яєчного білка або консервантів. Висока чистота антигена дозволяє вводити його у вищих дозах без значного посилення побічних ефектів у людей.

Технологія виробництва бакуловірусів на клітинах комах особливо підходить для лікування грипу, коли потрібне щорічне коригування вакцини. Система експресії «бакуловірус/клітина комахи» зазвичай вважається безпечною виробничою системою з обмеженим потенціалом росту для випадкових агентів. Водночас, як і раніше, ставиться під сумнів безпечно-

сті цього нового клітинного субстрату. Високоочищена білкова вакцина, отримана на клітинах комах, яка вводиться із втричі вищою дозою антигена, ніж класична вакцина, добре переноситься і забезпечує більш сильну імуногенність, тривалу імунну відповідь і приводить до перехресного захисту від дрейфуючих вірусів грипу.

В даний час вивчаються можливості подальшого покращення для подолання обмежень цієї системи експресії, які можуть допомогти закріпити її становище на ринку вакцин.

Клітини ссавців і птахів. До розробки технологій клітинних культур небагато вірусних вакцин на основі цілих частинок вірусу вироблялися в системах тварин, таких як шкіра теляти (віспа), спинний мозок кролика (сказ), мозок миші (японський енцефаліт) або яйця, що містять ембріони (віруси грипу та жовтої лихоманки). В даний час яйця з ембріонами, як і раніше, є основним джерелом звичайних цілісновірусних вакцин, особливо проти сезонного грипу. Однак використання яєць для виробництва вакцин викликає ряд побоювань, пов'язаних з ризиками недостатніх виробничих потужностей, особливо у випадку епідемій та пандемій, тривалими процедурами, збільшенням виробничих витрат та потенційними алергічними реакціями на компоненти яєць. Технологія культивування клітин з'явилася як підхід до подолання обмежень виробництва вакцин на основі яєць, і поступово вона впроваджувалася у виробництво. Розробка вакцини проти поліомієліту в 1954 році Дж. Солком вважається важливою віхою в області вакцинації. З використанням культури клітин були отримані вакцини проти кору, паротиту, краснухи (культивовані на клітинах людини). У культурі клітин легень плоду людини (клітинні лінії WI-38 і MRC-5) можна було вирощувати багато вірусів. Клітинні лінії використовувались для виробництва кількох вірусних вакцин, що ґрунтувалось на зараженні, відновленні цільного вірусу та подальшій атенуації або інактивації: вакцини проти гепатиту А (*Vaqta®*, Merck; *Havrix®*, GlaxoSmithKline), краснухи (*MeruvaxII®*, Merck; *ProQuad®*, Merck), вітряної віспи (*Varivax®*, Merck; *ProQuad®*, Merck), оперізуючого лишая (зостер) (*Zostavax®*, Merck), пероральна вакцина проти аденовірусу типу 4 і тип 7 (*Barr Labs*) та антирабічна вакцина (*Imovax® Polio*, Sanofi Pasteur).

Порівняно з виробництвом вакцин на основі ембріонів яєць, культури клітин ссавців забезпечують меншу тривалість виробництва у більш контрольованих процесах, в яких використовуються біореактори із закри-

тою системою, а також можливість культивування вірусних запасів без значних антигенних змін, що залежать від пасажів яєць.

До недоліків ліній клітин ссавців можна віднести можливість клітинних ліній нести патогени ссавців або їх потенційну канцерогенність. У зв'язку з цим *клітинна лінія Vero* була створена на початку 1960-х років з клітин нирок африканської зеленої мавпи і стала першою лінією, схваленою ВООЗ для виробництва вірусних вакцин для людини відповідно до певних нормативних рекомендацій. Клітини *Vero* вважаються неканцерогенними, якщо проведено не більше певної кількості пасажів, і безпечними для використання як субстрат для вакцин, включаючи вакцини проти японського енцефаліту, ротавірусу, поліомієліту, грипу та віспи. У дослідженні з розробки вакцини-кандидата для COVID-19 на основі вірусоподібних частинок (VLP, від англ. – *virus-like particles*) стабільна VLP-SARS-CoV-2 була отримана з використанням клітинної лінії *Vero E6*.

Крім клітин *Vero*, інші клітинні лінії, такі як яєчник китайського хом'ячка (СНО, від англ. – *chinese hamster ovary*), нирка дитинча хом'ячка (ВНК, від англ. – *baby hamster kidney fibroblasts*), нирка ембріона людини (НЕК, від англ. – *human embryonic kidney*), лінія клітин CAP-T, отримана з амніоцитів людини, та лінія птахів ELL-0 широко використовуються для одержання рекомбінантних VLP.

Клітини СНО – найчастіше використовувана клітинна лінія, мають додаткову перевагу перед іншими клітинними лініями завдяки своєму нелюдському походженню, що запобігає ризику зараження людськими патогенами. Крім того, системи на основі СНО можна вважати більш безпечними та дешевими, ніж, наприклад, системи на основі рекомбінантного лентивірусу (рід вірусів родини ретровіруси), які вимагають більшої біобезпеки. Клітини СНО, які ростуть у суспензії в безсироватковому середовищі, можуть бути використані для отримання рекомбінантних вірусних білків, таких як білки S і PreS2 поверхневого антигена вірусу гепатиту В (HBV), які потім збираються у HBV-подібні частинки. Дійсно, вакцина *GenHevac®B*, яка містить ці вірусні білки, є імуногенною для людини. Антиген глікопротеїну В цитомегаловірусу також стабільно експресується у клітинах СНО, що призвело до розробки рекомбінантної вакцини, яка є імуногенною для людини. Нещодавно компанія *GlaxoSmithKline* (раніше *Novartis Vaccines*) використовувала клітинну лінію СНО для отримання пентамерної молекули, що складається з поверхневих білків цитомегало-

вірусу людини. Пентамер може розпізнаватись моноклональними антитілами та індукувати нейтралізуючі антитіла у мишей, що вказує на його придатність як потенційної вакцини для людей.

Вакцина проти гепатиту В третього покоління, *Sci-B-Vac*®, містить три антигени HBV, включаючи антигени S, Pre-S1 і Pre-S2, і також експресується в клітинах CHO ссавців. Клітини CHO також використовувалися для отримання VLP хантавірусу (рід вірусів людини і тварин з монотипної родини хантавірусів: сферичні віріони розміром 228–5051 нм, покриті ліпідною оболонкою), які підвищують активність CD8⁺ Т-клітин та індукують імунні відповіді антитіл, які можна порівняти з тими, що спостерігаються при використанні інактивованих вакцин. Вакцина *Shingrix*® (табл. 3.4) проти оперізуючого лишая (вірусу герпесу) на основі глікопротеїну Е вірусу вітряної віспи виробляється у клітинах CHO і схвалена для використання людиною.

Інша широко використовувана клітинна лінія ссавців, *клітинна лінія HEK293*, була створена шляхом трансфекції культури клітин первинної ембріональної нирки людини, взятої з абортіваного ембріона, з розщепленою ДНК аденовірусу типу 5 (AD5). Перевагами клітин HEK293 є здатність рости в суспензії в безсироватковому середовищі, придатність для великомасштабної експресії транзійентних (тимчасових) генів, висока трансфекція і стабільна експресія. Два генетичні варіанти були описані для клітинної лінії HEK293: лінія 293Е та лінія 293Т, що експресують антиген EBNA-1 вірусу Епштейна-Барр і великий Т-антиген мавпячого вірусу SV40 відповідно. Як і у випадку з клітинною лінією CHO, що експресує EBNA-1, той факт, що ці генетичні варіанти HEK293 конститутивно експресують вірусні антигени, може створити проблеми для затвердження органами охорони здоров'я. Крім того, онкогенність цієї клітинної лінії все ще залишається проблемою.

Вакцина-кандидат VLP вірусу Ебола (EBOV) була отримана шляхом експресії білка VP40 і глікопротеїну оболонки вірусу в Т-клітинах HEK293. Ці VLP були морфологічно подібні до вірусних частинок дикого типу, мали високу імуногенність в дослідженнях *in vitro* та *in vivo*, а також ефективно індукували дозрівання, активацію та секрецію цитокінів та хемотокінів. Миші, вакциновані VLP-EBOV, показали активацію В-клітин та продукували високі рівні EBOV-специфічних антитіл.

VLP вірусу Ніла (вид вірусів, що спричиняє тяжку хворобу, для якої характерні запалення мозку, енцефаліт або респіраторні прояви), які активували $CD4^+$ та $CD8^+$ Т-клітини та захищали мишей від смертельних наслідків хвороби, можуть утворюватися в клітинах HEK293T, що експресують глікопротеїн прикріплення вірусу (G), глікопротеїн злиття (F) та білок матриксу. Миші, вакциновані такими VLP, продукують специфічні антитіла проти вірусу Ніла та сильну відповідь $CD8^+$ Т-клітин. Нейтралізуючі антитіла також спостерігалися у свиней, вакцинованих VLP вірусу Ніла, але у цих тварин не було виявлено відповідей $CD8^+$ Т-клітин.

VLP, створені з використанням білків інших параміксовірусів, також були розроблені та показали багатообіцяючі результати у початкових доклінічних дослідженнях. Пандемія COVID-19 привела до швидкої розробки аденовірусних векторних вакцин та їх можливого використання в екстрених випадках. Серед аденовірусних векторних вакцин, схвалених ВООЗ для екстреного застосування, – Ad5-nCOV та ChAdOX1-nCoV, які виробляються у клітинах HEK293, тоді як Ad26.COV2-S виробляється у клітинах PER.C6 (клітини сітківки ока ембріона людини).

Що стосується самої системи експресії, рекомбінантні білки можуть бути експресовані тимчасово або стабільно. Клітини ссавців, які конститутивно продукують рекомбінантні білки, створюються шляхом вставки рекомбінантного гена в геном господаря, що є дорогим і трудомістким процесом. Незважаючи на те, що стабільні клітинні лінії на основі клітин СНО широко використовуються для отримання рекомбінантних білків, у синтезі та секреції багатьох складних поліпептидів, існують характерні для них обмеження, такі як низька продуктивність, обмеження росту та нестабільність експресії, низька стійкість до культивування, пов'язані з цим стреси та високі витрати виробництва. Випадкова вставка чужорідного гена в геном господаря може призвести до клональної генотипної мінливості та фенотипної нестабільності (що ставить під загрозу стабільність клітинної лінії, відтворюваність та узгодженість процесу), а також до геномної нестабільності, з часом викликаючи зниження продукції білка. Всі ці факти ускладнюють процедуру та підвищують вартість виробництва.

Таким чином, отримання стабільних клітинних ліній стало очевидною необхідністю з використанням стратегій, що включають генетичну модифікацію, оптимізацію експресійного вектора та розробку процесів. З прогресом у розробці клітинних ліній СНО та оптимізацією процесу вихід

деяких рекомбінантних білків (таких як моноклональні антитіла) досяг 5 г/л, а в окремих випадках навіть більше 10 г/л. Більш швидкі та дешеві підходи до виробництва білка кращі, коли необхідно швидко отримати та оцінити безліч білків (або кілька варіантів одного білка). У цьому контексті *транзйєнтна експресія генів* (TGE, від англ. – *transient gene expression*) є стратегією вибору. TGE має відносно короткий період для збору білка, але зазвичай призводить до низького виходу, оскільки чужорідний ген не інтегрується в геном господаря і, отже, з часом втрачається. Ефективність TGE з використанням клітин НЕК (основна платформа для клітинних ліній людини, що використовується у цьому підході) обмежується низькими рівнями експресії трансгену. Таким чином, транзйєнтні експресійні системи призначені лише для короткострокового використання. Крім того, білки, що тимчасово експресуються, можуть демонструвати гетерогенність за вмістом гліканів, що призводить до невідповідності афінності та ефективності. Ще одним загальним недоліком клітинних ліній людини, таких як НЕК, є їх вразливість до вірусних інфекцій людини. Таким чином, *вірусна інактивація на клітинних лініях людини необхідна*.

Підбиваючи підсумок, варто зазначити, що незважаючи на обмеження, пов'язані з низьким виходом і високою вартістю, культури клітин ссавців є гнучкою і масштабованою платформою, яка може мати свої переваги серед біореакторних клітинних культур, що добре зарекомендували себе, для виробництва вакцин. Поєднання досягнень у галузі клітинних культур, таких як використання середовища без сироватки, суспензійної культури, мікроносіїв для збільшення щільності клітин та покращеної конструкції біореактора, приводить до значного покращення стратегії виробництва нових та більш ефективних вакцин для здоров'я людини та тварин.

Рослинні клітини. Альтернативною платформою для виробництва вакцин є клітини рослин. Рослини як виробник вакцин вперше були запропоновані в 1986 році шляхом введення гена людського гормону росту в рослини тютюну та соняшнику. Різні рослини були модифіковані для експресії рекомбінантних білків, включаючи кукурудзу, тютюн, картоплю, томати і рис. Перша рослинна вакцина була схвалена Міністерством сільськогосподарства США для використання у ветеринарії в 2006 році. Вона складається із субодиничної вакцини проти вірусу хвороби Ньюкасла, отриманої в культивованих клітинах тютюну, яка захищає свійську птицю від зараження вірусом. Запропоновано вакцину-кандидат рослин-

ного походження проти вірусу грипу H1N1 на основі VLP. Отримано близько 10 мільйонів доз рослинної вакцини. Рослинні VLP були успішними у доклінічних випробуваннях та індукували як гуморальну, так і клітинну імунну відповідь у випробуваннях фази I та II на людях, демонструючи задовільний профіль безпечності, та скромні результати у випробуваннях фази III. Останніми роками у клінічних випробуваннях оцінюються кілька вакцин на рослинній основі, розроблених проти гепатиту B, холери, лихоманки Ебола, грипу та інших інфекційних захворювань. Пандемія COVID-19 привернула увагу до вакцин рослинного походження і було проведено три випробування фази III, націлені на SARS-CoV-2. Було отримано обнадійливі результати. Особливо варто зупинитись на вакцині *Covifenz*® виробництва *Medicago* (Канада) та *GlaxoSmithKline*, яка була схвалена для застосування в Канаді (для людей віком від 18 років). Вакцина містить 3,75 мг VLP шиповидного (S) білка SARS-CoV-2 та 0,25 мл ад'юванту ASO3 (DL-альфа-токоферол, сквален, полісорбат 80, фосфатно-сольовий буфер). Для системи експресії використовували австралійську рослину *Nicotina benthamiana* (близький родич тютюну). При імунізації вакцина показує протективні результати.

Загалом *вакцини рослинного походження мають кілька переваг*: виробництво в цій системі, як правило, дешевше, ніж у культурах клітин ссавців, забезпечується відносно подібне укладання, збірка та глікозилювання білків і, на відміну від бактеріальних систем, отримані продукти, вільні від ендотоксинів. Крім того, масштабування виробництва простіше, оскільки воно полягає у простому вирощуванні більшої кількості рослин, а не в оптимізації виробництва в біореакторах, а рослинні вакцини не потребують використання холодового ланцюга для транспортування. Водночас було висловлено деякі побоювання з приводу використання генетично модифікованих рослин. Екологічні ризики, такі як перенесення генів або вплив білків, що використовуються як селекційні маркери, а також небажаний вплив сконструйованих антигенів, є факторами, які слід враховувати при встановленні належного управління культурами.

Іншою альтернативною системою є *використання водоростей* для рекомбінантних білків. Можуть використовуватися різні види, але найперспективнішою платформою мікроводоростей є *Chlamydomonas reinhardtii*, яка вже використовувалася для виробництва кількох білків. У цьому випадку вставка гена часто виконується в хлоропластах, що додат-

ково сприяє накопиченню цільового білка і таким чином полегшує наступні стадії очищення. Як альтернатива ці водорості можна використовувати для введення харчових вакцин сільськогосподарським тваринам, таким як риба та птиця. Для цього їх сушать і готують разом із кормом. Наприклад, вакцина проти малярії, що складається з ліофілізованих водоростей, які продукують поверхневий білок *Plasmodium falciparum*, використовувалася для пероральної імунізації мишей і була здатна викликати вироблення як IgG, так і IgA.

Трансгенні тварини. Трансгенні тварини також досліджувалися як альтернатива виробленню рекомбінантних білків, переважно через можливість отримання більших кількостей складних білків у молоці. У молоці трансгенних кроликів було отримано два білки ротавірусу. Вихід становить до 200 мкг/мл. Ці білки були здатні індукувати антиген-специфічні імунні відповіді, які забезпечували високий рівень захисту від зараження вірусом або при інтраректальному введенні частково очищеного молока, або при пероральному введенні цільного молока мишам. В іншому дослідженні мишей модифікували для вироблення білка ентеровірусу 71 в молоці, а у дитинчат, які отримували трансгенне молоко перорально, вироблялися антиген-специфічні антитіла, і вони продемонстрували кращий стан здоров'я після зараження. Проте в останні роки все менше публікується досліджень, в яких трансгенні тварини використовуються як системи експресії.

Вибір системи експресії залежить від цільового протеїну. Бактерії вигідні для дрібніших білків і пептидів, які не вимагають складного укладання або посттрансляційних модифікацій. Дріжджі можуть продукувати більші та складніші білки, тоді як лінії клітин ссавців вибирають для найбільших білків зі складним укладанням та посттрансляційною модифікацією.

Лінії клітин ссавців вимагають набагато складніших середовищ для вирощування та отримання продукції, ніж інші системи. Середовища-субстрати, тобто амінокислоти, ліпіди, цукри, іони рідкісних металів і т.д., повинні бути обрані та об'єднані в рецептури від постачальників, які суворо контролюють склад, гарантуючи стерильність. Навпаки, мікробні системи можна вирощувати на простіших поживних середовищах. Джерела з відходів скотобоєн та залишків сільськогосподарських культур використовуються для забезпечення багатих на енергію субстратів для клітин.

З появою виробництва рекомбінантних білків у 1970-х роках вихід продукту із бактерій *E. coli* був найвищим, проте зараз це не так. Навіть найскладніші білки, такі як гетеродимерні антитіла, тепер можуть бути отримані в клітинах яєчника китайського хом'ячка (СНО) з концентрацією продукту більше 10 г/л, що еквівалентно тому, що може бути досягнуто в бактеріях або дріжджах. Перевага культур клітин тварин полягає в тому, що необхідний білок може секретуватись клітинами з високою швидкістю. Це приводить до зниження вмісту забруднюючих речовин у продукті. Білки, що утворюються в *E. coli* часто потребують рефолдингу (відновлення вторинної та третинної структури білків) з тілець включення після лізису клітин. Необхідно зазначити, що в даний час існує дві платформи: створення рекомбінантних білків для фармації та створення рекомбінантних білків, що використовуються в промисловості. Останні, як правило, продукуються бактеріями та грибами, а більшість білків для фармації виробляється в культивованих клітинах ссавців, переважно СНО.

Серед молекулярно-біологічних властивостей систем експресії для прокаріотів найбільш важливими є такі:

- ✓ тип промотора та термінатора транскрипції;
- ✓ міцність зв'язування мРНК з рибосомою;
- ✓ кількість копій клонованого гена та його локалізація;
- ✓ кінцева локалізація синтезованого продукту;
- ✓ ефективність трансляції в організмі господаря;
- ✓ стабільність продукту в клітині-господарі.

Для отримання гетерологічних рекомбінантних білків із клонованою еукаріотичною комплементарною ДНК (кДНК) зазвичай використовуються прокаріотичні системи експресії. Однак у деяких випадках еукаріотичні білки, синтезовані у бактеріях, виявляються нестабільними чи біологічно неактивними. Крім того, як би не проводилось ретельне очищення, кінцевий продукт може бути забруднений токсичними речовинами або ендотоксинами. Щоб вирішити ці проблеми, для одержання рекомбінантних білків, призначених для використання в медицині, було розроблено еукаріотичні системи експресії. Ці білки повинні бути ідентичними природним за своїми біохімічними, фізичними та функціональними властивостями. Нездатність прокаріотів синтезувати автентичні варіанти білків обумовлена переважно відсутністю у них адекватних механізмів внесення специфічних посттрансляційних модифікацій.

Білки в клітинах еукаріотів зазнають наступних посттрансляційних змін:

- ✓ утворення дисульфідних зв'язків – цю реакцію каталізує фермент дисульфідізомераза, неправильно укладений білок є нестабільним та неактивним;
- ✓ протеолітичне розщеплення попередника – видалення певної ділянки поліпептидного ланцюга з утворенням функціонально активного білка;
- ✓ глікозилювання – основна модифікація, завдяки якій білки набувають стабільності, а в деяких випадках особливих властивостей. Найбільш поширеною реакцією глікозилювання є приєднання специфічного цукрового залишку до серину або треоніну (О-глікозилювання), або до аспарагіну (N-глікозилювання);
- ✓ модифікації амінокислот у складі білка: фосфолування, ацетилювання, ацилювання, гамма-карбоксилювання, сульфатування, міристоїлювання та пальмітоїлювання.

Для ефективної експресії будь-якого гена необхідно наявність *сильного регульованого промотора*, розташованого перед цим геном. Такий промотор має високу спорідненість до РНК-полімерази, тому послідовності, що прилягають до нього, ефективно транскрибуються. Регульованість промотора дозволяє клітині здійснювати суворий контроль транскрипції. Для експресії клонованих генів широко використовують промотор добре вивченого лактозного оперону *E. coli*. Однак є й інші промотори, що мають корисні для контролю експресії властивості. Для їх ідентифікації перед так званим *геном-репортером*, що кодує продукт, який легко реєструється, але позбавлений промотора, вбудовують випадкові фрагменти ДНК. Якщо в результаті такої вставки ген-репортер ефективно експресується, то роблять висновок, що клонований фрагмент містить функціональний промотор. Більшість генів-репортерів кодують продукти, які зумовлюють стійкість до антибіотиків, або фермент, який ідентифікується за допомогою досить простого колориметричного тесту. Використання генів-репортерів дозволяє проводити моніторинг рекомбінантних векторів, аналізувати активність, наприклад, вірусних промоторів, намічати шляхи регуляції та перемикавання генів, здійснювати кількісну оцінку продуктів експресії. Як гени-репортери використовують: хлорамфеніколацетилтрансферазу, стрептоміцин-фосфотрансферазу, люциферазу світля-

чка, бактеріальну люциферазу, гентаміцин-ацетилтрансферазу та ряд інших.

Таким чином, для отримання білка з повним набором специфічних модифікацій необхідно провести тестування різних еукаріотичних систем експресії та знайти систему, яка б відтворювала біологічно автентичний продукт.

Еукаріотичні експресуючі вектори мають таку ж структуру, що і їх прокаріотичні аналоги, і повинні містити:

- ✓ еукаріотичний селективний маркер;
- ✓ еукаріотичний промотор;
- ✓ відповідні еукаріотичні сайти термінації транскрипції та трансляції;
- ✓ сигнал поліаденілювання мРНК.

Обидві системи та пов'язані з ними генетичні методи демонструють високу універсальність, що робить їх адаптованими до різних виробничих вимог. Незважаючи на вивчення клітин комах як спочатку успішної системи, особливо для білків, орієнтованих на вакцини, клітинні лінії ссавців (насамперед клітини CHO) в даний час є переважною системою клітин тваринного походження через їхню придатність для виробництва відповідних глікозильованих білків. Здатність до посттрансляційних модифікацій контрастує зі складними потребами у харчуванні, повільним ростом та крихкістю рекомбінантних клітин, а також відносно високими термінами та витратами на промислове виробництво. Таким чином, серед багатьох традиційних та нових клітинних систем для виробництва білка лінії клітин бактерій, дріжджів та ссавців є найбільш поширеними в біофармацевтиці, і як прокаріотичні, так і еукаріотичні системи постійно розвиваються та конкурують за покращення своїх властивостей та інтенсифікацію в якості переважної платформи для виробництва білкових препаратів. Хоча бактерії втратили свою провідну на ранніх етапах роль у цій галузі, близько 30 % біофармацевтичних препаратів, які продаються зараз, все ще виробляються в цій системі, що підтверджується незвичайною фізіологічною і здатністю до генетичних маніпуляцій прокаріотичних клітин.

3.2.2. Технологічні принципи отримання рекомбінантних продуктів

Технологія рекомбінантних ДНК – це сукупність експериментальних процедур, що дозволяють здійснювати перенесення генетичного матеріалу (ДНК) з одного організму до іншого. В даний час можна «вирізати» окремі ділянки ДНК, отримувати нуклеотиди на синтезаторах ДНК практично в необмежених кількостях, визначати послідовність нуклеотидів (розділяючи та секвенуючи їх) сотнями на добу, змінювати виділений ген, знову вводити його в геном культивованих клітин або ембріона тварини, де цей змінений ген починає функціонувати.

Конструювання рекомбінантних молекул здійснюється за допомогою низки ферментів – обов'язкового та незамінного інструменту практично всіх етапів цього складного процесу, насамперед ферментів рестрикції (ендонуклеази рестрикції, або рестриктази). *Рестриктази* є складовою системи рестрикції – модифікації прокаріотичних клітин. Ця система пов'язана із захистом клітин від проникнення чужорідної ДНК. Система модифікації здійснює метилювання власної ДНК у сайтах розпізнавання одразу після реплікації. Чужорідну ДНК, яка проникає в клітину, бактерії гідролізують за допомогою рестриктаз.

Розрізняють три основні класи рестриктаз. *Рестриктази класу I* розривають молекули ДНК у довільних точках, *рестриктази I та III класів* мають метилюючу та ендонуклеазну активність. *Ферменти II класу*, які використовуються в генній інженерії, складаються з двох окремих білків: рестрикційної ендонуклеази та модифікуючої метилази. Саме використання рестриктази класу II дозволило проводити молекулярне клонування, оскільки цей фермент розпізнає певні послідовності нуклеотидів у дволанцюговій молекулі ДНК і розщеплює обидва ланцюги.

Сьогодні використовується понад 400 різних рестриктаз. Ці ферменти синтезуються різноманітними мікроорганізмами. Для їх культивування необхідні оптимальні умови (температура, склад та рН середовища, концентрація кисню тощо). З метою підвищення продуктивності та стандартизації процесу отримання цих ферментів клонують гени рестрикуючих ендонуклеаз в *E. coli*.

При молекулярному клонуванні важливо, щоб розщеплення донорної та векторної ДНК відбувалося в певних ділянках (сайтах). Одна з пер-

ших ендонуклеаз рестрикції II типу була виділена з бактерії *E. coli* і отримала назву *EcoRI*. Цей фермент розпізнає ділянку ДНК, що містить специфічну послідовність з шести пар нуклеотидів (рис. 3.1), і вносить розрив між залишками гуаніну та аденіну в кожному ланцюгу, розщеплюючи зв'язок між атомом кисню при 3'-вуглецевому атомі цукрового залишку одного нуклеотиду та фосфатною групою, приєднаною до 5'-вуглецевого атома цукрового залишку сусіднього нуклеотиду. Розриви ланцюга в ДНК розташовуються навскіс один від одного, в результаті чого утворюються одноланцюгові комплементарні кінці з «хвостами» з чотирьох нуклеотидів у кожному («липкі кінці»). Кожен одноланцюговий «хвіст» закінчується 5'-фосфатною групою, а 3'-гідроксильна група протилежного ланцюга ніби «втоплена». Кожен фермент ендонуклеаз рестрикції розпізнає в ДНК специфічну послідовність з 4–6 нуклеотидів. Крім рестриктаз, які розщеплюють нуклеотидний ланцюг з утворенням «липких кінців», існують рестриктази, які вносять розриви в ланцюги суворо один проти одного з утворенням ДНК з «тупими кінцями».

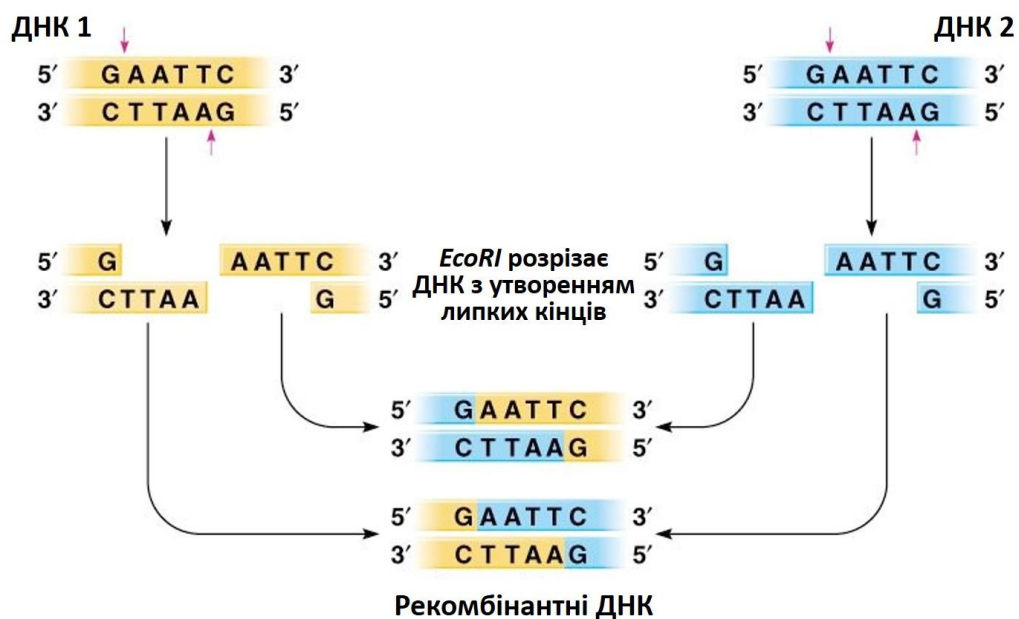


Рисунок 3.1 – Принцип утворення рекомбінантної молекули ДНК за допомогою «липких кінців» рестриктази *EcoRI*

Однак самих ферментів рестрикції при молекулярному клонуванні недостатньо, оскільки водневі зв'язки між тими чотирма азотистими основами, які утворюють «липкі кінці», не такі міцні, щоб утримати два фрагменти ДНК, що об'єдналися. Для усунення розриву в сахарофосфатному

кістяку молекули служить фермент *ДНК-лігаза*, який каталізує утворення фосфодіефірних зв'язків між кінцями полінуклеотидних ланцюгів, які утримуються разом при спарюванні «липких кінців». ДНК-лігаза зшиває і тупі кінці.

Таким чином, одна частина рекомбінантної молекули ДНК несе потрібний ген, який хочуть клонувати, інша містить інформацію, необхідну для реплікації в клітині рекомбінантної ДНК. Крім того, при ДНК-рестрикції утворюються різноманітні фрагменти та після їх лігування (з'єднання фосфодіефірним зв'язком) з векторною ДНК з'являється безліч різних комбінацій фрагментів, наприклад, поєднуються між собою фрагменти донорної ДНК та векторні ДНК. Для зменшення кількості останніх рестриковану векторну ДНК обробляють *лужною фосфатазою* (фермент, який каталізує відщеплення фосфорної кислоти від її обмежених сполук).

Вектори для введення рекомбінантних ДНК. Для введення рекомбінантної ДНК застосовують два основних вектори: плазміди та бактеріофаги.

Плазміди – позакромосомний генетичний елемент, здатний до тривалого автономного існування та реплікації. Зазвичай це дволанцюгова кільцева ДНК. Плазміди є практично у всіх бактерій. Розміри плазмід досягають до 500 т.п.н. Плазміди містять сайти початку реплікації (*ori*), які визначають реплікацію в клітині-господарі, без цих сайтів реплікація була б неможлива. Плазміди можуть бути представлені у клітині 10–100 копіями (висококопійні плазміди) або 1–4 копіями (низькокопійні плазміди). На плазмідну ДНК зазвичай припадає 0,1–5,0 % сумарної клітинної ДНК. Одні плазміди містять інформацію, яка забезпечує їхнє власне перенесення з однієї клітини в іншу (*F-плазміди*), інші несуть гени стійкості до антибіотиків (*R-плазміди*) або специфічні набори генів, відповідальних за утилізацію незвичайних метаболітів (*плазміди деградації*).

Властивості високоефективного плазмідного вектора визначаються такими параметрами:

- невеликий розмір, оскільки ефективність перенесення екзогенної ДНК в *E. coli* значно знижується при довжині плазміди понад 15 т.п.н.;
- наявність унікального сайту рестрикції, в який може бути здійснена вставка;

- наявність одного або більше селективних генетичних маркерів для ідентифікації реципієнтних клітин, що несуть рекомбінантну ДНК.

Плазмідні вектори створюються за допомогою генної інженерії. Одним із перших векторів був створений плазмідний вектор pBR322 (рис. 3.2).

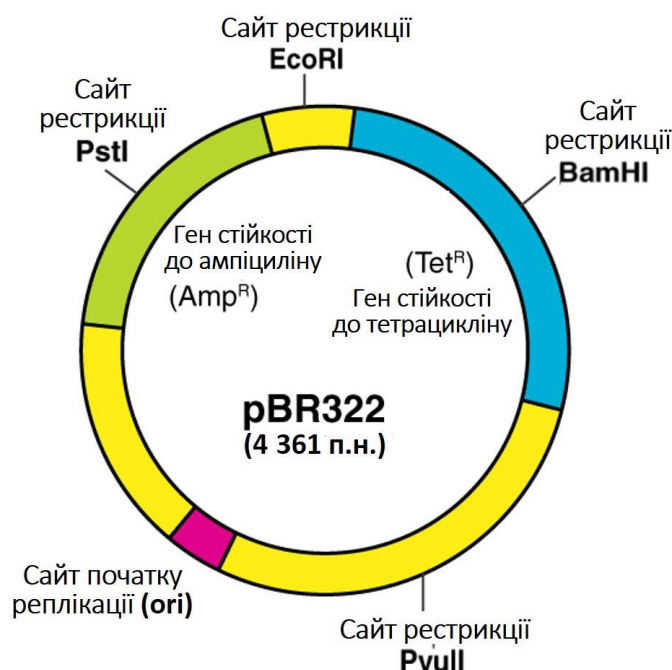


Рисунок 3.2 – Структура плазмідного вектора pBR322

Для ідентифікації трансформованих клітин використовують спеціальні маркери. Як маркери в плазміді може містити гени, які визначають стійкість бактерії до антибіотиків. Вставка чужорідного (донорського) гена в маркерний ген приводить до його інактивації. Це дозволяє відрізнити трансформовані клітини, які отримали векторну плазмідну (та втратили стійкість до антибіотика), від клітин, які отримали рекомбінантну молекулу (зберегли стійкість до одного, але втратили стійкість до іншого антибіотика). Цей прийом називається *інактивацією маркера вставки*. Для відбору трансформованих клітин, що містять рекомбінантну ДНК (гібридну плазмідну) проводять тестування на резистентність до певних антибіотиків. Наприклад, клітини, що несуть гібридну плазмідну, стійкі до ампіциліну, але чутливі до тетрацикліну (в маркерний ген якого і вбудована донорна ДНК).

Процес розділення геномної ДНК на клоновані елементи та введення цих елементів у клітини-господарі називається *створенням геномної бібліотеки (банку клонів, або банку генів)*.

Наступним етапом є процес *трансформації* – введення рекомбінантної ДНК у клітину-господар.

Експресію цільового білка ініціюють шляхом конструювання відповідного вектора нуклеїнової кислоти. Щоб максимізувати ефективність виробництва, вектор експресії та послідовність нуклеїнової кислоти мають бути оптимізовані. Елементи ДНК можуть бути додані до вектора для підвищення стабільності генів і секреції білка. Ефективні промотори та енхансери (від англ. – посилювач; невелика ділянка ДНК, який після зв'язування з ним факторів транскрипції стимулює транскрипцію з основних промоторів гена або групи генів), послідовності для оптимізації кількості копій послідовності нуклеїнової кислоти, коли вона знаходиться в клітині, оптимізація кодонів та репортерні гени допомагають відбирати високопродуктивні клітини. У бактерій вектор послідовності нуклеїнової кислоти, як правило, кодується на плазміді, яку можна підтримувати як епісомальний елемент ДНК. Таким прикладом є виробництво інсуліну людини в *E. coli*, одного з перших рекомбінантних білків, створених для терапії людини. Оскільки плазміди мають тенденцію видалятися з бактеріальних клітин, на цей час перевага надається ДНК, інтегрованим в геном. У клітинах тварин необхідний білок, як правило, кодується хромосомно інтегрованою ДНК. Для перенесення послідовності нуклеїнової кислоти в клітину використовують трансфекції фосфатом кальцію, поліетиленіміном або ліпосомами, а також електрошоком та мікроін'єкцією.

Плазміди вводять в соматичні клітини за допомогою хімічних реагентів, які підвищують проникність клітинної оболонки. Зокрема, щоб забезпечити проникнення в клітини плазмідної ДНК, їх обробляють *крижаним розчином хлориду кальцію*, потім витримують при 42 °C протягом 1,5 хв. Ця обробка призводить до локального руйнування клітинної стінки. Максимальна частота трансформації становить 10^{-3} , тобто на тисячу клітин вілбувається одна трансформація. Частота трансформацій не буває 100 %. Для відбору використовують схеми, що дозволяють ідентифікувати трансформовані клітини.

Ефективним методом трансформації *E. coli* плазмідами є *електропорація* (вплив на клітинні мембрани електричним струмом для збільшення їхньої проникності). Слід зазначити, що електропорація є ефективним і зручним, але досить дорогим на сьогодні методом генетичної трансформації бактерій. Для введення клонованих генів у соматичні клітини також

застосовують мікроін'єкції та мікроуколювання або злиття з клітиною навантажених ДНК мембранних везикул (ліпосом).

Бактеріофаги використовуються як носії генетичної інформації. Рекомбінантний ген вбудовується в геном бактеріофагу і надалі реплікується з генами вірусу при його розмноженні в інфікованій клітині-господарі. З цією метою застосовують бактеріофаг *лямбда-вірус* із дволанцюговою ДНК, яка після проникнення в клітину змикається у кільце. *Бактеріофаг M13* – вірус ниткоподібної форми з кільцевою замкнутою ДНК, яка в клітині перетворюється на дволанцюгову та реплікується у клітинах-нащадках. У пошуках еукаріотичних систем експресії для отримання біологічно активних білків створені *бакміди* – експресуючі вектори на основі бакуловірусів для *E. coli* і клітин комах. Вихід рекомбінантних бакуловірусів у такій системі підвищився до 99 %. Клітини комах, інфіковані бакуловірусами, синтезують гетерологічний білок. Вектори на основі фагів зручні для створення клонів клітин (банку генів), але не для тонких маніпуляцій з фрагментом ДНК. Для детального вивчення та перетворення фрагменти ДНК переклонують у плазміди.

Крім зазначених вище векторів у генній інженерії застосовують *косміди* – плазміди, які несуть *cos*-ділянку (комплементарні липкі кінці) ДНК фага лямбда. Наявність *cos*-ділянки дозволяє проводити упаковку ДНК у головку фага *in vitro*, що забезпечує можливість їхнього введення в клітину шляхом інфекції, а не трансформації.

Фазміди – це гібриди між фагами та плазмідами. Вони здатні розвиватися і як фаг, і як плазміда. Поступаючись космідам по клонуєчій ємності, фазміди дають можливість відмовитися від переклонування генів з фагових в плазмідні вектори.

Методологія одержання рекомбінантних продуктів. Для отримання будь-якого білкового продукту, включаючи антигени, необхідно забезпечити транскрипцію кодуючого гена і трансляцію відповідної мРНК. Для ініціації транскрипції (синтезу РНК) у потрібному сайті необхідний промотор, для зупинки – термінуючий кодон.

Методика клонування включає такі біотехнологічні етапи:

1. Рестриктазне розщеплення необхідних генів нативної ДНК (клонувана ДНК, вбудована ДНК, ДНК-мішень, чужорідна ДНК) з організма-донора;

2. Швидка розшифровка всіх нуклеотидів в очищеному фрагменті ДНК, що дозволяє визначити точні межі гена та амінокислотну послідовність, яка кодується цим геном;

3. Обробка ендонуклеазами рестрикції вектора для клонування, який може реплікуватися в клітині-господарі;

4. Зшивання ДНК-лігазою двох фрагментів ДНК з утворенням нової рекомбінантної молекули – конструкція «клонуючий вектор – вбудована ДНК»;

5. Введення цієї конструкції в клітину-господаря (реципієнта), де вона реплікується та передається нащадкам. Цей процес називається *трансформацією*. Після трансформації бактеріальна клітина відтворює фрагмент клонованої ДНК мільйонами ідентичних клітин;

6. Ідентифікація та відбір клітин, які несуть рекомбінантну ДНК (*трансформовані клітини*);

7. Отримання специфічного білкового продукту, синтезованого клітинами-господарями на відповідних середовищах. Для виробництва фармацевтичних білків необхідно, щоб культури клітин тварин вирощувалися в середовищах з визначеним хімічним складом (повна відсутність матеріалів людського або тваринного походження, які можуть сприяти росту патогенів), для отримання рекомбінантних білків для промисловості ці обмеження відсутні. Крім того, необхідно враховувати, що середовища для культур клітин тварин значно дорожчі, ніж середовища для культур бактерій чи грибів. Для культивування використовують біореактори різного об'єму. Розмір біореакторів варіює від кількох мілілітрів до десятків тисяч літрів. Наприклад, для отримання моноклонального антитіла «Адалімумаб», що виробляється на клітинах СНО, використовуються біореактори об'ємом 10 000 літрів і більше. Тоді як для деяких білків, таких як антигени вакцин або фактор зсідання крові VIII, потрібно кілька мкг на дозу. Тобто ці білки необхідні для виробництва готових препаратів у кількості кількох кілограм на весь світ. У зв'язку з цим для їх виробництва використовуються біореактори об'ємом 50–500 літрів.

8. Очищення специфічного білкового продукту з використанням методів білкової хімії: різні види центрифугування та фільтрації, хроматографічні методи (афінна, ексклюзійна, іонно-обмінна та ін.), осадження та ін.

9. Формування готового препарату зі специфічним білковим продуктом, стандартизація та контроль продукту. Кожен крок у виробництві фармацевтичного рекомбінантного білка суворо регламентований. Ініціатива щодо подальшого покращення якості та відтворюваності білка просувається та підтримується регулюючими органами. Підхід «якість за дизайном» (*Quality by Design*) намагається зрозуміти кожен крок і кожен інгредієнт, що входить до складу виробництва на шляху до отримання рекомбінантного білка.

10. Доклінічні дослідження на різних тваринних моделях.

11. Клінічні фази досліджень на людях.

12. Реєстрація препарату та його виробництво.

Таким чином, технологія рекомбінантних ДНК включає цілий набір процедур, завдяки яким вдається клонувати фрагменти ДНК, які містять специфічні гени. Для відбору клітин, які містять рекомбінантну ДНК використовують спеціальні прийоми. Щоб зменшити кількість кільцевих плазмідних молекул, що утворюються при зшиванні фрагментів ДНК-лігазою Т4, рестриковану плазмідну ДНК обробляють лужною фосфатазою, що видаляє 5'-кінцеві фосфатні групи. Для відбору трансформованих клітин, що містять гібридні плазміди проводять: 1) тестування на резистентність до певних антибіотиків або колориметричну реакцію; 2) імунологічні тести або виявлення специфічного білка – продукту клонованого гена; 3) гібридизацію із зондом, комплементарним будь-якій ділянці цільового гена. Щоб мати можливість клонувати цілий ген, донорську ДНК розщеплюють лише частково. При цьому утворюються фрагменти різної довжини, з яких надалі створюють геномну бібліотеку. Для клонування великих фрагментів ДНК були сконструйовані вектори на основі бактеріофагів лямбда і M13, а також F-плазміди. Для отримання фрагментів ДНК, що кодують еукаріотичні білки, на очищеній мРНК як на матриці синтезують ланцюг комплементарної ДНК за допомогою зворотної транскриптази; цей ланцюг у свою чергу використовується як матриця для синтезу другого ланцюга. Після ферментативної обробки цю дволанцюгову комплементарну ДНК вбудовують у вектор. Незалежно від того, яка саме стратегія клонування використовується, після ідентифікації клонованої послідовності необхідно показати, що вона є нативним структурним геном.

3.2.3. Рекомбінантні вакцини

Технологія рекомбінантних ДНК максимально використовується у фармацевтиці та медицині. Серед досягнень останніх років – створення низки вакцин, зокрема проти вірусу SARS-CoV-2. Рекомбінантна технологія використовується для отримання ряду вакцин, а також для лікування багатьох захворювань людини шляхом заміни старих пошкоджених генів новими. Розширюється використання у клініці рекомбінантних терапевтичних білків та вакцин, очікується, що ринок цих продуктів зростатиме у найближчі роки. Спостерігається збільшення попиту на різні продукти, зокрема і вакцини, створені з допомогою генної інженерії для клінічних цілей. Ринок генно-інженерних вакцин величезний. Крім використання цієї технології в медичному сегменті, передбачається, що сегмент сільськогосподарських культур також матиме значну частку найближчим часом. Генна інженерія використовується для отримання рекомбінантних вакцин для ветеринарної медицини. Очікується, що незабаром через збільшення досліджень і розробок, пов'язаних з ефективною експресією білка, ринок зростатиме. Максимально використовуються бактеріальні системи експресії, системи комах та ссавців. В останні роки також було проведено велику кількість досліджень щодо використання рослин як системи експресії.

У наступних розділах описані вакцини на основі рекомбінантної ДНК: проти папіломавірусу людини, на основі HBsAg, проти малярії, COVID-19 і ряд інших препаратів. У таблиці 3.4 наведено основні рекомбінантні вакцини, з технологією отримання яких ми зустрінемося на сторінках цього підручника.

Таблиця 3.4 – Рекомбінантні вакцинні препарати

Збудник інфекції	Антиген	Назва вакцини, рік ліцензування	Система експресії	Форма
Вірус гепатиту В	HBsAg	<i>Engerix-B, Twinrix, Hepelisav-B</i> ; 1986	Дріжджі <i>S. cerevisiae</i>	VLP
Папіломавірус	L1- капсульний белок	<i>Gardasil-9</i> , 2006	Дріжджі <i>H. polymorfa</i>	VLP
		<i>Cervarix</i> , 2009	Клітини комах BVES	

Закінчення табл. 3.4

Збудник інфекції	Антиген	Назва вакцини, рік ліцензування	Система експресії	Форма
Вірус гепатиту Е	ORF-2-білок	<i>Hecolin</i> , 2012	<i>E. coli</i>	VLP
Вірус грипу А і В	Гемаглютинін	<i>Flublok</i> , <i>Flublok RIV4</i> , 2013	Клітини комах BVES	Наночастинки, без ад'юванта
Менінгокок серотип В	Варіант 2FНbp	<i>Trumenba</i> , 2014	<i>E. coli</i>	Без ад'юванта
Малярія	HBsAg + RTS (химера)	<i>Mosquirix</i> , 2016	Дріжджі <i>S. cerevisiae</i>	VLP
Вірус герпес зостер	Усічений gE	<i>Shingrix</i> , 2017	Клітини CHO	Ад'ювант
Коронавірус SARS-Cov-2	Спайковий білок S	<i>Nuvaxovid</i> , 2021	Клітини комах BVES	Наночастинки

Примітка. VLP – вірусоподібні частинки; BVES – бакуловіруси клітин комах; CHO – клітини яєчника китайського хом'ячка.

Як видно з таблиці 3.4, для отримання рекомбінантних вакцин, використовують ряд систем експресії: бактерії – *E. coli*, дріжджі – *S. cerevisiae* та *H. polymorpha*, бакуловіруси, клітини ссавців – CHO.

Кількість продуктів, отримана на основі рекомбінантних технологій, сягає понад 600. У 2022 році прогнозовані дані зростання продуктів на основі рекомбінантних ДНК та генної інженерії були такими: обсяг ринку рекомбінантних продуктів у 2022 р. становив 725,14 млрд доларів США, розмір ринку до 2030 р. становитиме 1079 мільярдів доларів із середньорічним темпом росту рекомбінантних фармацевтичних продуктів – 5 %.

3.3. Рослинні вакцини

Вакцини рослинного походження – це препарати на основі трансгенних рослин, в геном яких був вбудований відповідний фрагмент геному патогенного мікроорганізму.

За останні три десятиліття біотехнологія рослин досягла значного прогресу у виробництві економічно цінних та біологічно активних гетерологічних білків. Велика кількість імунобіологічних препаратів, таких як моноклональні антитіла, реагенти для діагностики, вірусні антигени, які використовуються як компоненти вакцин для людини і тварин, були отримані на рослинах. Різні види рослин, зокрема тютюн, помідори, соя, картопля, рис, кукурудза, морква, були досліджені як потенційні «біофабрики» для виробництва вакцин і засобів пероральної доставки. Серед вірусів, в яких експресували малі білкові антигени або повні білки, – вірус папіломи людини, віруси Денге, Зіка, гепатиту В, сказу, хвороби Ньюкасла, грипу. У порівнянні зі звичайними системами експресії, такими як бактерії та клітини ссавців, рослини мають унікальні властивості. Для вірусних білків правильна укладка є дуже важливою для підтримки антигенної конформації епітопів та збереження їхньої здатності індукувати імунну відповідь. Бактеріальні системи експресії обмежені у процесингу білків і позбавлені здатності ссавців до N та O-глікозилювання. Як наслідок, часто неможливо досягти належного фолдингу (згортання білка в характерна для нього тривимірну структуру для набуття біологічної активності) білка. Рослини, з іншого боку, поєднують у собі характеристики вищих еукаріотичних клітин та здатні до належних посттрансляційних модифікацій та ефективного фолдингу білків. До того ж таке виробництво легко масштабується і є безпечним, оскільки клітини рослин не інфіковані людськими патогенами, такими як віруси, і не містять небажаних біологічних забруднювачів, таких як ендотоксини або пріони. Крім того, виробництво на основі рослин забезпечує нижчі виробничі витрати у порівнянні з клітинами ссавців.

Вакцини рослинного походження отримують із застосуванням рекомбінантних технологій, при цьому ген, який кодує необхідний антигенний білок, інтегрується в рослину за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*, яка використовується для перенесення генів. За останні 30 років було розроблено методи генетичної трансформації рослин для отримання гетерологічних білків у рослинних клітинах. Спочатку рослини були генетично сконструйовані за допомогою ядерної трансформації, а потім почали застосовувати метод трансформації хлоропластів за допомогою біолістичного методу. Стабільна ядерна трансформація здійснюється агробактеріями. У цьому методі ДНК, що містить транскрипційну одиницю (промотор-

ген(антиген)-термінатор) для експресії білка, клонують у бінарну плазмиду, зазвичай pBI121 та pCambia. Потім плазмиду, що містить транскрипційну одиницю антигена, вводять у *Agrobacterium tumefaciens* зазвичай за допомогою електропорації. Агробактерії, які містять плазмиду, спільно культивують з фрагментами листя або стебел рослин з подальшою повною регенерацією трансгенних рослин за допомогою процесів органогенезу або ембріогенезу.

Розглядаючи це питання, необхідно зупинитися на одному з перших методів генетичної модифікації – *трансформації хлоропластів*. Трансформація хлоропластів спочатку була досягнута за допомогою біолістичних процедур, де мікрочастинки золота або вольфраму (до 10 мкм) покриваються генетичним матеріалом (ДНК), що містить мінімальні одиниці експресії генів, вводяться за допомогою генної гармати в клітини-мішені для трансформації. Опинившись в клітині, молекула ДНК може бути інтегрована в геном хлоропластів за допомогою механізмів рекомбінації ДНК.

Як при агробактеріальному методі трансформації рослин, так і при біолістичному методі цільовий ген і пов'язані з ним послідовності вводяться в рослинну клітину та стабільно інтегруються в рослинний геном. З цієї клітини згодом утворюється ціла повноцінно функціонуюча рослина з необхідними властивостями.

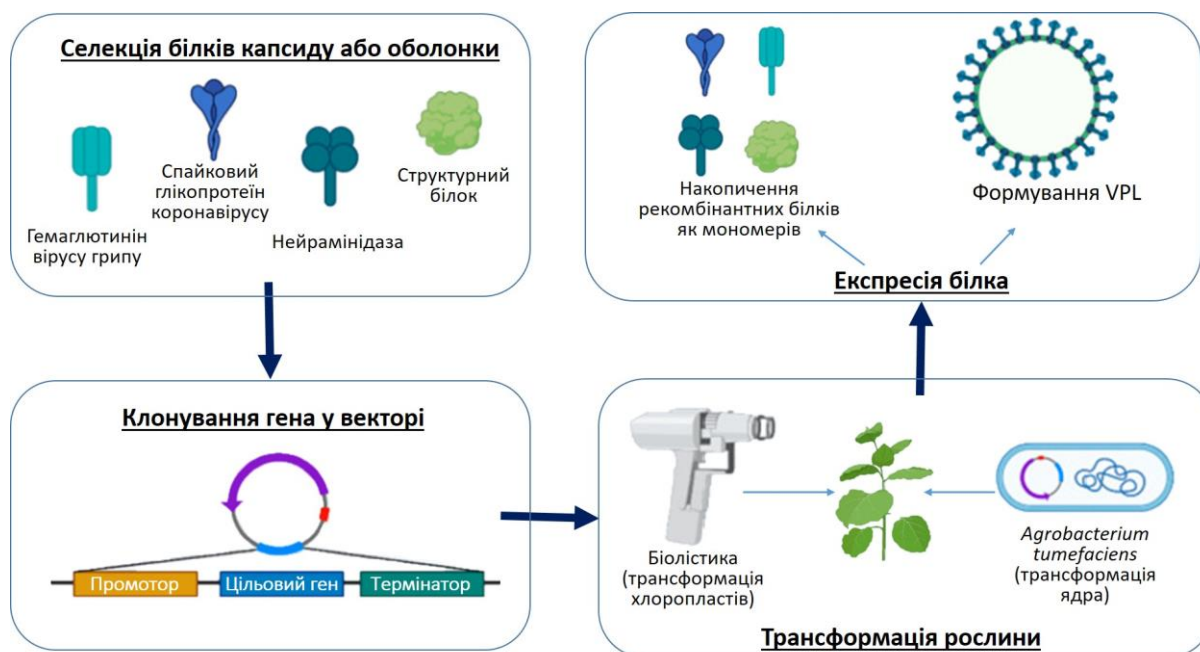


Рисунок 3.3 – Стратегія розробки та виробництва субодиничних вакцин з використанням рослин як біофабрик для експресії повного антигенного вірусного білка (зазвичай поверхневих білків)

Перспективним є метод, який дозволяє використовувати *вірусоподібні частинки* (VLP) у рослинах як *субодиничні вакцини*. Субодиничні вакцини отримують у результаті рекомбінації ДНК та генної інженерії, які дають можливість специфічно вибирати один або кілька імунозахисних антигенів та продукувати їх в іншому організмі. Субодиничні вакцини, як правило, мають низьку імуногенність, що вимагає використання ад'ювантів, вищих доз при введенні або ревакцинації. VLP є моделлю субодиничної вакцини, що має більшу імуногенність, ніж тривимірне формування індивідуальних антигенних білків. VLP – це набір повторюваних структурних вірусних білків, здатних збиратися у частинки розмірами від 20 до 150 нм. Розмір 40 нм вважається оптимальним для розпізнавання дендритними клітинами. VLP також вважаються більш безпечними препаратами, ніж вакцини з убитими або інактивованими патогенами, оскільки в них відсутній генетичний матеріал.

Перша така вакцина отримана у 1992 році. Трансгенна рослина тютюну стала продукувати «Австралійський антиген» (HBsAg) – поверхневий антиген вірусу гепатиту В. Отриманий з рослин і частково очищений антиген при введенні мишам викликає імунну відповідь подібну до вакцинації проти гепатиту В. У 1998 році за допомогою картоплі, що продукувала В-субодиницю холерного антигена, було отримано захист у мишей при зараженні збудником холери. Аналогічна вакцина була отримана на тютюні, що продукує антигени вірусу кору. Проведено роботи з одержання вакцини проти сказу на помідорах. На даний момент бульби картоплі трансгенних сортів, які експресують бактеріальні токсини та антигени гепатиту В (рівень антитіл при використанні картоплі перевищив рівень захисного титру у людей – 10 МО/мл) та вірусу Норфолка у сирому вигляді, що являють собою *їстівні вакцини*, успішно пройшли I фазу клінічних випробувань. Вакцину проти вірусу Норфолка, отриману на трансгенному картоплі, було вивчено на 20 добровольцях, 19 з яких (95 %) показали високий рівень імунної відповіді. Розпочато роботи зі створення вакцин проти туберкульозу в листях салату. Проводяться дослідження, спрямовані на створення їстівних рослинних вакцин проти СНІДу та гепатиту В. Авторами отримано химерний ген, який вбудований у плазмиду *E. coli*. Після перевірки можливості виробництва даного химерного білка була підключена бактерія *Agrobacterium tumefaciens* (в неї заздалегідь була впроваджена плазміда), якою були заражені проростки томатів італійського се-

лекційного сорту «Вентура», що відрізняються високим вмістом білка. Химерний ген вбудовувався в геном рослини, і починалося продукування потрібного білкового антигена. Отриманий з сублімованих томатів порошок розчиняли у воді і згодовували мишам. Через певний час у крові тварин виявлялися антитіла проти антигенів гепатиту В та СНІДу. Обнадійливі результати були отримані під час створення вакцини проти кору на трансгенних рослинах. Мишей годували листям тютюну з гемаглютиніном вірусу кору штаму Едмонтон, титри антитіл перевищили захисний титр у 5 разів. Наступним етапом було вивчення таких вакцин на приматах. Трансгенний рис, салат та дитяче харчування проти кору знаходяться на стадії розробки.

Застосування їстівних вакцин рослинного походження значно полегшує процеси виробництва препаратів та їх доставки в організм. Враховуючи, що більшість патогенів потрапляє в організм через слизові оболонки, створення та підтримання повноцінного місцевого імунітету слизових оболонок має забезпечити захист людини від більшості інфекційних захворювань. Особливо привабливим виглядає пероральне застосування рослинних вакцин, оскільки це дозволить уникнути використання ін'єкційних процедур. Крім того, рослинні вакцини не містять тваринних білків та патогенів тваринного походження. Трансгенні рослини, такі як картопля, томати, банани, до складу яких входять необхідні для вакцинації антигени, можна вирощувати в промислових масштабах, і при цьому не потрібно створення дорогих технологічних процесів і унікального обладнання. Одним із критеріїв прийнятності є їстівність плодів рослин у сирому вигляді, що дозволить уникнути втрати антигенної активності при термічній обробці рослин.

Розробка трансгенних рослин, які експресують та накопичують певні антигени, сприяють використанню цих продуктів як рослинних вакцин. Використання системи доставки на рослинній основі привертає свою увагу завдяки своїй практичності, безпечності, імуногенності та низькій ціні кінцевого продукту. Як кандидати для створення рослинних (їстівних) вакцин запропоновані морква, рис, томати, тютюн, картопля, соя та ін. У складі вакцин використовуються різні антигени: холерний токсин, токсин *Yersinia pestis*, антигени *Salmonella*, антигени вірусу гепатиту В, поліомієліту, ротавірусів та ін. Серед різних рослин-кандидатів виділяється рис, який може бути найбільш підходящою рослиною, оскільки зерна рису, особли-

во білкове тіло, стійкі до розщеплення у кислому середовищі шлунку, що дозволяє стабільно та ефективно доставляти антигени до імунної системи кишечника. Крім того, експресований білок в насінні рису стабільний при зберіганні при кімнатній температурі, що в свою чергу не вимагає дотримання холодового ланцюга. Наприклад, вакцина на основі рису Mucorice-CTB, яка містить рекомбінантний білок холерного токсину – CTB, стабільна при кімнатній температурі протягом 3 років. Закінчена I фаза клінічних досліджень цієї вакцини. Насіння може бути особливо привабливим об'єктом через його стабільність при тривалому зберіганні у порівнянні з іншим рослинним матеріалом. Пероральний прийом рослинної вакцини Mucorice-CTB індукує утворення нейтралізуючих антитіл проти діарейного токсину. Застосування цієї вакцини є достатньо зручним: рис подрібнювали до дрібнодисперсного порошку, 1 г якого суспендували в 10 мл фосфатного сольового буфера. Під час випробування у здорових чоловіків (20–40 років) виявляються CTB-специфічні антитіла (IgG та IgA). Показано безпечність та імуногенність вакцини Mucorice-CTB.

За останні кілька років було досягнуто значних успіхів у розробці та клінічному використанні вакцин рослинного походження. Наприклад, вакцина, що містить антиген D поліовірусу PV3. Як рослину-господар використовували *Nicotiana benthamiana*. Проведено транз'єнтну експресію з подальшою трансформацією *Agrobacterium tumefaciens*. Отримано досить високий вихід – до 60 мг з 1 л інфільтрованої рослинної тканини. Очищеним антигеном (у формі VLP) імунізували мишей внутрішньочеревно, а потім заражали тварин поліовірусом. В результаті введення вакцини ініціювалися захисні рівні вірус-нейтралізуючих антитіл, що забезпечувало захист від вірусної інфекції.

У таблиці 3.5 наведено дані розробки рослинних вакцин станом на сьогоднішній день.

Таблиця 3.5 – Список розроблених рослинних вакцин для людини

Патоген, рік повідомлення	Тип вакцини	Антиген	Рослина-господар	Результати на тваринах
Вірус гепатиту В, 2019	VLP	HBsAg	<i>Nicotiana benthamiana</i> , <i>Lactuca sativa</i>	Стимулювання імунної відповіді Th-I Th-II типу при оральній імунізації мишей листям салату

Закінчення табл. 3.5

Патоген, рік	Тип вакцини	Антиген	Рослина-господар	Результати на тваринах
Вірус папілом илюдини, 2019	Химерні VLP	HPV- 16L1-L2	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Захисний титр антитіл і перехресний захист від HPV-58 і HPV-18 при стимуляції мишей антигеном 16L1-L2
Поліовірус, 2020	Субодини-чна	Віруси поліомієліту різних типів	<i>Nicotiana tabacum</i>	Стимулювання імунної відповіді у мишей ральною ліофілізованою вакциною
Вірус Зіка, 2020	Рекомбінантний імуностимулюючий комплекс	Вірус Зіка, моноклональне анти-тіло кон'юговане з антигеном	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Високі титри нейтралізуючих антитіл у мишей, імунізованих орально
Вірус сказу, 2021	Субодини-чна	Білок RG-2	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Високі титри нейтралізуючих антитіл
Малярія, 2021.	VLP	Білок pfs	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Сильна гуморальна імунна відповідь у мишей
Коронавірус SARS-CoV-2, 2021	VLP	CoV-RBD121	<i>Nicotiana benthamiana</i>	У мишей виявлені нейтралізуючі антитіла, отримано дозвіл на проведення I фази клінічних випробувань
Вірус сибірської виразки, 2022	Субодини-чна	PP-PA83	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Сильна імунна відповідь у мишей (утворення нейтралізуючих антитіл); захист від зараження сибірською виразкою у кроликів; отримано дозвіл на використання вакцини особам старше 18 років

У лютому 2022 року Міністерством охорони здоров'я Канади дозволено використання вакцини для профілактики COVID-19 у дорослих від 18 до 64 років під назвою COVLP (торгова назва COVIFENZ). Отримана на рослині *N. benthamiana*.

Як альтернатива пропонується трансформація хлоропластів, оскільки вона дозволяє білкам утворюватися і накопичуватися в субклітинному компартменті. До недоліків цього метода можна віднести низьку ефективність глікозилювання. Глікозилювання рослинних білків є важливим аспектом цієї системи. Хоча цей процес і відбувається у рослинах, проте глікани рослин трохи відрізняються від гліканів людини, що в свою чергу може призводити до підвищеної імуногенності та посилювати дію субодиничних вакцин. Однак, підвищена імуногенність може обмежувати застосування терапевтичних білків. Конфігурація рослинних полісахаридів може діяти як природний ад'ювант, оскільки вони зв'язуються з рецепторами, які експресуються антиген-презентуючими клітинами, що посилює презентацію антигена цим клітинам. У відповідь на побоювання з приводу алергій та імунних реакцій, викликаних системою глікозилювання рослин, було розроблено кілька стратегій їх модифікації, щоб вони були більш схожими на людські, переважно з акцентом на модифікації шляхів N-глікозилювання або сіалювання.

Незважаючи на інтенсивність розвитку науки в галузі отримання рослинних вакцин, для їх практичного використання доведеться відповісти на ряд суттєвих питань:

- ❖ можливість збереження антигенів у кислому середовищі шлунка;
- ❖ здатність витримувати зберігання та вивчення температурних режимів;
- ❖ детальне вивчення можливості розвитку імунологічної толерантності слизової оболонки ротової порожнини при вживанні їстівних вакцин;
- ❖ розробка протоколів прийому рослинних вакцин;
- ❖ дослідження та підбір ад'ювантів, які підвищують ефективність таких вакцин;
- ❖ підбір оптимального методу введення генного матеріалу: за допомогою генних гармат при бомбардуванні ембріональних клітинних культур рослин або за допомогою бактерії *Agrobacterium tumefaciens* для доставки в генوم рослин плазмиди з вбудованою ДНК.

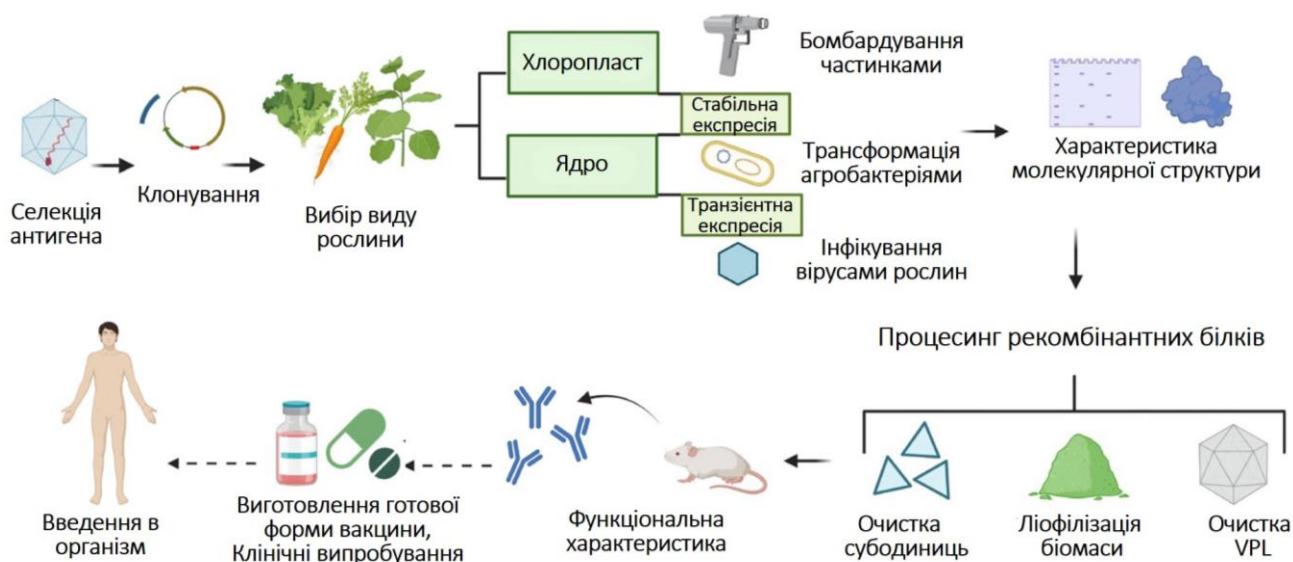


Рисунок 3.4 – Підходи біотехнології рослин для виробництва поліовірусної вакцини (нездійснені кроки на шляху до рослинної вакцини проти поліомієліту позначені пунктирними стрілками)

Сьогодні ми можемо класифікувати рослинні вакцини на наночастки на основі вірусів, рекомбінантні імунні комплекси та субодиничні вакцини.

Таким чином, вакцини з використанням трансгенних рослин (картоплі, рису, томатів, салату, листя тютюну) дають надію на створення в найближчому майбутньому ефективних препаратів проти гепатиту В, ВІЛ, сибірки, вірусу папіломи, холери, кору та інших інфекційних захворювань.

3.4. ДНК-вакцини. Вірусна та бактеріальна доставка

Новий підхід, що дозволяє індукувати в організмі імунну відповідь без введення антигена, ґрунтується на включенні в клітини-мішені тварини гена, який кодує білок-антиген, привів до появи нового типу вакцин – *ДНК-вакцин*. Виявлено, що фрагменти ДНК вірусів та бактерій, імплантовані у клітини тварин, здатні синтезувати власні білки. Самі клітини, які отримали гени іншого організму, починають виробляти антитіла у відповідь на ці синтезовані білки. Експерименти зі створення ДНК-вакцин ведуться переважно з бактеріальними плазмідами – невеликими стабільними позахромосомними кільцевими ДНК. Перевагою плазмід є те, що самі собою вони не провокують розвиток інфекції. Їх використовують як вектор –

спосіб доставки. Для того, щоб викликати необхідну імунну відповідь, виділені з бактерій плазмиди модифікують, вносячи певні зміни до структури ДНК, а саме «вшивають» гени, які кодують один або кілька певних білків-антигенів, що виробляються конкретними вірусами або бактеріями. Також вбудовуються в плазмиду гени, необхідні для забезпечення експресії всієї конструкції. Дуже важливо, що *фрагменти ДНК, відповідальні за відтворення та розвиток інфекційного процесу, у плазмиди не вводяться*.

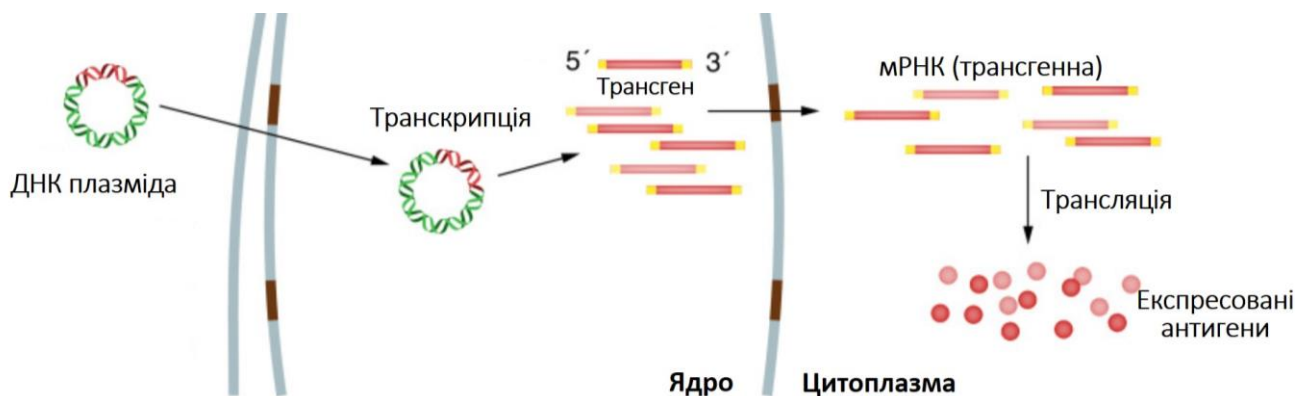


Рисунок 3.5 – Експресія антигена ДНК-вакцинами: ДНК-плазмід, що кодує трансген (антиген вакцини), переміщується в ядро, де відбувається транскрипція в мРНК, отримані мРНК доставляються в цитоплазму для забезпечення ефективної трансляції антигена вакцини

Однією зі стратегій було внутрішньом'язове введення розчину ДНК, що кодує вакцинний антиген. Клітини поглинають плазмідну ДНК, транскрибують її та синтезують антиген, який може проходити таку ж обробку, як і в процесі вірусної інфекції. *Перевагами використання ДНК є відносна технічна простота виготовлення (рис. 3.6) та можливість спрямовувати синтез численних копій мРНК туди, де очікується посилення як синтезу антигена, так і імунної реакції*. Такі вакцини показали свою ефективність на багатьох тваринних моделях інфекції, особливо вірусних моделях. У пошуках нового шляху доставки ДНК без оболонки наносили на шкіру мишей, звідки вона поглиналася волосяними фолікулами з метою стимуляції імунної відповіді. Хоча ДНК без оболонки і має стимулюючий вплив щодо вироблення специфічних антитіл, вона особливо ефективно стимулює клітинні імунні реакції.

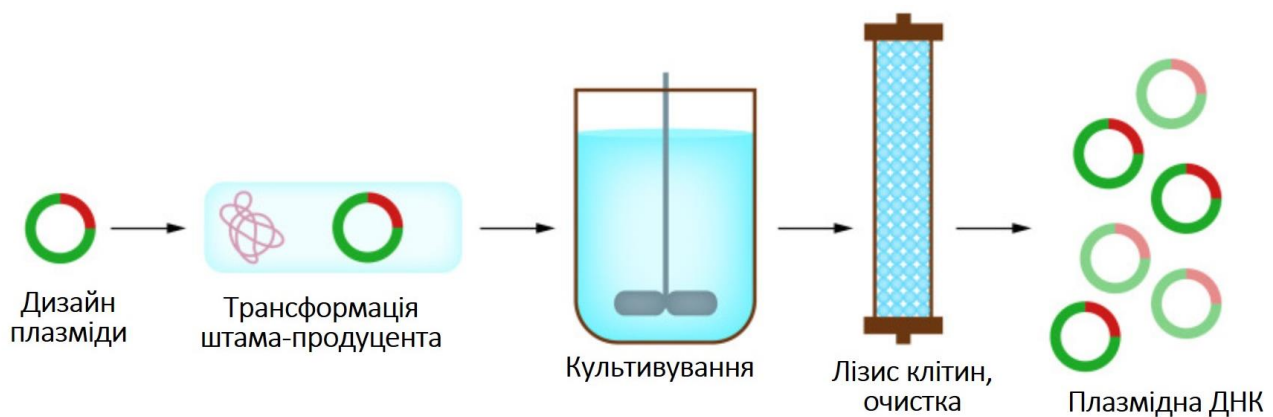


Рисунок 3.6 – Виробництво плазмідної ДНК: сконструйована плазмід, що містить цільовий ген, трансформується в бактерію-господар для створення ГМО; після ферментації бактеріальні клітини збирають і лізують хімічними, фізичними або механічними методами; після видалення твердих частинок з лізату (освітлення) для плазмідної ДНК використовуються кілька етапів очищення (наприклад, хроматографія)

Окремо потрібно зупинитися на *вірусній доставці ДНК-вакцин*. Всі вищезгадані вакцини на основі нуклеїнових кислот призводять до введення плазмід в клітину. З метою доставки ДНК за допомогою вірусу віспи свійської птиці експресійна касета рекомбінантного білка інтегрується у вірусний геном. Ці пташині поксвіруси (родина ДНК-вмісних вірусів) можуть інфікувати клітини ссавців (людини), але не можуть продукувати інфекційний вірус, отже, цей підхід можна вважати заснованим на нуклеїнових кислотах. Цього єдиного циклу самообмежуючої інфекції може бути достатньо для стимуляції широкого імунітету проти патогенного організму, рекомбінантний поліпептид якого експресується цими пташиними поксвірусами в інфікованих клітинах, тоді як реактогенність повинна бути мінімальною, враховуючи нездатність вірусу поширюватися. Одним із варіантів конструкції експресійної плазмід є застосування системи експресії ДНК на основі вірусу, який може підвищувати рівень РНК та білкової експресії, що відбувається при живій вірусній інфекції, як було розроблено для вірусних векторів *Sindbis*.

Використання векторів для конструювання та виробництва вірусоподібних частинок в якості вакцин є дуже перспективним. Аденовіруси багато років використовуються як інструмент у модельних дослідженнях з генотерапії. В останні роки переваги векторів на основі аденовірусів привертають увагу фахівців у галузі конструювання рекомбінантних вакцин. Особливо цінною є висока продуктивність аденовірусів, висока ефектив-

ність перенесення генів та експресії. У низці досліджень аденовірусні вектори використовують для експресії індивідуальних вірусних антигенів і, зокрема, гемаглютининів вірусів грипу. Серйозним недоліком цих векторів є наявність у популяції людей популяційного імунітету, що призводить до швидкого обмеження експресії цільових антигенів. Від 15 до 25 % популяції людей в епідемічні періоди страждають на аденовірусну інфекцію. Найсильнішим антигеном серед білків аденовірусу є гексон (віріони вірусу мають форма ікосаедра діаметром 70–90 нм, що складається з 252 капсомерів діаметром 7–9 нм, з них 240 капсомерів утворюють 20 різносторонніх трикутників, кожен має по 6 сусідніх капсомерів і тому називається гексоном), антитіла до якого виявляються у більш ніж 75 % здорових людей. У зв'язку з цим, при плануванні робіт з використання таких векторів слід враховувати їхню популяційну сприйнятливність.

Вектори на основі α -вірусів – відносно новий інструмент для конструювання рекомбінантних вакцин. Вірус венесуельського енцефаломієліту коней, вибірково патогенний для коней, належить до привабливих об'єктів вірусологів. Фундаментальні проблеми реплікації та експресії геному РНК-вірусів досліджуються з початку 70-х років. Експресія геному цього вірусу забезпечується двома оперонами, ранніми та пізніми генами. У рамках зчитування пізніх генів здійснюють вставку чужорідних генів із забезпеченням високого рівня їхньої експресії, порівняно з таким поверхневих мажорних білків α -вірусів. Компанія *AlphaVax* є світовим лідером у використанні α -вірусів як векторів для конструювання вакцин. При цьому слід підкреслити безпечність векторів на основі α -вірусів: вони непатогенні для людини, а також в людській популяції немає імунітету проти цих вірусів, оскільки вони ніколи не циркулювали серед людей.

У перших експериментах такого роду плазмиду *E. coli*, що містить клонований ген білка-антигена, транскрипція якого знаходилася під контролем промотору вірусу тварин, кон'югували з мікрочастинками золота і бомбардували ними клітини вуха миші за допомогою генної гармати. У цьому методі використовується стиснутий гелій, що містить частинки колоїдного золота з сорбованими на ньому плазмідами, які експресують антиген. Препарат вводиться в епідерміс. Перевагами цього методу є потрапляння плазмід безпосередньо в клітини і факт того, що більшість плазмід прямо контактує з клітинами Лангерганса. Це важливо, оскільки шкіра багата на антиген-презентуючі клітини (клітини Лангерганса), що синтезу-

ють молекули головного комплексу гістосумісності (МНС) II класу. Тому ДНК, введена безпосередньо у шкіру, може ними легко захоплюватися. Згодом з'ясувалося, що клоновану ДНК можна також вводити в клітини за допомогою внутрішньом'язової ін'єкції розчину з великою кількістю копій плазмід, що несе відповідну ДНК. Для цього необхідно в 10^3 - 10^4 разів більше ДНК, ніж під час бомбардування мікрочастинками. В одному з експериментів ген включався до клітин миші у більше ніж 75 % випадків, і синтезований білок-антиген індукував синтез антитіл. В одній із серій експериментів мишам у задні кінцівки вводили розчин з *E. coli*-плазмідною, що несе ДНК нуклеопротейну вірусу грипу А, транскрипція якого знаходилася під контролем промотору вірусу саркоми Рауса або цитомегаловірусу. Хоча рівень експресії гена нуклеопротейну був настільки низьким, що не піддавався реєстрації, через 2 тижні після імунізації в крові мишей виявлялися антитіла до вірусу грипу А. Виживання імунізованих мишей виявилось значно вищим, ніж мишей з контрольної групи. Крім того, вони були нечутливі до іншого штаму вірусу грипу. Такий перехресний захист не виробляється при застосуванні традиційних протигрипозних вакцин.

Пізніше відбулися перші клінічні випробування на людині, які передусім продемонстрували безпечність нового методу. Гени ВІЛ вносили до клітин пацієнтів, вже заражених вірусом, а згодом аналогічні експерименти провели зі здоровими людьми. Крім генів ВІЛ пересаджували гени грипу та гепатиту В. У всіх випадках вакцини приводили до імунної відповіді у вигляді вироблення специфічних антитіл. Вакцини вводили шляхом ін'єкцій або за допомогою так званої «генної гармати». Цей апарат, випускаючи струмінь стисненого гелію, пробиває клітинні мембрани мікроскопічними металевими частинками, покритими ДНК. Ця технологія «генної гармати», згідно з звітами, потужно стимулює імунну реакцію і вже пройшла перші клінічні випробування. Для підвищення ефективності всмоктування ДНК укладали в оболонку з катіонних ліпідів або інших молекул, які нейтралізують їхній заряд і мають ліпідні групи для покращення проникнення крізь мембрану. Такі склади досліджувалися також для пошуку альтернативних шляхів введення (наприклад, пероральний чи назальний), які можуть стимулювати імунітет слизових оболонок. Було показано, що анестезуюча речовина бупівакаїн при введенні разом з ДНК посилює всмоктування та експресію ДНК. АДФ-рибозилуючі екзотоксини, що вводяться спільно з ДНК і наносяться на шкіру, можуть стимулювати

черезшкірну імунізацію. Існують дані про можливість «вистрілювати» ДНК-вакцину, упаковану в ліпосоми. Полегшення впливу може відбуватися на рівні клітинного всмоктування, експресії або імунологічної активції.

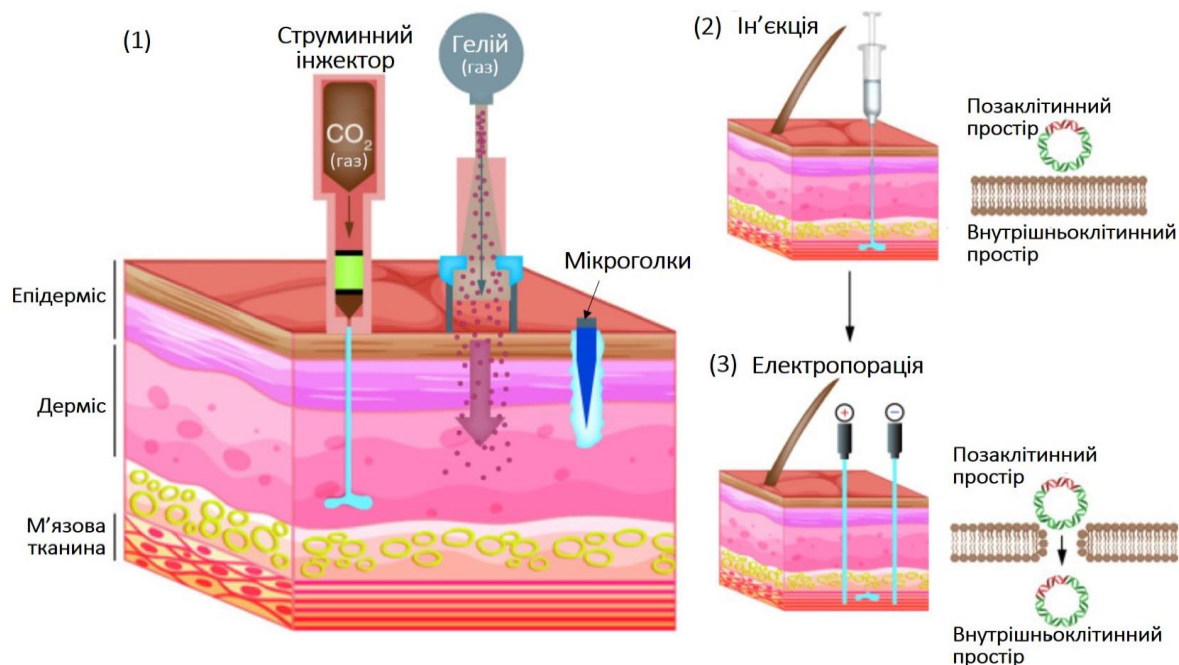


Рисунок 3.7 – Технології доставки ДНК-вакцини:

(1) доставка ДНК-вакцин у відділи шкіри за допомогою генної гармати, струминного інжектора та мікроголок, ці фізичні методи дозволяють доставляти ДНК-вакцини в епідерміс, дерму та підшкірні відділи, забезпечуючи більшу ефективність і безпечність, ніж звичайні голчасті методи; порівняно з ін'єкційним введенням (2), використання електропорації (3) *in vivo* посилює поглинання клітиною введеної ДНК через клітинну мембрану

Бактерії, які реплікуються внутрішньоклітинно, можна піддати генно-інженерній обробці з метою доставки плазмідної ДНК до клітин для експресії рекомбінантних білків. *Shigella flexneri* була атенуйована шляхом створення делеційного мутанта за життєво важливим геном (*asd*). Хоча такий штам може розмножуватися *in vitro* за наявності діамінопімелінової кислоти (DAP) і може окупувати клітини, він не здатний розмножуватися *in vivo* за відсутності DAP. Цей штам був трансформований плазмідною, що несе еукаріотичний промотор та рекомбінантний ген. Отриманий рекомбінантний штам *S. flexneri* виявився здатним заселяти клітини ссавців *in vitro* та експресувати закодований у плазміді білок як потенційний вакцинний антиген. Оскільки *S. flexneri* реплікується в кишечнику та сти-

мулює імунітет слизових оболонок, цей вектор можна вводити пероральним шляхом з метою доставки ДНК до клітин, у яких стимулюється імунітет слизових оболонок. Інші атенуйовані штами різних видів бактерій (наприклад, *Salmonella*, здатний заселяти клітин ссавців, але не ділитися), також можуть доставляти рекомбінантні плазмідні пероральним шляхом для експресії рекомбінантних білків як вакцинних антигенів.

При введенні *ДНК-вакцини активізуються клітини імунної системи*: В-лімфоцити виробляють антитіла, які нейтралізують антигени в рідких міжклітинних тканинах (гуморальна імунна відповідь), а цитотоксичні Т-лімфоцити руйнують бактерії та віруси всередині клітин (клітинна імунна відповідь). Отримано експериментальні дані, що той самий антиген, введений в організм звичайним методом і за допомогою ДНК-вакцини, продукує різні варіанти імунної відповіді. При ДНК-вакцинації синтезуються імуноглобуліни IgG2a (максимум через 6 тижнів), а за традиційного введення – IgG1 (через 1–2 тижні). При ДНК-вакцинації Т-хелпери тварин секретують інтерферон- γ , а після звичайної вакцинації – інтерлейкіни IL-4 та IL-5. Таким чином, використання ДНК-вакцини призводить до так званої Т-хелперної відповіді I типу (Th-1), а звичайна вакцинація – до Th-2. Інтерес до ДНК-вакцин обумовлений рядом властивостей, які вони мають. Використовуючи той самий плазмідний або вірусний вектор можна створювати вакцини проти різних інфекційних захворювань, змінюючи тільки послідовність, що кодує необхідні антигени. Водночас, на думку ряду дослідників, пряма інокуляція плазмідної ДНК повинна приводити до синтезу білків *in vivo*, конформаційна і посттрансляційна модифікація яких ідентична тим, що відбуваються при інфекційному процесі зараження вірусом. *Перевагами ДНК-вакцин є:*

- ✓ відсутність спеціальних методів доставки та висока стабільність (ДНК-вакцини стабільні навіть при кімнатній температурі),
- ✓ високий ступінь очищення, відсутність баластних білків та контамінації сторонніми агентами,
- ✓ індукування у тварин системного та місцевого імунітету.

Дворазова внутрішньом'язова вакцинація собак плазмідною ДНК, що експресує глікопротеїн вірусу сказу, захищає тварин від контрольного зараження вірулентним штамом вірусу сказу. Вже розроблені і проходять випробування ДНК-вакцини проти інфекцій, що викликаються вірусами гепатиту В і С, грипу, лімфоцитарного хоріоменінгіту, сказу, японського

енцефаліту, туберкульозу, лейшманіозу, малярії та ін. Такий носій-вектор проникає в клітину і синтезує потрібні білки, які мають протективну дію.

Впровадження цих вакцин у медичну практику потребує вирішення дуже багатьох питань. Наприклад, генами кодуються білкові антигени, але поки що немає альтернативи полісахаридним антигенам, які входять до складу ряду традиційних вакцин. Безперечно, важливими завданнями є розробка методів одержання та очищення плазмідної ДНК, звільнення від баластних домішок бактеріального походження, хромосомної ДНК та домішок РНК. Самостійним питанням є підбір для ДНК-вакцин ад'ювантів та носіїв. Заслуговує уваги питання щодо подальшої долі введеної в клітину ДНК, на яке сьогодні немає однозначної відповіді. ДНК може інтегруватися в геном господаря з дуже серйозними наслідками, якщо при цьому відбувається злаякісна трансформація клітин або порушується якийсь важливий ген, що призводить до мутагенного ефекту. На думку багатьох дослідників, такий розвиток подій вважається вкрай мало ймовірним. На їхню думку, така ДНК якийсь час проіснує в клітині у вигляді позахромосомного елемента, який не реплікується, а потім зруйнується. На нашу думку, ці питання ще недостатньо вивчені і впровадження ДНК-вакцин у медичну практику потребує всебічного вивчення, а саме: доля введеної ДНК-вакцини, тривалість експресії антигена, нешкідливість ДНК-вакцин, утворення антитіл до самої ДНК та домішок вакцини тощо.

Таким чином, показано, що після того, як клітини *in vivo* приймають ДНК, що кодує вакцинні антигени, вони можуть секретуватися або зв'язуватися з поверхнею клітини таким способом, який запускатиме гуморальну або клітинну імунну відповідь. Більш того, поглинання ДНК можна посилити хімічним шляхом або при використанні вірусів чи бактерій для доставки. Останні підходи відповідають визначенню вакцини на основі ДНК як нездатної реплікуватися в організмі людини. Нещодавно почали проходити клінічні випробування ДНК-вакцини без оболонки, удосконалені та вводимі за допомогою вірусів. Незважаючи на те, що ДНК-вакцини розробляються понад 30 років, жодна з таких вакцин для використання людиною досі не дозволена до застосування. Водночас для ветеринарії дозволено до застосування кілька вакцин, наприклад, проти вірусу Західного Нілу, проти H5N1 у курей.

Проводяться обширні випробування на тваринах ДНК-вакцин для людини: ВІЛ, вірусу Зіка, гепатит, грип, COVID-19. Для успішної розроб-

ки ДНК-вакцин актуальним залишається питання дизайну цих вакцин, а саме: виробництво ДНК, вивчення та підбір ад'юванту для ДНК-вакцини, вивчення шляхів доставки та введення.

3.5. Вакцини на основі полісахаридів

3.5.1. *Прямі полісахаридні вакцини*

Ряд грамнегативних та грампозитивних бактерій утворюють капсульну структуру, яка містить полісахариди. Здатність бактерій до утворення капсул значною мірою визначає взаємодію між бактеріальними клітинами та організмом господаря при розвитку інфекційного процесу. *Капсульні антигени* відіграють важливу роль у вірулентності та імуногенності бактерій. Є залежність між наявністю у бактерій капсули та їх токсичністю. Встановлено, що гемолітична активність також властива переважно капсульним формам бактерій. Капсульні антигени здатні пригнічувати фагоцитоз бактерій та створювати умови для розмноження збудників інфекції в організмі господаря. Капсульні полісахариди несуть у собі основну серологічну антигенність бактеріальних видів та успішно взаємодіють з антитілами до цих бактерій. Такі полісахариди є ефективними вакцинними антигенами. Капсульні полісахариди можуть як накопичуються в культуральному середовищі, так і бути присутніми в біомасі бактерій.

У технологічну схему виділення полісахаридів входить: концентрація культуральної рідини ультрафільтрацією, обробка лужними розчинами, хроматографія на різних видах сорбентів, осадження етанолом, контроль структури полісахариду.

Нативний капсульний полісахарид може містити сотні повторюваних одиниць, характерних для кожного виду бактерій та антигенного підтипу, в якому кожен мономер складається з поєднання моносахаридів, фосфатних груп та дрібних органічних компонентів. Полісахариди вивільняються мікроорганізмом у міру його росту та накопичуються у культуральному середовищі. Ці препарати полісахаридів зазвичай імуногенні для дорослих і дітей віком від 2 років і стимулюють вироблення антитіл, які можуть опосередковувати опсонізацію організму, таким чином захищаючи його від інфекції. Вакцини полісахаридів ліцензовані для гемофільної інфекції (Hib-64, моновалентна для серотипу b), *Neisseria meningitides*

(квадривалентна) та *Streptococcus pneumoniae* (23-валентна). Недолік цих вакцин полягає в тому, що полісахариди, будучи незалежними від Т-клітин (від англ. – *T-independent*, TI) імуногенами, мають слабку імуногенність або взагалі не проявляють імуногенності у дітей віком до 2 років і не стимулюють імунологічну пам'ять у старших дітей та дорослих.

Безперечний інтерес представляє вакцина *Typhim Vi®* (*Sanofi Pasteur*), створена на основі полісахаридів для внутрішньом'язового введення. Вакцина містить полісахарид Vi клітинної поверхні, екстрагований зі штаму *Salmonella enterica* серовар *Typhi*, *S. typhi* Ty2. Мікроорганізм вирощують на напівсинтетичному середовищі, основним компонентом якого є казеїн. Капсульний полісахарид осаджують з концентрованого культурального супернатанту додаванням броміду гексадецилтриметиламонію, і очищають продукт диференціальним центрифугуванням і осадженням. Для інактивації бактеріальної культури використовують формальдегід, залишкова кількість якого у дозі (0,5 мл) не повинна перевищувати 100 мкг. Вакцина містить фенол як консервант у кількості 0,25 %. Активність очищеного полісахариду оцінюють за розміром молекули та вмістом О-ацетилу. Вакцина містить залишки піногасника на основі полідиметилсилоксану або ефіру жирної кислоти. У 0,5 мл дозі міститься 25 мкг очищеного полісахариду Vi в безбарвному ізотонічному фосфатно-сольовому буфері (рН 7±0,3), 4,150 мг хлориду натрію, 0,065 мг динатрій фосфату, 0,025 мг мононатрій фосфату і 0,5 мл стерильної води для ін'єкцій.

3.5.2. Кон'югати полісахаридних вакцин

Протягом останніх десятиліть розробка та комерціалізація кон'югованих вакцин проти *Haemophilus influenzae* типу b (Hib), пневмококу і менінгококу (серогрупи C, A, W і Y) сприяли фактичній ліквідації бактеріального менінгіту, який викликається бактеріями, включеними у вакцини, і попередженню більш ніж мільйону смертей щорічно.

Хоча діти віком до 2 років не можуть ефективно розпізнавати імуногени, вони можуть проявляти імунологічні реакції на залежні від Т-клітин (від англ. – *T-dependent*, TD) імуногени, наприклад, білки. Хімічна кон'югація полісахаридів з білком-носієм перетворює полісахариди з TI на TD-імуноген. Внаслідок цього вакцини у вигляді кон'югату полісахарид-білок можуть стимулювати захисний імунітет IgG та імунологічну

пам'ять у немовлят і маленьких дітей. Дана стратегія особливо важлива для інкапсульованих бактерій, таких як Hib і *S.pneumoniae*, внаслідок переважання інвазивних захворювань, що викликаються цими бактеріями, у дітей молодше двох років, для яких вакцина на основі полісахаридів неефективна. Перша ліцензована Hib-вакцина містила полірибозилрибітол фосфат (PRP), капсульний полісахарид мікроорганізму. Однак полісахаридна вакцина була недостатньо імуногенною для дітей молодше 2 років. У зв'язку з цим, вона була дозволена до використання тільки для дітей старше 18 місяців. Дослідження, проведене у Фінляндії в 1977 р., підтвердило значне зниження Hib-захворювань і ефективність PRP-вакцини в 90 % випадків.

Водночас вивчення вакцини у США показало її меншу ефективність. В результаті цих досліджень і суттєвої потреби мати вакцину для малолітніх дітей почалися розробки зі створення кон'югованих вакцин. *Такі кон'юговані вакцини*, в яких Hib-полісахарид пов'язаний з білком, *мають ряд переваг*: індукують високі титри антитіл, більш імуногенні для малолітніх дітей, демонструють високу імунну відповідь при ревакцинації. У 1989 році було дозволено до використання у дітей молодше 18 місяців чотири кон'юговані вакцини:

- 1) PRP-D – містить полісахарид, кон'югований з дифтерійним анатоксином;
- 2) HibOC – містить полісахарид, кон'югований з нетоксичним мутантним дифтерійним токсином, відомим як CRV 197;
- 3) PRP-OMR – містить полісахарид, кон'югований з білком зовнішньої мембрани *Neisseria meningitidis*;
- 4) PRP-T – містить полісахарид, кон'югований з правцевим анатоксином.

Вивчення імуногенних властивостей чотирьох вакцин у процесі трьох імунізацій продемонструвало суттєві відмінності у продукції антитіл. Структура капсульного полісахариду PRP, який відіграє важливу роль у вірулентності бактерії *Haemophilus influenzae*, встановлена як 3-B-D-рибофуна-розил(1-1)-D-рибітол-5-фосфат. Таким чином, на ринку вакцин є чотири різні ліцензовані вакцини-кон'югати Hib. Всі вони мають різні білки-носії з різними розмірами та імунологічними параметрами, різні тривалості ланцюга полісахариду та різні технології кон'югації.

В даний час для профілактики захворювань, викликаних *H. influenzae* і *N. meningitidis*, широко використовують кон'югати полісахаридних вакцин, виробництва *Sanofi Pasneur*. Для профілактики менінгокової інфекції використовують вакцину *Menactra*®, яка містить полісахариди серогруп А, С, Y, W-135 у кількості по 4 мг на дозу. Кожен полісахарид кон'югований з дифтерійним анатоксином у кількості 48 мг.

Процес отримання полісахаридних кон'югованих вакцин включає два етапи очищення. На першому етапі зазвичай використовується осадження органічними розчинниками та хроматографія для відокремлення полісахаридів від нуклеїнових кислот та білків перед кон'югацією, а на другому етапі проводять хімічне зв'язування (кон'югація) полісахаридного антигена з білком-носієм. На другому етапі також проводять видалення некон'югованих полісахаридів та білків носіїв від кон'югованих. Етап відділення проводять за допомогою ультрафільтрації, гідрофобної хроматографії та селективного осадження, які можуть знизити вміст вільних полісахаридів. Процес очищення менінгококу з використанням гідрофобної хроматографії і діалізації (100 кДа) дозволив отримати менше 2 % вільних полісахаридів серогруп С, W-135 і Y. Збільшення іонної сили і зниження рН для зменшення внутрішньомолекулярних електростатичних взаємодій і ущільнення полісахаридів також скоротило час утримання на етапі ексклюзійної хроматографії.

Виробники прагнуть підтримувати низький рівень вільних полісахаридів (від 10 до 25 %), оскільки такі домішки пригнічують гуморальний імунітет. Складність їх відділення полягає ще й у тому, що кон'югація відбувається нестехіометрично, що призводить до однакових розмірів молекул кон'югованих та вільних полісахаридів. Використання органічних розчинників на першому етапі очищення вимагає тривалого часу, створює низку технологічних проблем та необхідність спеціальної утилізації органічних розчинників. Для одержання пневмокової полісахаридної вакцини запропоновано використання фільтрації через активоване вугілля, змішаних видів хроматографії, що призвело до скорочення часу очищення на 75 % та усунення необхідності утилізації відходів органічних розчинників.

Необхідно зазначити, що низьке вилучення є поширеною проблемою в процесах очищення кон'югованих полісахаридних вакцин. Наприклад, вихід капсульного полісахариду *Neisseria meningitidis* на стадії очищення становить 60–65 %. Крім того, важливим питанням є ступінь кон'югації

полісахариду та носія білка. На сьогоднішній день виробники наводять показники кон'югації полісахариду не менше ніж 20 % і до 50 %. Очищення полісахариду являє собою багатоетапний процес, оскільки баластні речовини розрізняються за розміром молекули, іонним зарядом та гідрофобністю. Постійно розробляються різні методи очищення та кон'югації. У розділі 4.1.6 наведено матеріали щодо створення кон'югованої Ніб вакцини.

Таким чином, кон'юговані вакцини були розроблені для індукції стійкої імунної відповіді проти бактеріальних капсульних полісахаридів, які є довгими полімерами, що складаються з великої кількості повторюваних ланок простих цукрів і служать захисним зовнішнім шаром для багатьох бактерій. Залежно від хімічного складу повторювана ланка може містити 1–7 моносахаридів. Антитіла проти полісахаридів багатьох патогенних бактерій, таких як менінгококи, Ніб та пневмококи, захищають людей від розвитку хвороб. Вакцини, що складаються з очищених полісахаридів проти менінгококу та пневмокока, були розроблені у 1970-х роках. Кон'юговані вакцини були описані також для *Streptococcus* групи В, *Shigella*, *Salmonella typhi* та *Salmonella paratyphi*. Вакцина проти *S. typhi* була нещодавно ліцензована в Індії та пройшла попередню кваліфікацію ВООЗ. Біотехнологія дозволила створити штам *E. coli*, які синтезують і поставляють у периплазму полісахариди, які вже кон'юговані з білком носієм. Деякі з цих біокон'югатів, які продукуються *E. coli*, вже успішно пройшли кілька клінічних випробувань. Біокон'югати значно спрощують процес виробництва кон'югованих вакцин, і очікується, що вони дозволять виробляти велику кількість кон'югатів за ціною, більш доступною для країн з низьким рівнем доходу.

Механізм дії кон'югованих вакцин на основі полісахаридів представлений на рисунку 3.8. Після імунізації полісахариди або кон'юговані вакцини поглинаються дендритними клітинами і транспортуються в лімфатичні вузли, де для індукції імунної відповіді їм необхідно задіяти як В-, так і Т-клітини і почати формування зародкових (або гермінальних) центрів, які являють собою ділянки в лімфатичних вузлах, де зрілі В-клітини проліферують, диференціюються та мутують свої гени антитіл за допомогою соматичної гіпермутації.

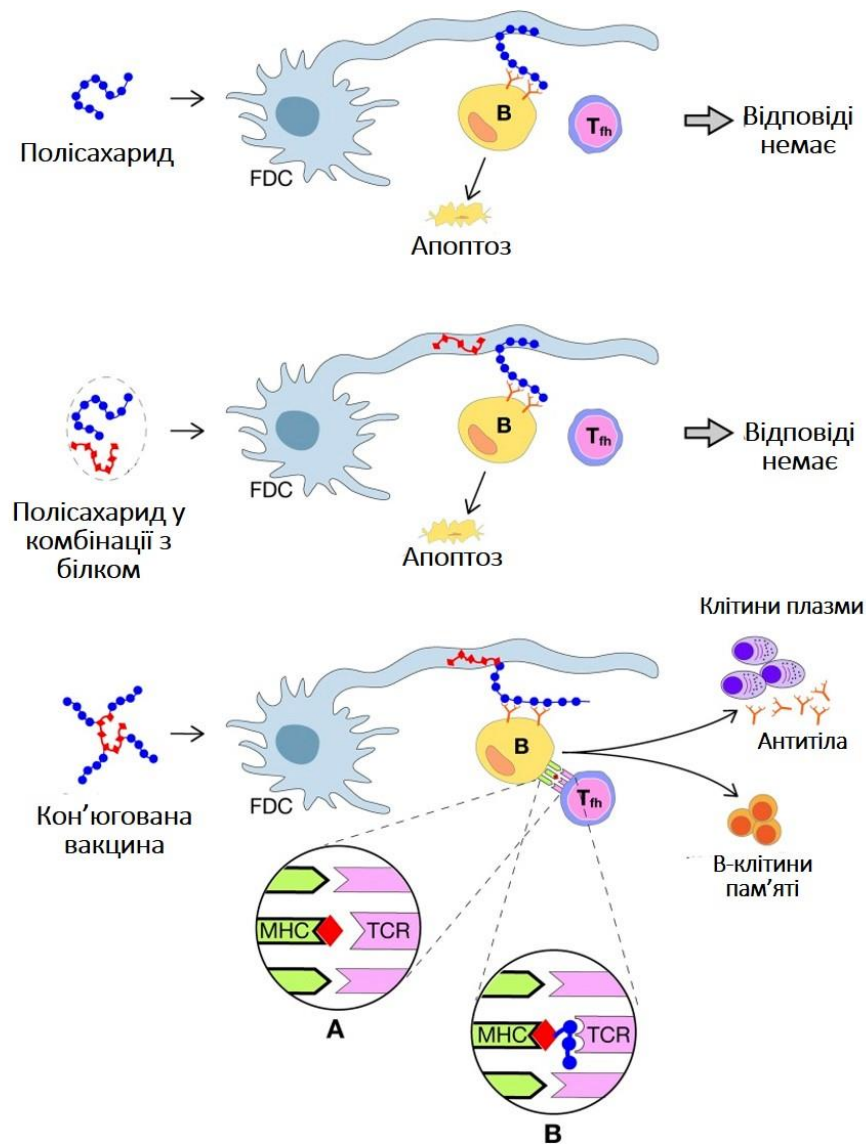


Рисунок 3.8 – Взаємодія полісахаридної та кон'югованої полісахаридної вакцин з клітинами FDC, B і T_{fh}. У кружечках показано два механізми, за допомогою яких кон'юговані вакцини можуть взаємодіяти з рецепторами Т-клітин (TCR): А – TCR розпізнає пептид, який є антигеном, який представляє MHC; В – TCR розпізнає полісахарид, зв'язаний з пептидом, закріпленим у MHC

Для формування зародкових центрів необхідні три види клітин: 1) полісахарид-специфічні В-клітини, які експресують антитіло на своїй поверхні у вигляді рецептора (В-клітинний рецептор, BCR); 2) фолікулярні хелперні Т-клітини (T_{fh}), які розпізнають білок-носії антигена, представленого на поверхні В-клітин; 3) фолікулярні дендритні клітини (FDC), які містять антиген і презентують його В-клітинам. Зародкові центри продукують антитіла з більшою спорідненістю та «перемикають» клас антитіл (наприклад, з IgM на IgG) під час нормальної імунної відповіді на інфек-

цію або після вакцинації. Зазвичай В-клітини зв'язують і екстрагують білкові антигени з фолікулярних дендритних клітин, а потім інтерналізують антигени в ендосоми, де відбувається їх процесинг у малі пептиди, і завантажують пептиди до головного комплексу гістосумісності (МНС), який виставляє пептид на поверхні В-клітин, де його розпізнає рецептор Tfh-клітин. Потім активована Tfh-клітина допомагає В-клітині шляхом прямої міжклітинної взаємодії та шляхом секреції цитокінів. Чим сильніша спорідненість BCR до антигена, тим більше його на поверхні В-клітини і тим інтенсивніше буде взаємодія з Tfh-клітинами. Таким чином, відібрані В-клітини проходилимуть більше циклів реплікації у темній зоні та матимуть більш ефективне дозрівання афінності. Після активації В-клітини потрапляють у темну зону, де швидко розмножуються та експресують цитидиндезаміназу, яка запускає введення випадкових мутацій в ген Ig, що кодує варіабельну область BCR, таким чином генеруючи мутовані BCR. Мутовані В-клітини з функціональними рецепторами знову потрапляють у зону світла, де вони отримують антиген з поверхні FDC, який вони обробляють і представляють клітинам Tfh і перезапускають цикл дозрівання афінності. Щоб вижити В-клітини зародкових центрів мають взаємодіяти з Tfh-клітинами, інакше вони піддаються апоптозу, якщо вони не пройшли позитивний відбір шляхом взаємодії з Tfh-клітинами та антигеном.

3.6. Субодиничні вакцини

Перевагою субодиничних вакцин є їхня нездатність розмножуватися в організмі господаря. Зазвичай вони добре переносяться, особливо вакцини, які піддаються багатоступеневому очищенню з метою видалення інших макромолекул. Імуногенність такої вакцини можна посилити шляхом її спільного введення з ад'ювантом або за допомогою системи доставки. Тим не менш, слід починати розробку з розуміння того, що для досягнення тривалого захисного імунітету потрібне неодноразове введення вакцини, найчастіше з наступним введенням бустерних доз. Такі вакцини зазвичай функціонують шляхом стимулювання гуморальної імунної реакції, а також ініціювання імунологічної пам'яті.

Конструювання рекомбінантних вірусних вакцин включає:

- клонування та експресію в різних векторах індивідуальних вірусних генів з метою отримання вірусних антигенів у різних експресійних системах в якості високоочищених вакцинних препаратів;
- клонування та експресію індивідуальних вірусних антигенів з метою одержання вірусоподібних частинок;
- клонування та експресію вірусних антигенів в еукаріотичних векторах з метою отримання ДНК-вакцин.

Для розгляду цього питання зупинимося на протигрипозних вакцинах. На поверхні вірусної частинки локалізуються такі білки-антигени: гемаглютинін (НА), нейрамінідаза (N) та білок М2, який формує йонні канали. Глікопротеїни НА і N – ключові білки для розмноження вірусу грипу типу А і В: НА використовується для проникнення в клітину, а N – для виходу з неї. Встановлено, що в «головці» апікальної частини молекули НА локалізується 5 антигенних сайтів, і вірус-нейтралізуюча активність антитіл пов'язана з імунною відповіддю на ці сайти. Антитіла до НА блокують взаємодію вірусу з клітинними рецепторами, тобто блокується інфікування клітин. Антитіла до N блокують виділення вірусів інфікованими клітинами, тобто поширення інфекції. Антитіла до білка М2 також значною мірою блокують від'єднання вірусних інфекційних частинок від мембран інфікованих клітин. Виходячи з цього зрозуміло, що з трьох основних поверхневих білків принципове значення має НА. Це і лежить в основі технології виробництва субодиничних вакцин, які містять переважно НА. Вважається, що імунітет на N має допоміжне значення. Білок М2 через високу консервативність став об'єктом для конструювання універсальної вакцини проти грипу А. Таким чином, рекомбінантні вакцини з використанням індивідуальних компонентів вірусів грипу типу А орієнтовані переважно на ключовий та сильно варіабельний компонент вірусу – молекулу НА. З внутрішніх антигенів вірусної частки як матеріал для отримання вакцин активно розглядаються білки NP, М1, NS1.

Крім субодиничних протигрипозних вакцин, значне поширення отримали й інші вакцини: проти вірусу гепатиту В (HBsAg), проти вірусу папіломи людини (капсидні білки HPV), проти вірусу SARS-CoV-2 (шиповидний білок S) і ряд інших. Субодиничні вакцини проти вірусів: гепатиту В (див. розділ 4.2.5) та папіломи людини (див. розділ 5.1) будуть розглянуті нижче.

За останні роки отримано вакцини для профілактики COVID-19 (розділ 5.3). Наразі запропоновано субодиничну вакцину проти COVID-19 – NVX-CoV2373/*NovaVax* (США), яка була дозволена FDA. Це субодинична білкова вакцина, отримана шляхом створення сконструйованого бакуловіруса, що містить ген модифікованого білка спайкового SARS-CoV-2. Спайковий білок модифіковано шляхом включення двох амінокислот проліну, з метою стабілізації форми білка. Бакуловірус (система експресії) створений для зараження клітин молі Sf9, які утворюють шиповидний білок. S-білок збирають і сорбують на синтетичних ліпідних наночастинках діаметром близько 50 нм, що складаються з фосфатидилхоліну і холестерину, кожна з яких містить до 14 молекул білків. До складу вакцини включають ад'ювант на основі сапоніну – *Matrix M*.

1 доза вакцини (0,5 мл) містить 5 мкг шиповидного білка SARS-CoV-2 і 50 мг ад'юванту *Matrix M*. *Matrix M* складається з частинок розміром близько 40 нм, що складається (0,5 мл) з екстракту кори мильного дерева (*Quillaja saponina Molina*): фракція А – 42,5 мкг, фракції С – 7,5 мкг. Отримана вакцина продемонструвала у клінічних випробуваннях нешкідливість та імуногенність. Вакцина викликала захисну імунну відповідь у 80 % людей віком 12–17 років та 90 % у вакцинованих людей віком 18 років і старше. Препарат рекомендований для застосування у Канаді. Відповідно до контрактів виробництво має відбуватися в Японії, Індії, Чехії та Польщі.

Ефективність продемонструвала субодинична рекомбінантна ліпосомальна вакцина проти оперізуючого лишая (вірусу герпесу) – *Shingrix®* (*GlaxoSmithKline*, Бельгія) для внутрішньом'язового введення. Вакцина *Shingrix®* демонструвала більш високу імуногенність порівняно з атенуйованою вакциною проти оперізуючого лишая, при аналогічних побічних діях.

Як видно з наведених даних, ці препарати складно віднести до одного виду вакцин. Вони відповідають вимогам кількох типів вакцин: вірусних, субодиничних, рекомбінантних, ліпосомальних та тих, що містять ад'юванти.

3.7. Мукозальні вакцини

Слизова оболонка (лат. – *tunica mucosa*) – внутрішня система порожнистих органів сполучених із зовнішнім середовищем. Слизові оболонки вистилають внутрішню поверхню органів дихання, сечової, статеві та травної системи. Слизові оболонки містять велику кількість лімфоцитів, які організовані у різні структури, що беруть участь в імунних відповідях організму. Імунна відповідь характеризується індукцією синтезу антитіл, які надходять на поверхню слизових, а також у загальну циркуляцію. Відповідальні за синтез антитіл лімфоцити мігрують у різні слизові оболонки, утворюючи мукозальну імунну систему.

Мукозальний імунітет у людини – це складний комплекс захисних пристосувальних реакцій, що сформувалися в процесі його еволюційного розвитку та забезпечують захист шкіри та слизових оболонок, які безпосередньо сполучаються із зовнішнім середовищем. Мукозальний імунітет забезпечується функцією низки клітинних систем, утворенням окремих клітинних елементів, здатних зупинити чи знищити віруси, і навіть синтезувати специфічні імуноглобуліни.

Мукозальні вакцини містять різні форми антигенного матеріалу, різні ад'юванти і можуть бути введені в організм різними шляхами. Тоді як більшість ліцензованих вакцин в даний час вводять шляхом ін'єкції, вакцини для слизових оболонок можуть перевершити стратегії парентеральної вакцинації щодо індукції захисних імунних реакцій слизових оболонок – *мукозальний шлях*. Мукозні вакцини вводять перорально, назально, вагінально, ректально. Пероральна імунізація стимулює імунну відповідь у шлунково-кишковому тракті додатково до слизової оболонки порожнини рота, лімфоїдних тканин, асоційованих з носом (NALT), та слинних залоз. Інтраназальна доставка ефективно індукує вироблення антитіл у слинних залозах, NALT, бронхоасоційованих лімфоїдних тканинах (BALT) нижніх дихальних шляхів та сечостатевих шляхів. Ректальна імунізація викликає більш виражену імунну відповідь та відповідь антитіл у виділеннях носа, слюзах та слизовій оболонці прямої кишки.

До вірусів, що передаються статевим шляхом, належить *вірус папіломи людини*. Продовжуються дослідження щодо розробки мукозальної вакцини проти цього вірусу. Якщо на ранніх етапах як мукозальний ад'ювант використовували бактерії-вектори, наприклад, сальмонели або

стрептококи, то в останні роки намагаються отримати вакцину, яка була б здатна індукувати місцевий мукозальний імунітет при безпосередньому введенні вакцини на слизову оболонку без мукозoadгезивного ад'юванта. У досліджах із людським вірусом папіломи 16-го типу, який асоціюється з виникненням раку шийки матки, були сконструйовані вірусоподібні частинки, що утворюються за рахунок самозбирання вірусного білка L1. Цим препаратом вакцинували інтраназально мишей, що супроводжувалося індукцією сироваткових антитіл, а також вагінальних антитіл та активацією лімфоцитів у селезінці та піхві. При інтраназальній імунізації мишей вірусноподібними частинками вірусу папіломи 16-го типу були отримані дані, які показали, що при парентеральній імунізації індукуються лише антитіла типу IgG, а IgA не утворюються. Іншими авторами виявлено індукцію антитіл IgA та IgG при інтраназальній вакцинації. У дослідженні з вірусом папіломи показано, що пероральна вакцинація мишей вірусноподібними частинками вірусу папіломи 16-го і 18-го типів разом з мутантним токсином *E. coli* (R1926) істотно підвищує утворення сироваткових антитіл, а також IgA у вагінальному секреті у порівнянні з титрами антитіл при вакцинації без токсину.

Вакцини для слизових оболонок можуть викликати сильні захисні імунні реакції у місцях переважного інфікування патогенами. Загалом індукція адаптивного імунітету на слизовій оболонці, що включає секреторні реакції антитіл і резистентні Т-клітини в тканинах, здатні насамперед запобігати розвитку інфекції, а не лише обмежувати інфекцію та захищати від розвитку захворювання.

Слід зазначити, що захворюваність і смертність від інфекційних захворювань, викликаних патогенами слизової оболонки залишається високою. Нагадуванням про загрозу інфекційних захворювань слизових оболонок стала Пандемія важкого гострого респіраторного захворювання на коронавірус 2 (SARS-CoV-2). Респіраторні патогени залишаються основною причиною глобальної смертності, причому інфекції нижніх дихальних шляхів становлять четверту за значимістю причину смерті в усьому світі. Інфекції нижніх дихальних шляхів стають причиною смерті 2,4 млн хворих на рік. При цьому *Streptococcus pneumoniae*, респіраторно-синцистальний вірус (RSV), *Haemophilus influenzae* B і вірус грипу завдають особливої шкоди малим дітям (1-5 років) і людям похилого віку. Кишкові патогенні, які викликають діарейні захворювання, є восьмою за зна-

чущистю причиною смерті в усьому світі, при цьому діти особливо схильні до ризику, серед них *Shigella* і енеротоксигенна *E. coli* потребують термінової вакцинації. ВООЗ поставила собі за мету покінчити з холерою до 2030 року шляхом реалізації широкомасштабних профілактичних заходів, включаючи вакцинацію. Мукозальні вакцини, націлені на статеві шляхи, мають потенціал для боротьби із захворюваннями статевих шляхів та місцевими пухлинами, що також важливо враховувати, оскільки рак шийки матки посідає четверте місце серед захворювань на рак у жінок.

Єдиною мукозальною вакциною для масового застосування є *вакцина проти поліомієліту* (OPV, від англ. – *oral polio vaccine*) у вигляді крапель. Біотехнологічні аспекти та схема виробництва мукозальної вакцини OPV наведені в розділі 4.2.4. Сильні клітинні та гуморальні імунні реакції слизових оболонок можуть індукувати противірусний імунітет, перешкоджаючи зв'язуванню патогенів з епітеліальними поверхнями та поглинанню ними. Просування нових вакцин для слизових оболонок та покращення існуючих вакцин потребує інноваційних ад'ювантних підходів та стратегії доставки. OPV на сьогоднішній день є найуспішнішою вакциною для слизових оболонок. Істотним недоліком вакцин на основі атенуйованих патогенів є ризик реактогенності та реверсії до вірулентного патогену після вакцинації. Хоча використання OPV знизило кількість випадків поліомієліту більш ніж на 99 % до 1988 року, все ще мають місце спалахи вакцино-асоційованого паралітичного поліомієліту, що виник через невеликі генетичні зміни, які відбуваються під час реплікації OPV у людей. Іншою проблемою живих атенуйованих вакцин є можливість ретроградного транспорту в мозок після назальної або інтраназальної вакцинації. Хоча інактивовані вакцини в цілому безпечні, процес інактивації (наприклад, інактивація температурою або формаліном) може знизити їх імуногенність і потребуватиме додавання ад'ювантів, таких як рекомбінантна субодиниця В холерного токсину, дозволеного до застосування у вакцині *Dukoral®* (табл. 3.6).

Таблиця 3.6 – Ліцензовані препарати мукозальних вакцин

Назва вакцини	Збудник інфекції	Склад вакцини	Форма випуску і спосіб введення
<i>Dukoral</i> ®	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i> O1 серотипи Inaba і Ogawa (інактивований формальдегідом і температурою), рекомбінантна субодинаця В холерного токсинау	Орально, рідина
<i>Shanchol</i> ™, <i>Euvichol-Plus</i> ®	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i> O1 серотипи Inaba/Ogawa і O139 (інактивований формальдегідом і температурою)	Орально, рідина
<i>Vaxchora</i> ®	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i> CVD 103-HgR, отриманий делецією гена <i>ctxA</i> у штамі Inaba (атенуйовані)	Орально, рідина
<i>Biopolio</i> ® (bopV 1 & 3)	<i>Poliovirus</i>	Живі атенуйовані поліовіруси типу 1 (штам LS-c2ab) і типу 3 (штам Leon 12a1b)	Орально, рідина
<i>tOPV</i> (тривалентна пероральна вакцина проти поліомієліту)	<i>Poliovirus</i> 1,2 і 3 серотипів	Атенуйовані поліовіруси 1, 2 і 3 типів	Орально, рідина
<i>RotaTeq</i> ™	<i>Rotavirus</i> (реасортант)	Живий атенуйований реасортант (віруса людини і бика), пентавалентна – генотипи G1, G2, G3, G4, G5	Орально, рідина
<i>Vivotif</i> ®	<i>Salmonella typhi</i> (живі атенуйовані)	Живий атенуйований штам Ty21, полісахариди	Орально, капсули

Нині ліцензовано ряд мукозальних вакцин проти *Vibrio cholerae*, *Poliovirus*, *Rotavirus*, *Salmonella typhi*, які наведено у таблиці 3.6.

Постійно розробляються нові технології з метою захисту та збереження структури та цілісності антигена, а також підвищення біодоступності та індукції місцевих систем імунної відповіді. Усі носії для доставки можуть бути модифіковані або доповнені імуностимулюючими молекулами або покриваючими сполуками, такими як ПЕГ або хітозан. Це призво-

дить до зміни заряду, адгезивних властивостей, форми, розміру, рН тощо. У таблиці 3.6 показано, що субодиниця В-рекомбінантного холерного токсину (rCTB) є на сьогоднішній день єдиним ад'ювантом, дозволеним у ліцензованих мукозальних вакцинах. Рекомбінантна молекула холерного токсину стимулює вироблення як антибактеріальних, так і антитоксичних антитіл, не має побічних дій. Як ад'юванти для мукозальних вакцин дослідники використовують ентеротоксини: холерний токсин (CTB), отриманий від декількох штамів *V. cholerae*, ліпополісахаридний токсин, отриманий від штамів *E. coli*, та ін. Ентеротоксин як ад'юват стимулює мукозну оболонку, збільшуючи проникність слизового бар'єру, що у свою чергу збільшує активацію антиген-презентуючих клітин та може індукувати синтез специфічних антитіл.

Сьогодні докладається багато зусиль до розробки субодиничних пероральних вакцин нового покоління для профілактики діарейних захворювань. Для цього запропоновано використовувати систему доставки на рослинній основі. Трансгенні вакцини на рослинній основі були розроблені та привернули увагу завдяки своїй безпечності, імуногенності та низькій вартості. Колективом авторів запропоновано мукозальну вакцину *MucoRice* на основі трансгенного рису, який експресує та накопичує В субодиницю холерного токсину (CTB) у білковому тілі зерна. Ця вакцина містить 30 мкг рекомбінантного білка в одному зерні. CTB трансдукували в насінини рису з використанням *Agrobacterium*. При введенні перорально вакцини *MucoRice* білок CTB ефективно вивільняється з рису. Пероральна імунізація вакциною *MucoRice* приводила до індукції CTB-специфічних IgA у мукозній оболонці та системних IgG у крові при використанні експериментальних моделей. Миші, вакциновані препаратом *MucoRice-CTB* були захищені від діареї при пероральному зараженні холерним токсином, а також від діареї, спричиненої *V. cholerae*. У 2018 р. проведено I фазу клінічного вивчення вакцини на здорових людях та пацієнтах з діареєю. Трансгенний рис подрібнювали до порошку, який суспендували в сольовому фосфатному буфері (1 г на 10 мл) і приймали перорально. Показано безпечність та імуногенність вакцини.

Продовжуються роботи зі створення пероральних вакцин, спрямованих на боротьбу з інфекцією *S. pneumoniae*. Ці вакцини можуть забезпечити широку імунну відповідь проти численних штамів *S. pneumoniae* як у респіраторних слизових оболонках, так і системних відділах, забезпечую-

чи подвійний захист від пневмококової інфекції. Показано, що вакцини, які містять поверхневий білок пневмокока А, можуть забезпечувати захисний імунітет проти колонізації *S. pneumoniae*.

Особливий інтерес представляють вакцини проти вірусу SARS-CoV-2. Доставка через слизову дихальних шляхів вакцин нового покоління проти COVID-19 забезпечує надійний захист, як від вихідних, так і від знов виникаючих штамів SARS-CoV-2. Використовуючи вектори на основі аденовірусів людини та шимпанзе, на мишиних моделях були оцінені 3-хвалентні вакцини проти COVID-19 з аденовірусним вектором, що експресує антигени шипа нуклеокапсиду та гена RdRp. Показано, що одноразова інтраназальна імунізація, особливо аденовірусом вектора шимпанзе, перевершує внутрішньом'язову імунізацію. В індукції тристороннього захисного імунітету, що складається з місцевих та системних відповідей антитіл, резистентних Т-клітин пам'яті слизової оболонки вродженого імунітету, авторами показано, що інтраназальне введення забезпечує захист від послідовностей SARS-CoV-2.

Необхідно зазначити, що крім ліцензованих вакцин, наведених у таблиці 3.6, також запропоновані та використовуються ліцензовані вакцини для ветеринарії проти вірусів сказу (приманка), хвороби Ньюкасла, парагрипу та ін.

Для використання мукозальних вакцин можливе використання різних систем доставки вакцин через слизові оболонки, наприклад, на основі живих ослаблених мікроорганізмів, атенуйованих респіраторних вірусів, природних полімерів, (хітозану), ліпосом, полімерних наночастинок, ліпідних емульсій та ін. Розробляються вакцини, до складу яких входить антиген і ад'ювант, інкапсульований в наночастинку, наприклад, в ліпосому. Розроблено технологію отримання мукозальної вакцини на ліпосомальній системі доставки, яка стимулює продукцію антиген-специфічних IgA слизової оболонки та IgG у крові у титрах, здатних ефективно запобігати розвитку інфекції. Вакцина містить: антигенний білок; ад'ювантний носій, що складається з синтетичного пептиду, карбоксивінілового полімеру (CVP) та суміші дипальмітоїлфосфатидилхоліну (DPPC), фосфатидилгліцерину (PG) та пальмітинової кислоти. Причому дана технологія універсальна – можна використовувати антигени різних вірусних патогенів і різні синтетичні пептиди. Згідно із запропонованою технологією активний білок антиген отримують із збудника (вірусу вітряної віспи, кору, епідеміч-

ного паротиту, поліомієліту тощо), інактивують та очищають. Технологічну схему ліпосомальної мукозальної вакцини можна представити так (рис. 3.9):



Рисунок 3.9 – Схема одержання ліпосомальної мукозальної вакцини

*Перевагою ліпосомальної доставки є можливість інкапсуляції антигена у внутрішній простір наночастинки, простота включення, а також те що ліпідні компоненти можуть виконувати функцію ад'ювантів. Продемонстровано ефективність ліпосом з антигеном Adh-036 з *Salmonella typhi**

в комбінації з імуноад'ювантом (β -глюканом із клітинної стінки *Candida albicans*) як пероральної вакцини проти черевного тифу на моделі мишей. Використання ліпосоми як носія може бути сформульоване так, щоб націлюватися на конкретне місце та викликати вивільнення антигена на його мішені. β -глюкан, отриманий із клітинної стінки *C. albicans* як імуномодулятор може посилювати імунну відповідь та підвищувати захист від бактеріальної інвазії *Salmonella typhi*. При цьому захисний тест щодо бактеріальної інвазії показав відсутність бактеріальної колонізації у всіх тканинах кишечника, печінки, селезінки та лімфатичних вузлах брижі (відділ кишківника). Ліпосоми можуть бути засобами доставки вірусних антигенів та діяти як імунні модулятори, запускаючи як вроджений, так і адаптивний імунітет. Імунний захист від інфекційних захворювань є найбільш ефективним, якщо знаходиться у «воротах» проникнення збудника. Необхідно розробляти склади, які можуть індукувати сильний захисний імунітет після перорального, респіраторного або вагіального введення. Поєднання ад'ювантів для слизових оболонок, з огляду на прогрес технології наночастинок, забезпечує привабливе вирішення цих проблем, зокрема ліпосомальна технологія ідеальна для об'єднання білкового антигена та ад'юванту з метою підвищення ефективності вакцини для слизових оболонок.

Важливим шляхом доставки вакцин є *інтраназальний шлях*. Щоб оцінити можливість інтраназальної вакцинації необхідно представляти структуру носа. Декілька факторів впливають на дизайн назальної вакцини та імунні реакції слизових оболонок. Одним із таких факторів є фізіологічна будова порожнини носа. Порожнина носа ділиться на вестибулярний, дихальний та нюховий відділи. Вистилка порожнини носа складається з епітелію, базальної мембрани та власної пластинки, які покриті шаром тканинної структури, відомої як слизова оболонка носа. Слизова оболонка носа людини має велику площу поверхні – 150 см², що забезпечує велику площу для абсорбції антигена. Базальний шар ендотелію називають підслизовою оболонкою, яка багата на кровоносні судини і, отже, сприяє абсорбції вакцинних антигенів. На поверхні носової порожнини клітини епітелію щільно з'єднані між собою, утворюючи особливий фізичний бар'єр, що перешкоджає проникненню антигенних частинок подібно до активного захисту від патогенних мікроорганізмів.

Перспективною є жива атенуйована інтраназальна вакцина BPZE1 для імунізації проти кашлюкової інфекції.

За останні роки з'явилися роботи зі створення інтраназальних вакцин, причому в комплексі із системами доставки та ад'ювантами. Як системи доставки запропоновано використовувати ліпосоми. Так, запропоновані катіонні ліпосоми, що складаються, наприклад, з 1,2-диолеїл-3-триметиламоній пропану (DOTAP) та холестерину 3 β -N(диметитламіноетил)карбамат (DC-chol). Автори використовували пневмококову назальну вакцину, що складається з поверхневих білків пневмокока А (PspA), укладеного у катіонні ліпосоми. На моделі *S. pneumoniae* виявлено захисні антитіла проти білка PspA. Автори пропонують цю вакцину як кандидата для захисту від інфекції *S. pneumoniae*. Виявлено посилення поглинання PspA назальними дендритними клітинами.

Катіонні ліпосоми CAF09b, що містять агоніст TLR3, при інтраназальному введенні тваринам індують реакцію інтерферону та противірусну активність в уражених тканинах. Виявлено збільшення вроджених імунних клітин у носі та легенях та посилення експресії генів, пов'язаних з інтерфероном. Запропоновано використовувати інтраназальне введення вакцини для лікування грипу у мишей.

Показана ефективність використання вакцин на основі ліпосом (DOTAP та DC-chol) з включеною мРНК. Використовували модель на мишах із перевитою агресивною пухлиною раку легень Льюїса. Встановлено високе поглинання вакцини імунними клітинами при інтраназальному введенні. Отримані результати свідчать, що катіонні ліпосоми з мРНК можуть забезпечити основу для протипухлинної вакцини. Встановлено також можливість використання інтраназальних ліпосомальних вакцин для боротьби з іншими інфекціями.

Єдиною схваленою інтраназальною тривалентною вакциною є *FluMist*® (*Fluenz*®), яка використовується в клінічній практиці у США з 2003 р. У лютому 2012 р. FDA схвалило *FluMist*® *Quadrivalent* для осіб віком від 2 до 49 років, що свідчило про завершення переходу від тривалентної до чотиривалентної назальної живої вакцини. Генетично сконструйований вірус у *FluMist*® є адаптованим до холоду, чутливим до температури, атенуйованим вірусом грипу. Цей вірус здатний реплікуватися при 25 °C, а не при 37 °C, що дозволяє припустити, що жива форма цього вірусу може інфікувати і реплікуватися тільки в клітинах слизової оболонки

носоглотки, що посилює захоплення та доставку антигена, індукуючи тим самим патерн імунітету, аналогічний індукованому при природному зараженні.

Підсумовуючи матеріал цього розділу, варто зазначити, що *мукозальні та інтраназальні вакцини мають ряд переваг у порівнянні зі звичайними інактивованими вакцинами*: простоту введення; здатність індукувати системний та місцевий імунітет; здатність, наприклад, при інтраназальному введенні індукувати появу IgA не тільки в носоглотці, але і в кишківнику, піхві, що особливо важливо при профілактиці вірусних інфекцій, які передаються статевим шляхом.

3.8. Рибосомальні вакцини

Рибосоми – органели, які продукують білок на матриці мРНК. Виділені рибосоми з матрицею в чистому вигляді і є *рибосомальною вакциною*. Сьогодні поширення набули такі рибосомальні вакцини, як «Бронхомунал®», «IPC-19®», «Рибомуніл» тощо. Рибосомальні вакцини являють собою виділену з мікроорганізмів рибосомальну фракцію, яка має імуногенні властивості: здатність індукувати синтез антитіл і захищати тварин / людину від зараження відповідним мікроорганізмом.

Вперше рибосомальна вакцина була отримана в 1965 році з *M. tuberculosis*. У наступні 20 років було отримано рибосомальні вакцини з різних мікроорганізмів: *Salmonella*, *St. aureus*, *N. meningitides*, *V. cholerae*, *Streptococcus*, *Haemophilus influenzae* та ін. Суміш рибосомальних фракцій патогенних стафілококів, стрептококів, диплококів була досліджена в клініці як аерозольна вакцина, призначена для щоденних інгаляцій протягом кількох тижнів. Як ад'ювант до складу таких рибосомальних вакцин був введений пептидоглікан, виділений з *Klebsiella pneumoniae*. Вакцинація приводила до підвищення титрів відповідних антитіл та зниження частоти застудних захворювань у вакцинованих. Протективна активність рибосомальних вакцин може бути пов'язана з адсорбованими на рибосомах молекулами бактеріальних антигенів. Внаслідок цього з'єднання антигенних детермінант з рецепторами імунокомпетентних клітин може протікати більш ефективно. Безперечний інтерес становлять експериментальні роботи з використання вакцини для запобігання карієсу зубів, отриманої зі *Streptococcus mutalis*.

Схема отримання рибосомальних вакцин включає дезінтеграцію бактерій при температурі 2–4 °С у присутності додецилсульфату натрію з наступним ступінчастим диференціальним центрифугуванням. Спочатку видаляють фрагменти клітин, мітохондрії, ядра при 18000 g протягом 30–60 хв, а потім осаджують рибосоми ультрацентрифугуванням при 100 000 g протягом 90–120 хв. Наступним етапом є стадія очищення рибосом (можна проводити центрифугуванням у градієнті щільності, наприклад, сахарози 10–30 %), стерилізуючої фільтрації та ліофілізації продукту. Запропоновано також спосіб отримання рибосом, що дозволяє відмовитися від використання ультрацентрифугування: після дезінтеграції клітин проводять центрифугування для видалення незруйнованих клітин та їх фрагментів; до супернатанту додають буферний розчин (20 mM MgCl₂, 10 mM NaH₂PO₄, рН – 7,2) та 50 % поліетиленгліколь (6000) до кінцевої концентрації 10 %; осад рибосом відокремлюють центрифугуванням, звільняють від залишків ПЕГ і ліофілізують. Перевагою даного методу автори вважають відсутність ультрацентрифугування та краще очищення від ендотоксинів.

Прикладом рибосомальних вакцин, широко представленим на фармацевтичному ринку, є препарат «Рибомуніл» (*Pierre Fabre Medicament Production*, Франція), що випускається у вигляді таблеток. Кожна таблетка містить 0,25 мг бактеріальних рибосом (35 % рибосом *Klebsiella pneumoniae*, 30 % рибосом *Diplococcus pneumoniae*, 30 % рибосом *Streptococcus pyogenes*, 5 % рибосом *Haemophilus influenzae* і 0,375 мг протеогліканів мембрани *Klebsiella pneumoniae*). Препарат має імунокорегуючу дію, поєднує властивості вакцини та неспецифічного імуностимулятора. До складу «Рибомунілу» входять рибосоми, виділені з бактерій, які найчастіше викликають інфекційні захворювання дихальних шляхів і ЛОР-органів. Рибосомальна фракція препарату стимулює функцію Т- і В-лімфоцитів, забезпечує вакцинуючий ефект (значно перевищує ефект від використання вакцин з цілісних мікробних клітин) шляхом утворення специфічних сироваткових та секреторних антитіл до чотирьох видів найпоширеніших інфекційних бактеріальних збудників. Протеоглікани стимулюють неспецифічні фактори захисту: активують макрофаги та поліморфно-ядерні клітини (фагоцитоз, хемотаксис, адгезія), підвищують синтез альфа-інтерферону, інтерлейкінів 1, 6 та 8, забезпечують поліклональну стимуляцію Т- і В-лімфоцитів, активують клітини-кілери. За наявними

даними, рибосоми в 1000 разів більш імуногенні, ніж цілісні мікробні клітини, оскільки містять весь спектр антигенних структур бактерії. Препарат «Рибомуніл» випускається вже близько 40 років і добре зарекомендував себе у клініці.

Ліофілізовані лізати бактерій, які у своєму складі також містять рибосомальну фракцію бактерій: препарат IPC-19® (*Solvay Pharmaceuticals*, Франція) містить лізати *St. pneumoniae* (тип 1, 2, 3, 5, 8, 12), *St. pyogenes* (група А), *H. influenzae* (тип В), *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria subflava* (різновид *flava*, *perflava*), *St. dysgalactiae* (група С), *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* (група G); препарат «Бронхомунал®» (*Sandoz, Lek Pharmaceuticals*, Словенія) – *St. pneumoniae*, *St. viridans*, *St. pyogenes*, *H. influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *S. Aureus*, *Moraxella catarrhalis*. Препарати підвищують природні захисні сили організму, впливаючи як на гуморальні, так і на клітинні механізми імунітету, вони збільшують кількість циркулюючих Т-лімфоцитів та синтез IgA у слизовій оболонці травного тракту, а також підвищують вміст імуноглобулінів у секреті дихальних шляхів.

Проведено роботи з одержання ліпосомальної форми рибосомальної вакцини проти кандидозу на моделі мишей, заражених кандидою. Дані літератури про рибосомальні (субклітинні) вакцини свідчать про високу імуногенність препаратів та їх нешкідливість щодо доступних технологій отримання препаратів та стабільності готової вакцини при зберіганні в широкому діапазоні температур (від +10 °C до +25 °C).

3.9. Білкові та пептидні вакцини

Розробка вакцини на основі білка є кращою стратегією для багатьох патогенних організмів, у яких поліпептид містить захисні епітопи, враховуючи вищезазначені моменти щодо інактивованих вакцин. Підходи, що беруть за основу білок, побудовані на генетичних, біохімічних та імунологічних методиках, які дозволяють виявляти захисні епітопи та відповідні поліпептиди як можливі вакцинні антигени. Як тільки отримано повну послідовність геномної ДНК (або її частини) або РНК, виявляються відкриті рамки зчитування. Отриману амінокислотну послідовність можна перевірити на наявність структурних властивостей, таких як гомологія з білками

інших споріднених патогенних організмів, які є кандидатами для створення вакцин, або гідрофобні N-кінцеві послідовності, наявність яких передбачає поверхневу локалізацію. Гени експресуються в рекомбінантних клітинах-господарях (наприклад, *E. coli*), а рекомбінантний поліпептид очищається і використовується для імунізації тварин з метою отримання поліклональних антитіл, щоб виявити чи виробляється патогенним організмом цей білок. Антисироватку можна використовувати також для біологічних аналізів (нейтралізація вірусів, опсонізація бактерій), щоб перевірити чи може цей білок бути привабливим кандидатом для створення вакцини. Новий білок може також використовуватися для імунізації та контрольного зараження модельних тварин. Деякі з ранніх застосувань технології геноміки до вірусів мали на меті виявлення вірусу гепатиту С (HCV) та вірусу гепатиту Е (HEV), що призвело до безпосереднього визначення ймовірних вакцинних антигенів. Геномний підхід був застосований і до *Neisseria meningitidis*, під час чого було виявлено кілька ймовірних вакцинних антигенів.

Природні джерела антигенів. Перші білкові вакцини були побудовані на природних джерелах антигенів. У цьому відношенні унікальною є вакцина проти гепатиту В першого покоління. Унікальність полягає в тому, що в ній як джерело вакцинного антигена використовується тканина людини (плазма).

Гепатит В – захворювання, що передається парентеральним або статевим шляхом і є 9-ою причиною захворюваності і смертності на планеті. Інфікування вірусом гепатиту В викликає різні клінічні прояви: блискавичну, гостру, хронічну та приховану форми гепатиту. Блискавична та гостра форми є вкрай важкими, і дають високу смертність. Хронічний гепатит відповідає за поширення вірусу і потенційно може розвинути у цироз та рак печінки. Щороку помирає понад мільйон хронічних вірусоносіїв. Вакцинопрофілактика є єдиним ефективним способом запобігання цьому захворюванню.

Спочатку була створена вакцина для профілактики гепатиту В з плазми людини. Дуже цікавим є досвід, накопичений у ході створення інактивованої вакцини проти вірусу гепатиту В, який, як відомо, не культивується *in vitro* і не розмножується в організмі придатних для широкого використання тварин. Клітини печінки людей, хронічно інфікованих вірусом гепатиту, виділяють надлишок вірусного поверхневого білка, тобто

поверхневого антигена гепатиту В (HBsAg) у кров у вигляді вірусоподібних частинок розміром 22 нм із захисними епітопами. Тому для виробництва вакцини було запропоновано вилучати з плазми клінічно здорових антигеноносіїв поверхневий антиген (HBsAg), очищати та концентрувати його, а потім інактивувати формаліном. Антиген виділяли за допомогою ультрацентрифугування, хроматографії та ферментативної обробки. Отриманий препарат інактивували для знищення вірусу гепатиту В та інших потенційно патогенних для організму людини контамінантів. Препарат проходив клінічні випробування у США, Франції, Англії, Голландії, Японії. Однак, у зв'язку з технологічними труднощами при отриманні вакцини, обмеженістю в сировині та можливості контамінації препарату, ця вакцина не набула широкого застосування.

З 1987 р. стали доступні дві *дріжджові рекомбінантні вакцини*, які містять HBs-Ag, що виробляються лідерами виробництва вакцин: *Merck&Co* (США) і *GlaxoSmithKline* (Бельгія). Оцінка, проведена FDA, визнала безпечність вакцини проти гепатиту В на основі дослідження 12 млн доз, введених дітям віком до 12 місяців. Вакцина продемонструвала високу ефективність захисту від гепатиту В. В даний час, рекомбінантну вакцину для профілактики гепатиту В випускають *GlaxoSmithKline* (Бельгія), *HeberBiotec* (Куба), *Berna Biotech* (Південна Корея), *Instituto Butantan* (Бразилія) та ряд інших виробників. В Україні ця вакцина входить до переліку обов'язкових щеплень.

Білки, очищені з культур *Bordetella pertussis*, комбінуються для створення неклітинних вакцин проти кашлюку, які згодом мають замінити цілісноклітинну вакцину для поточних педіатричних вакцинацій у багатьох розвинених країнах. Залежно від кількості різних білкових антигенів, ці вакцини називають одно-, дво-, три-, чотири- або п'ятикомпонентними. Ці вакцини були зареєстровані на підставі нещодавніх досліджень ефективності. Вони містять токсод кашлюку, підготовка якого описана нижче.

Хімічна інактивація. Багато бактерій виробляють білкові токсини, відповідальні за патогенез інфекції. Кілька десятиліть тому стало відомо, що якщо токсин після інфікування залишався патогенним, антитоксини (антисироватка, збагачена токсин-специфічними антитілами), які були ефективними в нейтралізації активності токсину *in vivo*, можуть запобігти або покращити симптоми. На основі цього прецеденту до складу активних вакцин було впроваджено бактеріальні токсини. Молекули токсину очи-

щаються з бактеріальних культур (наприклад, *Corynebacterium diphtheriae* (D), *Clostridium tetani* (T), *B. pertussis* (P)), проходять детоксикацію шляхом інкубації з хімічним реагентом, таким як формалін або глутаровий альдегід. Токсини, позбавлені токсичних властивостей, називають *токсоїдами, або анатоксинами*. Такими є дві частини (D, T) комбінованої вакцини проти дифтерії, правця і кашлюку (DTP). В основі процесу знешкодження токсину закладено принцип незворотної зміни ділянки його білкової молекули, відповідальної за прояв токсичності, при збереженні антигенної активності. Наприклад, метод детоксикації дифтерійного токсину формальдегідом при температурі 37 °C був запропонований Г. Рамоном у 1924 році. При вивченні механізму анатоксинування було встановлено, що *процес переходу токсину до анатоксину проходить у два етапи*:

1. Перший етап пов'язаний з реакцією між формальдегідом та NH₂-групами білка. У цій реакції утворюється метилоамінна група. Детоксикація дифтерійного токсину відбувається дуже швидко, вже на 1–2 добу спостерігається зниження токсичності на 95 %. Однак таке знешкодження зворотне, і, якщо з препарату видалити надлишок формаліну, токсичність відновлюється (реверсія).

2. На другому етапі відбуваються внутрішньомолекулярні реакції: метилоамінні групи взаємодіють з деякими активними радикалами амінокислот (амідні, індольні, фенольні та інші групи), що призводить до створення стабільних метиленових містків. Стабільного знешкодження можна досягти лише після другого етапу формальдегідної детоксикації – утворення метиленових груп. Другий етап незворотний, він протікає досить повільно (20–40 діб) при температурі 39–40 °C в зоні нейтральних або слабко лужних значень рН і завершується утворенням дифтерійного анатоксину.

Слід зазначити, що умови детоксикації токсинів специфічні кожного виду токсину.

Генетична інактивація. Хімічна процедура отримання анатоксинів має певні недоліки, у тому числі зміна захисних епітопів, що веде до зниження імуногенності, та потенційне повернення до біологічно активного токсину (реверсія). Для отримання стабільних анатоксинів кашлюку створювалася мутація кодонів амінокислот, необхідних для біологічної активності токсину (аденозиндифосфат (ADP) рибозилтрансфераза). Змінений ген замінив собою нативний ген у батьківському організмі, на основі яко-

го потім було отримано імуногенний, але стабільно інактивований анатоксин кашлюку. У вдосконаленому варіанті цієї стратегії в токсин кашлюку було введено дві мутації, щоб зробити неможливим повернення у вихідний стан. Цей подвійний мутант кашлюкового токсину, який також обробляється формаліном у більш м'яких умовах, щоб покращити його імуногенність або стабільність, є компонентом ацелюлярної вакцини кашлюку. У близькому до цього варіанті застосування мутантні культури *C. diphtheriae* піддавали скринінгу для виявлення секреції ферментативно неактивних, але антигенних молекул анатоксину. Подальше клонування та секвенування одного з таких мутантних генів токсину виявило мутацію однієї амінокислоти у ферментативно активному сайті (також ADP-рибозилтрансферази). Цей генетичний анатоксин (CRM197)⁴⁷ є білком-носієм ліцензованої кон'югованої вакцини *H. influenzae* типу b (Hib). Ця технологія застосовувалася також до токсину *V. cholerae* та ін.

Рекомбінантні поліпептиди. Першим застосуванням технології рДНК при виробництві вакцин було створення вакцини проти гепатиту В. Враховуючи те, що отриманий з крові HBsAg показав себе як добре переносима та ефективна вакцина, ген S, який кодує HBsAg, експресували в пекарських дріжджах *S. cerevisiae*, що приводило до утворення частинок HBsAg розміром 22 нм усередині клітин. Поверхня HBsAg подібна до поверхні віріонів HBV. Дріжджова вакцина стала доступна у всьому світі у великих кількостях і значною мірою витіснила вакцину на основі плазми. Крім того, HBsAg експресували в трансгенному листі тютюну та бульбах картоплі, виділений та очищений HBsAg зберігав високу імуногенність.

Наразі проводяться численні наукові дослідження застосування технології рДНК у виробництві білків – можливих компонентів вакцин. Основний поверхневий білок *Borrelia burgdorferi* (OspA), експресований в *E. coli* у вигляді рекомбінантного ліпопротеїну, був зареєстрований як вакцина проти хвороби Лайма. Отримані рекомбінантним шляхом глікопротеїни HSV, експресовані в клітинах яєчників китайського хом'яка (CHO) та введені у вакцину, були досліджені у клінічних випробуваннях.

Найчастіше великі частинки є більш імуногенними, ніж окремі поліпептиди. Як і у випадку VLP-HBsAg, частинки зазвичай стимулюють вироблення антитіл на конформаційні епітопи, тоді як ізольовані поверхневі поліпептиди можуть не стимулювати вироблення таких антитіл. Віріон вірусу папіломи людини (HPV) – це високоорганізована структура, основ-

ним білком якої є L1. Експресія L1 в еукаріотичних клітинах (наприклад, *S. cerevisiae*) приводить до утворення VLP-L1, які після імунізації стимулюють вироблення антитіл, які зв'язуються з віріонами. Рекомбінантні VLP ротавірусу та парвовірусу також експресувалися у вигляді потенційних батьківських вакцин.

Для експресії гетерологічних рекомбінантних генів використовувалися багато клітин-господарів. Крім зазначених раніше *E. coli*, *S. cerevisiae* та СНО, були розроблені системи експресії на основі інших видів бактерій та дріжджів, а також стабільних клітинних ліній ссавців, наприклад, клітини нирки африканської зеленої мавпи (*Vero*). Цілі тварини і рослини також можуть використовуватись як господарі для рекомбінантної експресії. Загалом, невеликі білки, які не вимагають посттрансляційних модифікацій, можуть ефективно експресуватися у нативній формі в мікробних системах експресії, на відміну від поліпептидів, яким для імуногенності потрібні посттрансляційні модифікації (наприклад, глікозилювання), тому вони експресуються в стабільних клітинних лініях ссавців, здатних до правильного здійснення таких модифікацій.

Новим підходом в галузі рекомбінантних вакцин є застосування частинок дріжджів *Ту-елемент* як убитих носіїв чужорідних білків. Дріжджовий *Ту-елемент* – це частинка, що збирається в *S. cerevisiae*, яка не здатна до реплікації в організмі ссавців. Можна експресувати ген, що кодує чужорідний білок, спільно з генами *Ту* таким чином, що чужорідні білки разом з білками *Ту* будуть збиратися у змішані частинки. Завдяки тому, що чужорідні білки експресуються на поверхні цих великих частинок, їх імуногенність як вакцинних антигенів може бути посилена.

Носії на основі білків. У багатьох випадках в складі поліпептиду можна ідентифікувати В-клітинні епітопи, проти яких спрямована дія нейтралізуючих антитіл. Багато В-клітинних епітопів є конформаційними, що утворюються внаслідок накладання у тривимірному просторі залишків амінокислот із різних частин поліпептиду. Це означає, що даним епітопам для належної імуногенної презентації потрібен повний поліпептид. На відміну від цього, інші пептидні епітопи лінійні за своєю природою і мають усі антигенні властивості навіть у вигляді коротких лінійних послідовностей довжиною близько 6–20 послідовних амінокислотних залишків поліпептиду. Деякі лінійні епітопи мають слабку імуногенність при їх презентації порівняно з повним поліпептидом. В інших випадках природні пеп-

тиди були б ефективними вакцинними антигенами, якби їх можна було зробити достатньо імуногенними. Лінійні В-клітинні епітопи даного типу були визначені для малярійного циркумспорозоїтного білка (circumsporozoite (CS) – повторна послідовність, яка складається з 4 амінокислотних залишків) і для білка пілей *Pseudomonas aeruginosa*. Обидва поліпептиди містять лінійні епітопи, що розпізнаються антитілами, які нейтралізують відповідні патогенні мікроорганізми, проте цілі поліпептиди слабо стимулюють вироблення таких антитіл. Цікавим є припущення, що це явище може являти собою механізм, за допомогою якого ці та інші патогенні організми еволюціонували з метою уникнення імунологічного контролю, роблячи свої епітопи нейтралізації менш імуногенними.

Застосування таких стратегій (злитий білок, кон'югат, комплексний пептид) до слабо імуногенних лінійних епітопів призвело до імуногенних презентацій, які стимулювали значно вищі титри нейтралізуючих антитіл порівняно з тими, які стимулюються епітопами, презентованими на фоні природного цілого поліпептиду. Проте найефективніша стратегія за показниками кінцевої клінічної ефективності повинна визначатися у кожному конкретному випадку.

Носії на основі злитого білка. Імуногенність лінійних епітопів можна підвищити за допомогою генетичного злиття певних епітопів з білком-носієм, який формує велику частинку з метою кращої імунної презентації пептиду. Зазвичай використовують два білки-партнери у злитті такого типу: HBsAg і ядерний білок гепатиту В (частинка розміром 28 нм, яка кодується вірусом гепатиту В). Злиття може відбуватися за N-кінцем, C-кінцем або внутрішньою частиною поліпептидної послідовності білка-партнера, залежно від того, яке розташування забезпечує найкращу імуногенну презентацію при збереженні ефективного формування частинок.

Носії на основі кон'югатів. Пептид може бути хімічно кон'югованим із білком-носієм. Пептидна послідовність синтезується хімічним шляхом разом з реактивним амінокислотним залишком, за допомогою якого відбувається кон'югація з білком-носієм. Найчастіше як білки-носії в кон'югаті використовують бактеріальні білки, з якими часто стикається людина, наприклад, правцевий токсин, кон'югат якого з малярійним епітопом CS пройшов клінічні випробування.

Носії на основі комплексного пептиду. Можна синтезувати мультимери пептидної послідовності для сумісного зв'язування в повторювані

масиви, що застосовується для пептидних епітопів малярійного CS і gp120 білка HIV-1.

Носії на основі Т-клітинних епітопів. Пептидні епітопи, які розпізнаються цитотоксичними Т-лімфоцитами (CTL), можуть бути корисними імуногенами для профілактики інфекцій, що викликаються такими збудниками як HIV, або для імунотерапії хронічних захворювань, таких як гепатит В. Епітопи пептиду CTL зазвичай є слабкими імуногенами. Тому для імунотерапевтичної вакцини гепатиту В епітоп CTL з ядерного білка HBV був модифікований шляхом ковалентного зв'язування з Т-хелперним епітопом (з токсоїду правця), а також з двома молекулами пальмітинової кислоти. В ході клінічних випробувань було показано, що дана вакцина має достатню імуногенність для стимуляції HBV-специфічних CTL і CTL пам'яті. Меланома-специфічні Т-клітинні епітопи у вигляді пептидів використовувалися в імпульсній обробці дендритних клітин *in vitro* для доставки пацієнту, при цьому спостерігалось деяке зниження розміру пухлини.

Носії на основі полісахаридів. Ряд грамнегативних і грампозитивних бактерій утворюють капсульну структуру, яка містить полісахариди. Здатність бактерій до утворення капсул значною мірою визначає взаємодію між бактеріальними клітинами і організмом господаря при розвитку інфекційного процесу. Капсульні антигени відіграють важливу роль у вірулентності та імуногенності бактерій. Є залежність між наявністю у бактерій капсули та їх токсичністю. Встановлено, що гемолітична активність також властива переважно капсульним формам бактерій. Капсульні антигени здатні пригнічувати фагоцитоз бактерій і створювати умови для розмноження збудників інфекції в організмі господаря. Капсульні полісахариди несуть в собі основну серологічну антигенність бактеріальних видів і успішно взаємодіють з антитілами до даних бактерій. Такі полісахариди являють собою ефективні вакцинні антигени. Як приклад використання полісахаридних вакцин можна навести препарат, що містить очищені капсульні полісахариди *Streptococcus pneumoniae* (*Pneumo 23® / PPV 23, Sanofi Pasteur*, Франція). Вакцина є полівалентною та містить полісахариди з 23 серотипів бактерій, по 25 мг кожного полісахариду в дозі. Використовується для підшкірного та внутрішньом'язового введення. *PPV 23* ефективна проти 90 % нечутливих до пеніциліну пневмококів і 96 % пневмококів, які викликають захворювання. У деяких випадках для конкретного

патогенного організму є єдиний серотип полісахариду, наприклад, Hib проти інвазивного менінгіту. В цьому випадку можна створити моновалентну вакцину. Однак, у більшості випадків мають місце численні серотипи капсульних полісахаридів (близько 90 для *Streptococcus pneumoniae*), і такі вакцини повинні бути мультивалентними, щоб мати достатньо високий рівень загальної ефективності. Ці вакцини першого покоління були просто очищеними полісахаридами і мали низькі протективні властивості.

Гемофільна інфекція (збудник – *Haemophilus influenzae b* (Hib)) є основною причиною гнійного менінгіту у дітей до двох років життя, який часто призводить до серйозних неврологічних ускладнень і летальних наслідків. Крім менінгіту, Hib викликає перикардити, ендокардити, перитоніти та інші гнійно-септичні захворювання. Зараження відбувається повітряно-крапельним шляхом. За даними ВООЗ, щорічно від цих інфекцій помирає близько 500 000 дітей у всіх країнах світу.

У багатьох, якщо не в більшості, вивчених інкапсульованих бактерій, антитіла, спрямовані проти капсульних ПС, здатні захищати проти інфекції. Ці спостереження дозволили використовувати капсульні ПС як вакцинні антигени.

У багатьох, якщо не в більшості вивчених інкапсульованих бактерій, антитіла, спрямовані проти капсульних полісахаридів, здатні захищати від інфекції, що дозволило використовувати капсульні полісахариди як вакцинні антигени.

3.10. Цілісні патогени у складі вакцин (інактивовані вакцини)

Найперший підхід до виготовлення інактивованих вакцин полягає у використанні цілих бактерій або вірусів з метою стимулювання утворення антитіл до багатьох антигенів, деякі з яких зможуть нейтралізувати патогенний організм.

Бактерії. Такі вакцини виготовляються шляхом культивування бактерій, збору клітин та їх інактивації за допомогою нагрівання або хімічних агентів, таких, як мертиолят, фенол, формалін. Кінцева вакцина не піддається подальшому очищенню. Завдяки відсутності очищення таких вакцин, які містять практично всі бактеріальні клітинні компоненти (а також продукти метаболізму і залишкові кількості поживних середовищ), їх реактогенність при парентеральному введенні (наприклад, *B. pertussis* або *St.*

aureus) зазвичай вище, ніж у інших типів вакцин. З іншого боку, інактивовані цілісноклітинні вакцини *V. cholerae* та ентеротоксигенної *E. coli* добре переносяться при пероральному введенні. Пероральна інактивована цілісноклітинна вакцина холери (WCC), позбавлена токсину (і його токсичного впливу), як виявилось, добре переносяться, а рівень її ефективності склав приблизно 60 % при випробуванні на популяції високого ризику протягом 3 років. Для стимуляції антитіл, які зможуть нейтралізувати токсини і підвищити ефективність, рекомбінантна В-субодиниця токсину, яка не має активності токсину, незалежно експресується, очищається і знову додається до вакцини WCC. Показано, що ця комбінована вакцина WCC + г-В-субодиниця токсину має дещо вищий рівень ефективності, ніж сама вакцина WCC.

Віруси. Деякі інактивовані вірусні вакцини використовуються вже протягом десятиліть і зазвичай добре переносяться. Оскільки віруси при вирощуванні на культурі клітин *in vitro*, як правило, виходять у культуральне середовище, то збирають середовище від інфікованих культур, яке не містить клітин. Великий розмір частинок вірусів у порівнянні з іншими макромолекулами середовища дозволяє легко відокремити частинки з використанням простих технологій очищення на основі розділення частинок за розміром. Прикладами таких вакцин є віруси поліомієліту, грипу, сказу та японського енцефаліту. В альтернативному підході, що застосовується у випадку вбитої вірусної вакцини проти гепатиту А (HAV), інфіковані клітини піддають лізису і проводять очищення вірусних частинок. Вірусні частинки інактивуються хімічним шляхом, зазвичай за допомогою обробки формаліном, а потім їх дія може посилюватися за рахунок ад'ювантів (наприклад, гідроксиду або фосфату алюмінію).

Можливе використання ліпосом для посилення імуногенності вірусних вакцин. У Швейцарії в *Swiss Serum and Vaccine Institute* розроблена і ліцензована ліпосомальна вакцина проти гепатиту А – *Epxal® Berna*; фірмою *Lipoxen* запропонована вакцина проти гепатиту В – *HepaXen®*. Тривають розробки й інших вірусних вакцин, наприклад, проти сказу, герпесу. Фірмою *Lipoxen* розроблена платформа *ImtiXen®*, що дозволяє розробляти ліпосомальні форми вакцинних вірусних матеріалів таким чином, щоб імітувати реакцію природного контакту з інфекційним агентом. Технологія *ImtiXen®* викликає сильні імунологічні реакції подібні до тих, які досягаються за допомогою ослаблених вакцин, при цьому повністю

знижає ризик зараження. Як приклад наводимо склад ліпосомальної вакцини для профілактики грипу *Inflexal®V*, виробництва *Berna Biotech* (Швейцарія), що містить фосфатидилхолінові віросоми, очищені гемаглютиніни і нейрамінідазу грипу А і В: А (H1N1) – 15 мкг; А (H3N2) – 15 мкг і В – 15 мкг. Допоміжні речовини: фосфатидилхолін, натрію хлорид, фосфати натрію і калію.

Захисні епітопи на поверхні багатьох некапсульованих дрібних вірусів, які стимулюють захисну імунну реакцію, часто мають конформаційну структуру, будучи сформованими з високоорганізованої сукупності структурних білків в антигенні структури. Для більшості перерахованих вірусів, для яких були розроблені і зареєстровані інактивовані вакцини, виявилось неможливо повністю відтворити конформацію таких епітопів за допомогою інших технологій, наприклад, рекомбінантних поліпептидів. Інактивовані вірусні вакцини зазвичай мають високу імунологічну активність, наприклад, 1 доза вакцини проти гепатиту А забезпечує захист у кількості 50 нг. Таким чином, ця класична стратегія, що характеризується бездоганною історією створення добре переносимих і ефективних вакцин, залишається вельми перспективною технологією, яка обирається для розробки багатьох вірусних вакцин.

3.11. Екзосомальні вакцини. Перспективи отримання

У попередніх розділах ми розглянули вакцини, отримані на основі різних платформ та технологій: бактеріальні, вірусні, живі атенуйовані, інактивовані, вакцини на основі РНК і ДНК та ряд інших. Конкуренцію «класичним» вакцинам вже найближчим часом можуть скласти вакцини на основі позаклітинних молекул, оточених двошаровою ліпідною мембраною, – екзосом.

Екзосоми – це невеликі позаклітинні везикули, природні наночастинки, що відіграють важливу роль у міжклітинних комунікаціях та переносять свій вміст (вантаж) широкого спектру: ліпіди, білки, метаболіти, РНК (мРНК, мікроРНК, довгі некодуючі РНК) і ДНК. Екзосоми вперше були описані в 1983 році. Дослідження, проведені на екзосомах, дали підґрунтя розглядати їх як систему доставки ліків (*drug delivery system*) і антигенів, яка характеризується хімічною, фізичною та біологічною стабільністю, хорошою переносимістю, можливістю промислового масштабування та

функціоналізацією для націлювання на клітини-мішені. Перелічені фактори роблять екзосоми ідеальними наночастинками для створення вакцин різної направленості: протипухлинних, протибактеріальних і противірусних.

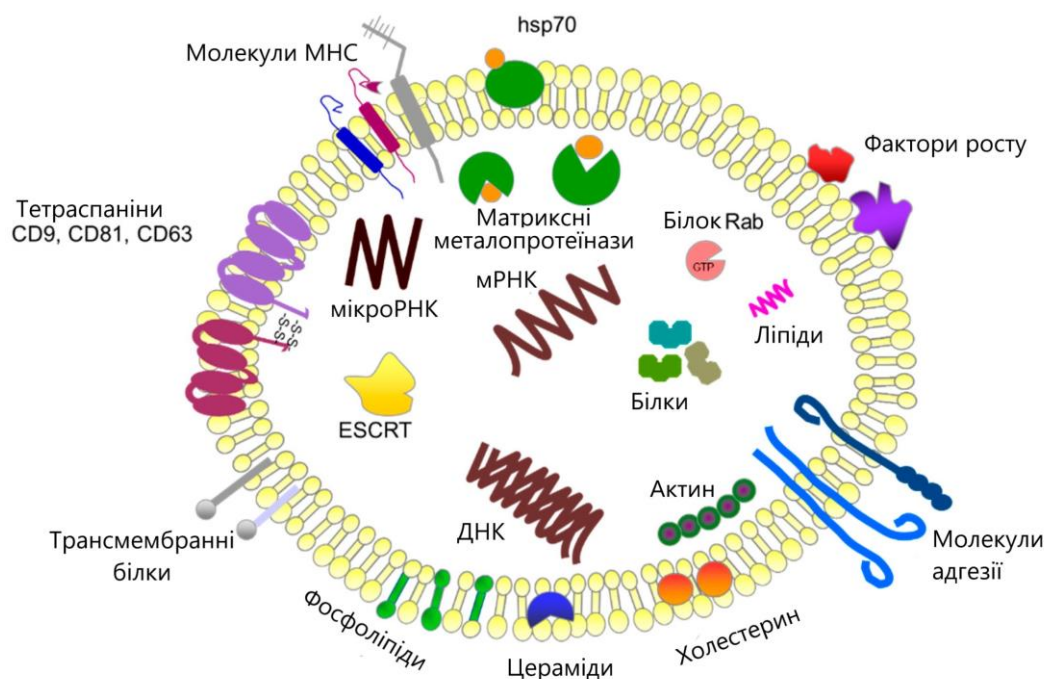


Рисунок 3.10 – Структура екзосоми

Майже всі живі організми, включаючи віруси та бактерії, виділяють екзосоми у позаклітинне середовище. Аналіз показує, що екзосоми містять численні молекули імунної відповіді на поверхні та несуть біологічні месенджери, такі як білки, шаперони, мРНК та фрагменти ДНК. Екзосоми здатні стимулювати Т-клітини та антиапоптозні молекули, що виявляються на їх поверхні і мають деякі імуномодулюючі ефекти. Дослідження показали, що екзосоми також присутні у лімфі. Імунні клітини отримують сигнали від екзосом інших імунних клітин, мікробів, пухлин та неімунних клітин.

Екзосоми клітинного походження стали перспективною платформою для доставки вакцин. Екзосоми сприяють комунікації між клітинами та містять активні молекули, такі як ліпіди, білки, вуглеводи та нуклеїнові кислоти. Дослідження проведені за останні роки підтвердили вирішальну роль екзосом як у фізіологічних, так і патофізіологічних процесах, включаючи презентацію антигена, імунний нагляд за патогенами, міжклітинну передачу сигналів, альтернативну секрецію білка та РНК, перенесення інфекційних агентів. Низка досліджень підтверджує, що екзосоми відігра-

ють ключову роль у патогенезі вірусів. Вони можуть переносити активні молекули між клітинами та модифікувати клітини-мішені. Екзосоми, отримані з непермісивних (клітини, в яких не відбувається репродукція певних вірусів) непаренхіматозних клітин печінки (тобто клітин печінки, в яких вірус не може пройти повний цикл репродукції) можуть індукувати протівірусну активність шляхом вивільнення інтерферону- α (IFN- α) проти вірусу гепатиту В. Протеомний та ліпідомний аналіз також підтвердив, що екзосоми несуть різні біомакромолекули, включаючи білки, ліпіди, повнорозмірні вірусні РНК та регуляторні РНК (наприклад, мікроРНК та малі інтерферуючі РНК). Виявлено, що екзосоми, одержані з макрофагів, оброблених мікобактеріями туберкульозу, індукують антиген-специфічні експресуючі IFN- γ та інтерлейкін 2 (IL-2) CD4⁺ та CD8⁺ Т-клітини. Застосування такої екзосомної вакцини може викликати аналогічну імунну відповідь Т-хелперів типу 1 (Th-1), але обмеженішу відповідь Th-2, ніж вакцина БЦЖ, забезпечуючи кращий захисний імунітет.

Серед вакцинних препаратів, які розробляються в даний час, особливе місце займають вакцини для профілактики та терапії інфекції, викликані *Mycobacterium tuberculosis*. Перспективною формою *drug delivery system* при створенні вакцин проти *M. tuberculosis* є екзосоми. Теоретично екзосоми є багатообіцяючими засобами доставки вакцин та методів лікування завдяки їх природній ліпідній мембранній структурі та нанорозміру. Вакцина на основі екзосом зі специфічними антигенами всередині може активувати множинні імунні відповіді через різні шляхи презентації антигена. Дослідники розробили нову вакцину на основі зшитого білка Ag85B/ESAT-6, експресованого в екзосомах, який може бути додатково введений для активації антиген-специфічних Т-лімфоцитів, що секретують IFN- γ , у легенях та селезінці.

Роль екзосом при зараженні *M. tuberculosis* ще вимагає вивчення: необхідно визначити, як екзосоми допомагають *M. tuberculosis* уникнути імунної атаки, а також спробувати використати антибактеріальну функцію екзосом для лікування туберкульозу. Екзосоми, які несуть мікобактеріальні антигени, можуть суттєво захищати мишей від інфекції *M. tuberculosis*, що вказує на потенціал екзосом як нової безклітинної вакцини, націленої на інфекцію *M. tuberculosis*. Екзосоми інфікованого *M. tuberculosis* можуть індукувати аутофагію для знищення *M. tuberculosis in vitro*, а також зменшити мікобактеріальне навантаження у легенях мишей з меншим пошко-

дженням тканин. Ці дослідження свідчать про те, що екзосоми можуть бути кандидатами у носії для доставки вакцин або ліків. Екзосоми мають успадковану від батьківських клітин здатність посилювати імунітет проти *M. tuberculosis* традиційними шляхами, включаючи макрофаги, дендритні клітини та нейтрофільні гранулоцити. Ці імунні реакції проти *M. tuberculosis* можуть бути спричинені деякими регуляторними білками в екзосомах, такими як білок теплового шоку. Крім того, показано, що мікобактеріальні екзосоми мають імуномодуючі властивості при вродженому та адаптивному імунітеті. Мікобактеріальні екзосоми генеруються і циркулюють під час внутрішньоклітинної інфекції, допомагають визначити інші потенційні ролі цих екзосом у взаємодіях господар-патоген.

Показано, що *екзосоми, отримані з пухлинних клітин*, які були генетично модифікованих для експресії ранньої секреторної антигенної мішені-6 (ESAT-6) з *M. tuberculosis*, діють як *потенційна протиракова вакцина*.

Необхідно окремо зупинитися на питанні створення протипухлинних вакцин. Показано, що *екзосоми модулюють прогресування раку*. У випадку екзосом пухлинного походження екзосомний вантаж несе програму про-епітеліально-мезенхімального переходу (процес зміни епітеліальними клітинами епітеліального фенотипу на мезенхімальний, наприклад, при прогресії пухлини), включаючи індукований гіпоксією фактор 1 альфа (HIF1 α), β -катенін (білок, який знаходиться у комплексі з кадгеринами – молекулами клітинної адгезії), кавеолін-1 (експресується на ендотеліальній волокнистій та жировій тканині, належить до групи мембранних білків рецептор незалежного ендоцитозу) та трансформуючий фактор росту (TGF- β), які посилюють міграційну здатність та інвазію клітин-реципієнтів. На думку вчених, пухлинні екзосоми сприяють формуванню преметастатичних ніш та ремоделюванню строми. Пухлинні екзосоми також несуть ендогенні пухлинні антигени та індукують протипухлинний імунітет за допомогою перенесення пухлинних антигенів в антигенпрезентуючі клітини, такі як дендритні клітини.

Отже, виділені з пухлини екзосоми потенційно можуть застосовуватися як протиракова вакцина для індукції імунних відповідей, специфічних до пухлинних антигенів, без очищення пухлинних антигенів. Як імунотерапевтичний засіб екзосоми, отримані з В-клітин і дендритних клітин, можуть навантажуватися білками (антигенами) або пептидами, демонструючи здатність індукувати систематичну антиген-специфічну відповідь

В-і Т-клітин. Екзосоми з дендритних клітин також обіцяють більш точно ініціювати імунну відповідь проти пухлинних клітин порівняно з клітинною терапією та іншою неклітинною терапією.

Цікаві результати були отримані для лікування гепатоцелюлярної карциноми. Це одна з найбільш летальних злоякісних пухлин у всьому світі через високу смертність, неадекватну відповідь на лікування та агресивний характер. Імунотерапія на основі дендритних клітин перспективна, але досить дорога, а виділення та приготування препарату є тривалим та складним процесом. Крім того, дендритні клітини мають дуже низький період напіврозпаду. Екзосоми, отримані з дендритних клітин, які несуть білки, МНС I та II класів та інші коstimулюючі молекули, можуть використовуватися як альтернатива дендритним клітинам для імунотерапії раку. Показано, що пухлинні антигенні пептиди, отримані з дендритних клітин, індукують сильну імунну супресію і викликають імунну відповідь у мишей з мастоцитомою та карциномою молочної залози. Нещодавнє клінічне дослідження екзосом, отриманих з дендритних клітин, проведене на пацієнтах з прогресуючою меланомою, показало перспективні результати.

Розуміння ролі екзосом в імунних реакціях на летальні захворювання та їх патогенез стане ключовим завданням для використання екзосом при розробці вакцин. Екзосома як засіб доставки вакцини стає новою платформою для лікування раку та інфекційних захворювань. Протягом багатьох років платформи на основі наночастинок досліджувалися в галузі доставки вакцин як засіб доставки вірусів на основі невірусних векторів. Серед багатьох наночастинок екзосоми мають унікальні переваги завдяки їх внутрішньому зв'язку між клітинами та взаємодії з імунною системою людини при багатьох патологічних станах.

Запитання для самоконтролю

1. Які технології одержання вакцин відносять до «класичних»?
2. У чому перевага реасортантних вірусів у виробництві вакцин?
3. У чому переваги та недоліки бактерій як продуцентів гетерологічного білка? Які штами бактерій найчастіше використовуються у технології рекомбінантних ДНК?
4. У чому переваги та недоліки дріжджів як продуцентів гетерологічного білка? Які штами дріжджів найчастіше використовуються у технології рекомбінантних ДНК?

5. У чому переваги та недоліки клітин тварин та хомак як продуцентів гетерологічного білка? Які культури клітин тварин і комах використовуються на практиці?
6. У чому переваги та недоліки рослин як продуцентів гетерологічного білка? Які рослини використовуються на практиці для отримання імунобіологічних препаратів?
7. Які елементи мають бути у рекомбінантній плазміді, щоб забезпечити ефективну експресію гена?
8. Як здійснюється доставка антигена в організм у випадку ДНК-вакцин?
9. Проти яких захворювань створюють полісахаридні вакцини?
10. В чому особливості мукозальних вакцин? Які комерційні мукозальні вакцини Вам відомі?
11. У чому переваги і недоліки білкових та пептидних вакцин?
12. Яку функцію виконують екзосоми в організмі?

Список джерел інформації до розділу 3

1. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1-3.
2. Емец А. И. Библиотечная трансформация сои с использованием нового селективного маркерного гена устойчивости к динитроанилинам / А. И. Емец, В. В. Радчук, А. В. Пахомов, Я. Б. Блюм // Цитология і генетика. – 2008. – Т. 42, № 6. – С. 61-68.
3. Краснопольский Ю. М. Биотехнология иммунобиологических препаратов: монография / Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская. – Харьков : Фармитек, 2008. – 312 с.
4. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов : учеб. пособ. / Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2009. – 351 с.
5. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ. Часть I : учеб. пособ. / Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2012. – 303 с.
6. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ. Часть II : учеб. пособ. /

- Ю. М. Краснополяский, Н. Ф. Клещев. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2013. – 192 с.
7. Краснополяский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: аспекты фармацевтической химии : учеб. пособ. / Ю. М. Краснополяский, О. В. Звягинцева. – Харьков : НТУ "ХПИ", 2018. – 247 с.
 8. Краснополяський Ю. М. Фармацевтична біотехнологія: Біотехнології виробництва готових лікарських форм : навч. посіб. / Ю. М. Краснополяський, Д. М. Пилипенко. – Харків : ТОВ «ДРУКАРНЯ МАДРИД», 2020. – 279 с.
 9. Краснополяський Ю. М. Фармацевтична біотехнологія: сьогодення та майбутнє : навч. посіб. / Ю. М. Краснополяський, Д. М. Пилипенко. – Харків : ТОВ «Друкарня Мадрид», 2022. – 151 с.
 10. Краснополяський Ю. М. Створення систем доставки антигенів та ліків на основі штучних і природних ліпідних наночастинок: ліпосоми та екзосоми : монографія / Ю. М. Краснополяський, Д. М. Пилипенко. – Харків : Друкарня Мадрид, 2023. – 179 с.
 11. Чернишева Л. І. Імунопрофілактика інфекційних хвороб: навч.-метод. посіб. / Л. І. Чернишева, Ф. І. Лаптії, А. Н. Волока та ін. – Київ : «Медицина», 2022. – 336 с.
 12. Чернишева Л. І. Сучасні технології виготовлення вакцин. / Л. І. Чернишева, Ф. І. Лаптії // Здоров'я дитини. – 2014. – №4(55). – С. 167-171.
 13. Afkhami S. Respiratory mucosal delivery of next-generation COVID-19 vaccine provides robust protection against both ancestral and variant strains of SARS-CoV-2. / S. Afkhami, M. R. D'Agostino, A. Zhang et al. // Cell. – 2022. – V.185(5). – ID 896–915.e19. – <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.02.005>
 14. Alves C. S. Strategies and Considerations for Improving Expression of "Difficult to Express" Proteins in CHO Cells. / C. S. Alves, T. M. Dobrowsky // Methods in molecular biology. – 2017. – V.1603. – P. 1–23. – https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6972-2_1
 15. Anggraeni R. Development of mucosal vaccine delivery: an overview on the mucosal vaccines and their adjuvants. / R. Anggraeni, I. D. Ana, H. Wihadmadyatami // Clinical and experimental vaccine research. – 2022. – V.11(3). – P. 235–248. – <https://doi.org/10.7774/cevr.2022.11.3.235>
 16. Aw R. Production and purification of an active CRM197 in Pichia pastoris and its immunological characterization using a Vi-typhoid antigen vaccine. / R. Aw, M. R. Ashik, A. A. Z. M. Islam et al. // Vaccine. – 2021. – V.39(51). – P. 7379–7386. – <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.10.083>
 17. Baker J. R. The unfulfilled potential of mucosal immunization. The Journal of allergy and clinical immunology. / J. R. Baker, M. Farazuddin, P. T. Wong, J.

- J. O'Konek // – 2022. – V.150(1). – P. 1–11. – <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.05.002>
18. Barrett P. N. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. / P. N. Barrett, W. Mundt, O. Kistner, M. K. Howard // Expert review of vaccines. – 2009. – V.8(5). – P. 607–618. – <https://doi.org/10.1586/erv.09.19>
 19. Bellier B. A Thermostable Oral SARS-CoV-2 Vaccine Induces Mucosal and Protective Immunity. / B. Bellier, A. Saura, L. A. Luján et al. // Frontiers in immunology. – 2022. – V.13. – ID 837443. – <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.837443>
 20. Bermúdez-Humarán L. G. A novel mucosal vaccine based on live Lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. / L. G. Bermúdez-Humarán, N. G. Cortes-Perez, F. Lefèvre et al. // Journal of immunology. – 2005. – V.175(11). – P. 7297–7302. – <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7297>
 21. Bernasconi V. Mucosal Vaccine Development Based on Liposome Technology. / V. Bernasconi, K. Norling, M. Bally et al. // Journal of immunology research. – 2016. – V. 2016. – ID 5482087. – <https://doi.org/10.1155/2016/5482087>
 22. Bevan M. Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. / M. Bevan // Nucleic acids research. – 1984. – V.12(22). – P. 8711–8721. – <https://doi.org/10.1093/nar/12.22.8711>
 23. Bolaños-Martínez O. C. Plant-made poliovirus vaccines – Safe alternatives for global vaccination. / O. C. Bolaños-Martínez, R. Strasser // Frontiers in plant science. – 2022. – V.13. – ID 1046346. – <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1046346>
 24. Bonnie D. Recombinant Protein Bioprocessing. / D. Bonnie // Pharmaceutical Bioprocessing. – 2023. – V. 11(2). – P. 19-21. – [https://doi.org/10.37532/2048-9145.2023.11\(2\).19-21](https://doi.org/10.37532/2048-9145.2023.11(2).19-21)
 25. Bruhn K. W. Listeria as a vaccine vector. / K. W. Bruhn, N. Craft, J. F. Miller // Microbes and infection. – 2007. – V. 9(10). – P. 1226–1235. – <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.010>
 26. Carratalá J. V. Enhanced recombinant protein capture, purity and yield from crude bacterial cell extracts by N-Lauroylsarcosine-assisted affinity chromatography. / J. V. Carratalá, J. Atienza-Garriga, H. López-Laguna et al. // Microbial cell factories. – 2023. – V.22(1). – P. 81. – <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02081-7>
 27. Chan H. T. Cold chain and virus-free chloroplast-made booster vaccine to confer immunity against different poliovirus serotypes. / H. T. Chan, Y. Xiao,

- W. C. Weldon et al. // *Plant biotechnology journal*. – 2016. – V.14(11). – P. 2190–2200. – <https://doi.org/10.1111/pbi.12575>
28. Chorobik P. Therapeutic vaccines based on genetically modified Salmonella: a novel strategy in cancer immunotherapy. / P. Chorobik, J. Marcinkiewicz // *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*. – 2011. – V.121(12). – P. 461–466.
 29. Chua B. Y. Immunization with inactivated whole virus particle influenza virus vaccines improves the humoral response landscape in cynomolgus macaques. / B. Y. Chua, T. Sekiya, M. Koutsakos et al. // *PLoS pathogens*. – 2022. – V.18(10). – P. e1010891. – <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010891>
 30. Chung Y. H. Viral nanoparticles for drug delivery, imaging, immunotherapy, and theranostic applications. / Y. H. Chung, H. Cai, N. F. Steinmetz // *Advanced drug delivery reviews*. – 2020. – V.156. – P. 214–235. – <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.024>
 31. Coates R. J. Optimising expression and extraction of recombinant proteins in plants. / R. J. Coates, M. T. Young, S. Scofield // *Frontiers in plant science*. – 2022. – V.13. – ID 1074531. – <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1074531>
 32. Cox M. M. FluBlok, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells. / Cox M. M., Hollister J. R. // *Biologicals*. – 2009. – V.37(3). – P. 182–189. – <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.02.014>
 33. da Silva A. J. Live bacterial vaccine vectors: an overview / A. J. da Silva, T. C. Zangirolami, M. T. Novo-Mansur et al. // *Brazilian journal of microbiology*. – 2015. – V. (4). – P. 1117–1129. – <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000400001>
 34. de Pinho Favaro M. T. Recombinant vaccines in 2022: a perspective from the cell factory. / M. T. de Pinho Favaro, J. Atienza-Garriga, C. Martínez-Torro et al. // *Microbial cell factories*. – 2022. – V.21(1). – ID 203. – <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01929-8>
 35. Diaz G. Changes in the Membrane-Associated Proteins of Exosomes Released from Human Macrophages after Mycobacterium tuberculosis Infection. / G. Diaz, L. M. Wolfe, N. A. Kruh-Garcia, K. M. Dobos // *Scientific reports*. – 2016. – V.6. – ID 37975. – <https://doi.org/10.1038/srep37975>
 36. Dou Y. The CAG promoter maintains high-level transgene expression in HEK293 cells. / Y. Dou, Y. Lin, T. Y. Wang et al. // *FEBS open bio*. – 2021. – V.11(1). – P. 95–104. – <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13029>
 37. Eckstein M. Liposomes containing Candida albicans ribosomes as a prophylactic vaccine against disseminated candidiasis in mice. / M. Eckstein, Y. Barenholz, L. K. Bar, E. Segal // *Vaccine*. – 1997. – V.15(2). – P. 220–224. – [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(96\)00137-5](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(96)00137-5)

38. Eisenstein T. K. Ribosomal vaccines: a review. / T. K. Eisenstein // In: New Trends and Developments in Vaccines / Voller A., Friedman H. (eds). – Dordrecht: Springer, 1978. – https://doi.org/10.1007/978-94-011-6630-0_14
39. Escudier B. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. / B. Escudier, T. Dorval, N. Chaput et al. // Journal of translational medicine. – 2005. – V.3(1). – ID 10. – <https://doi.org/10.1186/1479-5876-3-10>
40. Fang N. X. Differences in the post-translational modifications of human papillomavirus type 6b major capsid protein expressed from a baculovirus system compared with a vaccinia virus system. / N. X. Fang, I. H. Frazer, G. J. Fernando // Biotechnology and applied biochemistry. – 2000. – V.32(1). – P. 27–33. – <https://doi.org/10.1042/ba20000001>
41. Gonzalez-Castro R. Plant-based chimeric HPV-virus-like particles bearing amyloid- β epitopes elicit antibodies able to recognize amyloid plaques in APP-tg mouse and Alzheimer's disease brains. / R. Gonzalez-Castro, G. Acero Galindo, Y. García Salcedo et al. // Inflammopharmacology. – 2018. – V.26(3). – P. 817–827. – <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0408-2>
42. Gopal R. Production and Application of Insect Virus-Based VLPs. / R. Gopal, A. Schneemann // Methods in molecular biology. – 2018. – V.1776. – P. 125–141. – https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7808-3_8
43. Gregory R. L. Microbial ribosomal vaccines. / R. L. Gregory // Reviews of infectious diseases. – 1986. – V.8(2). – P. 208–217. – <https://doi.org/10.1093/clinids/8.2.208>
44. Gupta J. Production of a Hepatitis E Vaccine Candidate Using the Pichia pastoris Expression System. / Gupta J., Kumar A., Surjit M. // Methods in molecular biology. – 2022. – V.2412. – P. 117–141. – https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1892-9_7
45. Hacker D. L. Recombinant protein production from stable mammalian cell lines and pools. / D. L. Hacker, S. Balasubramanian // Current opinion in structural biology. – 2016. – V.38. – P. 129–136. – <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.06.005>
46. Heath P. T. Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine. / Heath P. T., Galiza E. P., Baxter D. N. et al. // The New England journal of medicine. – 2021. – V.385(13). – P. 1172–1183. – <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107659>
47. Huda M. N. Potential Application of Exosomes in Vaccine Development and Delivery. / Huda M. N., Nurunnabi M. // Pharmaceutical research. – 2022. – V.39(11). – P. 2635–2671. – <https://doi.org/10.1007/s11095-021-03143-4>
48. Johnson W. Ribosomal vaccines. I. Immunogenicity of ribosomal fractions isolated from *Salmonella typhimurium* and *Yersinia pestis*. / Johnson W. //

- Infection and immunity. – 1972. – V.5(6). – P. 947–952. – <https://doi.org/10.1128/iai.5.6.947-952.1972>
49. Kakhi Z. Liposomal constructs for antitumoral vaccination by the nasal route. / Z. Kakhi, B. Frisch, B. Heurtault, F. Pons // Biochimie. – 2016. – V.130. – P. 14–22. – <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.07.003>
 50. Kar B. Evaluation of ribosomal P0 peptide as a vaccine candidate against *Argulus siamensis* in *Labeo rohita* / B. Kar, A. Mohapatra, J. Mohantys, R. K. Sahoo // Open Life Sciences. – 2017. – V.12(1). – P. 99-108. – <https://doi.org/10.1515/biol-2017-0011>
 51. Karch C. P. Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. / C. P. Karch, P. Burkhard // Biochemical pharmacology. – 2016. – V.120. – P. 1–14. – <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.05.001>
 52. Kiesslich S. Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines. / S. Kiesslich, A. A. Kamen // Biotechnology advances. – 2020. – V.44. – ID 107608. – <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107608>
 53. Kishore K. Pharmacology of Recombinant or Genetically Engineered Drugs. / K. Kishore, P. Krishan // Journal of Young Pharmacists. – 2009. – V. 11(2). – P. 141-150. – <https://doi.org/10.4103/0975-1483.55747>
 54. Kiyono H. Mucosal vaccines: wisdom from now and then. / Kiyono H., Yuki Y., Nakahashi-Ouchida R., Fujihashi K. // International immunology. – 2021. – V.33(12). – P. 767–774. – <https://doi.org/10.1093/intimm/dxab056>
 55. Koyama Y. Exosomes derived from tumor cells genetically modified to express Mycobacterium tuberculosis antigen: a novel vaccine for cancer therapy. / Y. Koyama, T. Ito, A. Hasegawa et al. // Biotechnology letters. – 2016. – V.38(11). – P. 1857–1866. – <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2185-1>
 56. Kumar R. Yeast-based vaccines: New perspective in vaccine development and application. / R. Kumar, P. Kumar // FEMS yeast research. – 2019. – V.19(2). – ID foz007. – <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz007>
 57. Kumar S. Intranasal immunization with peptide-based immunogenic complex enhances BCG vaccine efficacy in a murine model of tuberculosis. / R. Kumar, P. Kumar // JCI insight. – 2021. – V.6(4). – ID e145228. – <https://doi.org/10.1172/jci.insight.145228>
 58. Lavelle E. C. Mucosal vaccines - fortifying the frontiers. / E. C. Lavelle, R. W. Ward // Nature reviews. Immunology. – 2022. – V.22(4). – P. 236–250. – <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00583-2>

59. Lee J.-H., Hansen H. G., Park S.-H. et al. // Transient gene expression-based protein production in recombinant mammalian cells. *Cell Culture*. – 2019. – V. 23. – P. 49–72. – <https://doi.org/10.1002/9783527811410.ch3>
60. Lee L. Y. Y. A Review of DNA Vaccines Against Influenza. / L. Y. Y. Lee, L. Izzard, A. C. Hurt // *Frontiers in immunology*. – 2018. – V.9. – ID 1568. – <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01568>
61. Li Z. M. Factors Affecting the Expression of Recombinant Protein and Improvement Strategies in Chinese Hamster Ovary Cells. / Z. M. Li, Z. L. Fan, X. Y. Wang, , T. Y. Wang // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. – 2022. – V.10. – ID 880155. – <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.880155>
62. Lung P. Nanoparticle formulated vaccines: opportunities and challenges. / Lung P., Yang J., Li Q. // *Nanoscale*. – 2020. – V.12(10). – P. 5746–5763. – <https://doi.org/10.1039/c9nr08958f>
63. Ma H. Identification of a novel rhabdovirus in *Spodoptera frugiperda* cell lines. / H. Ma, T. A. Galvin, D. R. Glasner et al. // *Journal of virology*. – 2014. – V.88(12). – P. 6576–6585. – <https://doi.org/10.1128/JVI.00780-14>
64. Mehaffy C. Extracellular Vesicles in *Mycobacteria* and Tuberculosis. / Mehaffy C., J. M. Ryan, N. A. Kruh-Garcia, K. M. Dobos // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2022. – V.12. – ID 912831. – <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.912831>
65. Maharjan P. M. Plant-Based COVID-19 Vaccines: Current Status, Design, and Development Strategies of Candidate Vaccines. / P. M. Maharjan, S. Choe // *Vaccines*. – 2021. – V.9(9). – ID 992. – <https://doi.org/10.3390/vaccines9090992>
66. Mai Y. Intranasal delivery of cationic liposome-protamine complex mRNA vaccine elicits effective anti-tumor immunity. / Y. Mai, J. Guo, Y. Zhao et al. // *Cellular immunology*. – 2020. – V.354. – ID 104143. – <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104143>
67. Margolin E. A. Engineering the Plant Secretory Pathway for the Production of Next-Generation Pharmaceuticals. / E. A. Margolin, R. Strasser, R. Chapman et al. // *Trends in biotechnology*. – 2020. – V.38(9). – P. 1034–1044. – <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.03.004>
68. Mariano I. H. M. Analysis of LruC lipoprotein and identification of peptides candidates for vaccine development and diagnosis of leptospirosis. / E. A. Margolin, R. Strasser, R. Chapman et al. // *PloS one*. – 2023. – V.18(2). – ID e0281344. – <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281344>
69. Mark J. K. K. Expression of mammalian proteins for diagnostics and therapeutics: a review. / J. K. K. Mark, C. S. Y. Lim, F. Nordin, G. J. Tye // *Molecular biology reports*. – 2022. – V.49(11). – P. 10593–10608. – <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07651-3>

70. Miquel-Clopés A. Mucosal vaccines and technology. / A. Miquel-Clopés, E. G. Bentley, J. P. Stewart, S. R. Carding // *Clinical and experimental immunology*. – 2019. – V.196(2). – P. 205–214. – <https://doi.org/10.1111/cei.13285>
71. Monreal-Escalante E. Plant-Based Vaccines: Antigen Design, Diversity, and Strategies for High Level Production. / E. Monreal-Escalante, A. Ramos-Vega, C. Angulo, B. Bañuelos-Hernández // *Vaccines*. – 2022. – V.10(1). – ID 100. – <https://doi.org/10.3390/vaccines10010100>
72. Morais V. Purification of Capsular Polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*: Traditional and New Methods. / V. Morais, V. Dee, N. Suárez // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. – 2018. – V.6. – ID 145. – <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00145>
73. Mascola J. R. Novel vaccine technologies for the 21st century. / Mascola J. R., Fauci A. S. // *Nature reviews. Immunology*. – 2020. – V.20(2). – P. 87–88. – <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0243-3>
74. Näslund T. I. Dendritic cell-derived exosomes need to activate both T and B cells to induce antitumor immunity. / Näslund T. I., Gehrman U., Qazi K. R. et al. // *Journal of immunology*. – 2013. – V.190(6). – P. 2712–2719. – <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203082>
75. Nian X. Development of Nasal Vaccines and the Associated Challenges. / X. Nian, J. Zhang, S. Huang et al. // *Pharmaceutics*. – 2022. – V.14(10). – ID 1983. – <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14101983>
76. Nguyen B. Protein-based antigen presentation platforms for nanoparticle vaccines. / B. Nguyen, N. H. Tolia // *Vaccines*. – 2021. – V.6. – ID 70. – <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00330-7>
77. O'Flaherty R. Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: A review of the critical steps in their biomanufacturing. / R. O'Flaherty, A. Bergin, E. Flampouri et al. // *Biotechnology advances*. – 2020. – V.43. – ID 107552. – <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107552>
78. Olczak M. Comparison of different signal peptides for protein secretion in nonlytic insect cell system. / M. Olczak, T. Olczak // *Analytical biochemistry*. – 2006. – V.359(1). – P. 45–53. – <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.09.003>
79. Pino M. A yeast expressed RBD-based SARS-CoV-2 vaccine formulated with 3M-052-alum adjuvant promotes protective efficacy in non-human primates. / M. Pino, T. Abid, S. Pereira Ribeiro et al. // *Science immunology*. – 2021. – V.6(61). – ID eabh3634. – <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abh3634>
80. Pollet J. SARS-CoV-2 RBD219-N1C1: A yeast-expressed SARS-CoV-2 recombinant receptor-binding domain candidate vaccine stimulates virus neutralizing antibodies and T-cell immunity in mice. / J. Pollet, W. H. Chen, L. Versteeg et al. // *Human vaccines & immunotherapeutics*. – 2021. – V.17(8). – P. 2356–2366. – <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1901545>

81. Pownall W. R. Safety of a Novel *Listeria monocytogenes*-Based Vaccine Vector Expressing NcSAG1. / W. R. Pownall, D. Imhof, N. F. Trigo et al. // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2021. – V.11. – ID 675219. – <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.675219>
82. Puetz J. Recombinant Proteins for Industrial versus pharmaceutical Purposes: A Review. / J. Puetz, F. M. Wurm // *Processes and Pricing. Processes*. – 2019. – V.7(8). – ID 476; – <https://doi.org/10.3390/pr7080476>
83. Rappuoli R. On the mechanisms of conjugate vaccines. / R. Rappuoli, E. De Gregorio, P. Costantino // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2019. – V.116(1). – P. 14–16. – <https://doi.org/10.1073/pnas.1819612116>
84. Robert D. Study of the mode of action of ribosomal vaccines from *Klebsiella* and *Streptococcus pneumoniae* and their ribonucleic and protein fractions using passive immunization. / D. Robert, B. Ivanoff, R. Fontanges et al. // *Microbiology and immunology*. – 1982. – V.26(10). – P. 933–940. – <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1982.tb00239.x>
85. Rybicki E. P. Virus-derived ssDNA vectors for the expression of foreign proteins in plants. / E. P. Rybicki, D. P. Martin // *Current topics in microbiology and immunology*. – 2014. – V.375. – P. 19–45. – https://doi.org/10.1007/82_2011_185
86. Saadh M. J. Whole-Organism Vaccine (Attenuated and Killed Vaccines). / M. J. Saadh, H. M. Sbaih, A. Mustafa et al. // *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. – 2017. – V.9(10). – P. 148–151.
87. Sanchez-Garcia L. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. / L. Sanchez-Garcia, L. Martín, R. Manges et al. // *Microbial cell factories*. – 2016. – V.15. – ID 33. – <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0437-3>
88. Saphire E. O. Antibody-mediated protection against Ebola virus. / E. O. Saphire, S. L. Schendel., B. M. Gunn et al. // *Nature immunology*. – 2018. – V.19(11). – P. 1169–1178. – <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0233-9>
89. Schillberg S. Critical Analysis of the Commercial Potential of Plants for the Production of Recombinant Proteins. / S. Schillberg, N. Raven, H. Spiegel et al. // *Frontiers in plant science*. – 2019. – V.10. – ID 720. – <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00720>
90. Seo S. U. Prospects on Repurposing a Live Attenuated Vaccine for the Control of Unrelated Infections. / S. U. Seo, B. L. Seong // *Frontiers in immunology*. – 2022. – V.13. – ID 877845. – <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.877845>
91. Silva A. J. D. *Pichia pastoris* displaying ZIKV protein epitopes from the Envelope and NS1 induce in vitro immune activation. / A. J. D. Silva, A. L. S. Jesus, L. R. S. Leal et al. // *Vaccine*. – 2021. – V.39(18). – P. 2545–2554. – <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.03.065>

92. Singh G. Recombinant zoster vaccine (Shingrix®): a new option for the prevention of herpes zoster and postherpetic neuralgia. / G. Singh, S. Song, E. Choi et al. // *The Korean journal of pain*. – 2020. – V.33(3). – P. 201–207. – <https://doi.org/10.3344/kjp.2020.33.3.201>
93. Shafaati M. A brief review on DNA vaccines in the era of COVID-19. / M. Shafaati, M. Saidijam, M. Soleimani et al. // *Future virology*. – 2021. – ID 10.2217/fvl-2021-0170. – <https://doi.org/10.2217/fvl-2021-0170>
94. Shi L. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. / L. Shi // *International journal of biological macromolecules*. – 2016. – V.92. – P. 37–48. – <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.100>
95. Stander J. Plant-Derived Human Vaccines: Recent Developments. / J. Stander, S. Mbewana, A. E. Meyers // *BioDrugs*. – 2022. – V.36(5). – P. 573–589. – <https://doi.org/10.1007/s40259-022-00544-8>
96. Sun Y. F. Emerging Role of Exosomes in Tuberculosis: From Immunity Regulations to Vaccine and Immunotherapy. / Y. F. Sun, J. Pi, J. F. Xu // *Frontiers in immunology*. – 2021. – V.12. – ID 628973. – <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.628973>
97. Tada R. Nasal vaccination with pneumococcal surface protein A in combination with cationic liposomes consisting of DOTAP and DC-chol confers antigen-mediated protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infections in mice. / R. Tada, H. Suzuki, S. Takahashi et al. // *International immunopharmacology*. – 2018. – V.61. – P. 385–393. – <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.06.027>
98. Tricco A. C. Efficacy, effectiveness, and safety of herpes zoster vaccines in adults aged 50 and older: systematic review and network meta-analysis. / A. C. Tricco, W. Zarin, R. Cardoso et al. // *BMJ*. – 2018. – V.363. – ID k4029. – <https://doi.org/10.1136/bmj.k4029>
99. Tsoras A. N. Protein and Peptide Biomaterials for Engineered Subunit Vaccines and Immunotherapeutic Applications. / A. N. Tsoras, J. A. Champion // *Annual review of chemical and biomolecular engineering*. – 2019. – V.10. – P. 337–359. – <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-060718-030347>
100. van Oers M. M. Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. / M. M. van Oers, G. P. Pijlman, J. M. Vlak // *The Journal of general virology*. – 2015. – V.96(Pt 1). – P. 6–23. – <https://doi.org/10.1099/vir.0.067108-0>
101. Verma D. Chloroplast vector systems for biotechnology applications. / D. Verma, H. Daniell // *Plant physiology*. – 2007. – V.145(4). – P. 1129–1143. – <https://doi.org/10.1104/pp.107.106690>
102. Ward B. J. Phase 1 randomized trial of a plant-derived virus-like particle vaccine for COVID-19. / B. J. Ward, P. Gobeil, A. Séguin et al. // *Nature*

medicine. – 2021. – V.27(6). – P. 1071–1078. –
<https://doi.org/10.1038/s41591-021-01370-1>

103. Yuki Y. Oral MucoRice-CTB vaccine is safe and immunogenic in healthy US adults. / Y. Yuki, M. Nojima, K. Kashima et al. // Vaccine. – 2022. – V.40(24). – P. 3372–3379. – <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.04.051>
104. Zimmermann J. A Novel Prophylaxis Strategy Using Liposomal Vaccine Adjuvant CAF09b Protects against Influenza Virus Disease. / J. Zimmermann, S. T. Schmidt, R. Trebbien et al. // International journal of molecular sciences. – 2022. – V.23(3). – ID 1850. – <https://doi.org/10.3390/ijms23031850>

РОЗДІЛ 4. ВАКЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОГО КАЛЕНДАРЯ ЩЕПЛЕНЬ УКРАЇНИ

Національний календар щеплень – це документ, в якому визначено перелік захворювань, від яких проводиться вакцинація та терміни проведення щеплень. Календар щеплень існує у більшості країн світу. Національний календар у різних країнах відрізняється кількістю інфекційних захворювань, захист від яких забезпечується за державний бюджет. Національний календар щеплень значною мірою визначається епідеміологічною ситуацією. В Україні в календар щеплень входить 10 інфекцій: туберкульоз, правець, дифтерія, кашлюк, гемофільна інфекція, кір, краснуха, епідемічний паротит, гепатит В, поліомієліт. Біотехнологічне одержання вакцин для профілактики зазначених інфекцій буде розглянуто у наступних розділах.

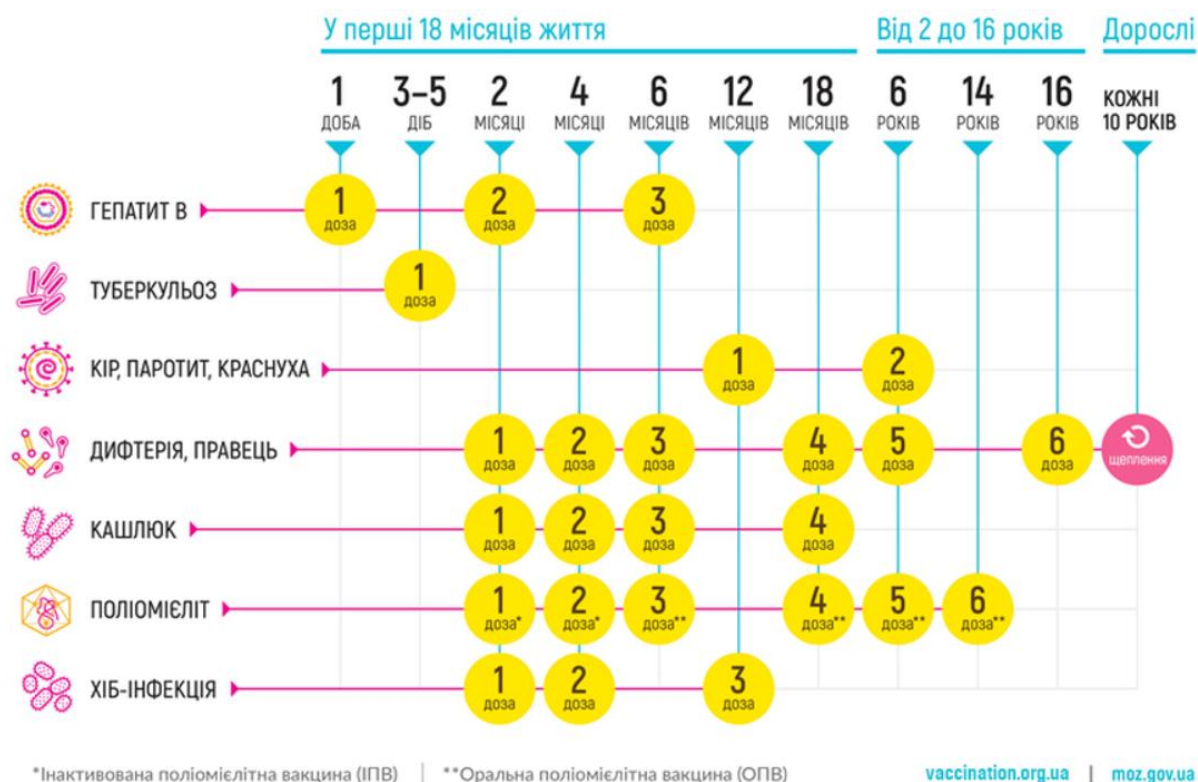


Рисунок 4.1 – Чинний календар профілактичних щеплень, затверджений МОЗ України у 2018 році

4.1. Протибактеріальні вакцини

Методи вакцинації, запропоновані англійським лікарем Е. Дженнером наприкінці XVIII ст. та вдосконалені Л. Пастером та іншими вченими у XIX ст., дають змогу розвинути в організмі *набутий активний імунітет*. За допомогою штучно введених патогенів, які за своєю дією схожі на справжніх збудників хвороби, організм вчиться розпізнавати небезпечні мікроби, які потрапили в нього, і боротися з ними.

Іншому досліднику, німецькому бактеріологу Емілю Адольфу Берінгу, належить перший спосіб імунізації проти дифтерії. В 1890 Берінг разом зі своїм співробітником, японським мікробіологом Шибасабуро Кітасато, встановив, що при ін'єкції тваринам стерильних культур бацил правця або дифтерії в крові утворюються антитіла, здатні нейтралізувати токсини, що виділяються живими мікроорганізмами. Крім того, з'ясувалася ще одна важлива обставина – сироватка (антитоксин) однієї тварини, введена іншій, може її вилікувати. В даний час в Україні залежно від показань використовується п'ять препаратів, що містять антигени проти правця, дифтерії та кашлюку:

- ✓ адсорбована кашлюково-дифтерійно-правцева вакцина (АКДП-вакцина);
- ✓ адсорбований дифтерійно-правцевий анатоксин (АДП-анатоксин);
- ✓ адсорбований дифтерійно-правцевий анатоксин із зменшеним вмістом антигена (АДП-М-анатоксин);
- ✓ адсорбований дифтерійний анатоксин із зменшеним вмістом антигена (АД-М-анатоксин);
- ✓ адсорбований правцевий анатоксин (АП-анатоксин).

Враховуючи, що в АКДП-вакцині є всі три компоненти, ми розглянемо виробництво тільки цього препарату та його компонентів.

4.1.1. Вакцини для профілактики дифтерійної інфекції

Дифтерійний токсин (*Corynebacterium diphtheriae toxin*) є першим із відкритих мікробних екзотоксинів. Вивчення даного токсину проводиться вже більше 125 років. Основним компонентом дифтерійного токсину є гістотоксин, який інтенсивно секретується виробничим штамом *Park-Williams 8*. Молекулярна маса гістотоксину становить близько 65 кДа. Ві-

домо, що гістотоксин складається з двох субодиниць – А і В – з молекулярними масами 24 кДа і 39 кДа відповідно. Встановлено, що тварини мають різну чутливість до летальної та дермoneкротизуючої дії дифтерійного гістотоксину. Відома висока сприйнятливність до дифтерійної інтоксикації кроликів, ховрахів, хом'ячків, голубів, проте найчутливішими виявилися морські свинки.

Дифтерійний анатоксин один із перших вакцинних препаратів для захисту від бактеріальних інфекцій. Завдяки імунізації за ефективними схемами, що забезпечують утворення високих титрів антитоксину, вдалося значно зменшити кількість випадків дифтерії.

Штamu *Corynebacterium diphtheriae*. Для отримання дифтерійного токсину застосовують штам *Park-Williams 8* (Парк-Вільямс-8, PW-8), виділений у 1894 році. У процесі багаторічного збереження штаму PW-8 на поживних середовищах шляхом селекції та адаптації його до досконаліших поживних середовищ та інших умов культивування отримано ряд варіантів: Торонто, Вайсензее, Дессау, Массачусетс. Ці варіанти відрізняються один від одного за здатністю синтезувати активний токсин залежно від складу поживного середовища та умов культивування в середовищі пептичного перетравлення, казеїновому середовищі (Торонто), м'ясних середовищах триптичного перетравлення (Массачусетс). В Україні для виробництва дифтерійного анатоксину використовується варіант Массачусетс. На думку ВООЗ, цей штам цілком підходить для виробництва імуногенних дифтерійних вакцин і, вочевидь, немає підстав змінювати його іншим штамом. Підхід до виробництва дифтерійної вакцини полягає в отриманні якомога більших кількостей токсину під час фази росту мікроорганізмів і подальшому перетворенні токсину на стабільний анатоксин за допомогою найбільш ефективного методу.

Corynebacterium diphtheriae штаму PW-8 характеризується такими особливостями: морфологія – тонкі, прямі, іноді злегка вигнуті, з закругленими кінцями палички; довжина коливається від 2 до 5 мкм, товщина – від 0,3 до 0,6 мкм; палички нерухомі, джгутиків та капсул не мають, спор не утворюють; добре фарбуються аніліновими барвниками, особливо інтенсивно забарвлюються метакроматичні утворення (зерна волютину), які розташовуються по всій довжині палички; аероб, оптимальна температура культивування – 32–34 °С, рН – 7,4–8,0.

У процесі культивування штам може дисоціювати на R- та S-форми залежно від умов росту. Функція токсиноутворення властива лише R-формі, у зв'язку з чим для отримання високоактивних токсинів необхідно підтримувати штам у R-формі. За характером росту R- та S-форми мають суттєві відмінності. На рідких поживних середовищах S-форми утворюють грубу плівку, спричиняють легке помутніння середовища, продукують токсин слабкої активності, тоді як R-форма утворює ніжну крихку плівку на поверхні середовища без зміни його фізичних властивостей, активність токсину висока. На агаризованих середовищах S-форма утворює колонії середньої величини, правильної округлої форми з рівними краями гладкою блискучою поверхнею, а R-форма утворює дрібні колонії їх різко порізними краями, опуклим центром та характерною радіальною смугастістю («квітка маргаритки»). Для збереження біологічної активності штаму доцільно періодично проводити селекцію окремих колоній R-форми з адаптацією їх до складу поживного середовища та умов культивування. Зберігання штамів у процесі виробництва здійснюють на середовищах при 4–10 °С.

Штами, які використовуються для приготування дифтерійного анатоксину, необхідно ідентифікувати на підставі документа, в якому містяться відомості про його походження та результати всіх тестів, що періодично проводяться для підтвердження властивих штаму характеристик. Штами слід зберігати у вигляді ліофілізованих культур. Виробництво дифтерійного токсину має базуватися на системі посівних серій. Культури робочих посівних серій повинні мати ті ж характеристики, що й штам, з якого отримана вихідна посівна серія.

Як правило, промислова ферментація та очищення продукту являють собою багатоступеневі процеси і починаються зазвичай з приготування та стерилізації культурального середовища та обладнання. Вирощування як дифтерійної, так і правцевої культури проводять у *реакторі (ферментері) періодичної дії* – вирощування у стерильних умовах без додавання свіжого культурального середовища під час ферментації.

Поживне середовище є тим необхідним субстратом, від якого залежить виробництво анатоксинів: продукція культурою токсину, можливість високого ступеня очищення від баластних компонентів. Складу поживних середовищ та технології їх приготування присвячено багато досліджень, результати яких викладені у численній спеціальній літературі.

Дуже важливо досягти того, щоб готовий продукт не містив речовин, які можуть викликати токсичні або алергічні реакції у людини. Якщо середовище готують із продуктів гідролізу білків, наприклад, з гідролізату казеїну або гідролізованої м'язової тканини, то необхідно вжити заходів, які забезпечують достатню ефективність процесу гідролізу. Не можна перевищувати межі вмісту білків ссавців в готовій продукції (якщо такі межі встановлені). *До поживних середовищ, які використовуються для отримання вакцин, висувають такі вимоги:*

- ❖ збалансована кількість органічних речовин: їх недолік знижує продукцію токсину в культуральну рідину, а надлишок – значно ускладнює процес відокремлення біомаси та перехід токсину в анатоксин;
- ❖ відсутність у складі поживного середовища нерозщеплених білкових молекул, оскільки їхня присутність ускладнює процеси очищення та детоксикації;
- ❖ враховуючи тривалість культивування бактерій для накопичення токсину та зміну рН середовища в процесі культивування, у складі середовища мають бути буферні суміші, що підтримують рН на необхідному рівні;
- ❖ склад середовища повинен забезпечувати максимальне накопичення токсину без значного накопичення біомаси, що, у свою чергу, спрощує процеси очищення та детоксикації;
- ❖ поживні речовини повинні бути наявні у середовищі у чітко визначених співвідношеннях, оскільки надмірна концентрація поживної речовини може пригнічувати ріст клітин. Якщо клітини ростуть занадто інтенсивно, то накопичення кінцевих продуктів метаболізму може порушувати нормальні біохімічні процеси в клітинах, а це, у свою чергу, може знижувати синтез токсину. Крім того, при нестачі поживних речовин, наприклад, азотистих сполук, дифтерійна культура починає проявляти «агресивність» та інтенсивніше продукувати токсин.

За роки виробництва дифтерійного токсину було запропоновано велику кількість поживних середовищ, що відрізняються за складом та технологією отримання. Їхня різноманітність пов'язана з властивостями використовуваної культури, технологією отримання токсину та методами його очищення.

Одним із найчастіше використовуваних є *середовище Лінгуда*. Методика виготовлення середовища полягає в наступному: подрібнену яловичу тканину поміщають у холодну воду, нагрівають до температури 90 °С з наступним охолодженням до 48–50 °С, встановлюють рН 8,0–8,2 за допомогою їдкого натру. В отриману суміш додають емульсію свинної підшлункової залози, і за вказаної температури і рН проводять гідроліз до припинення зростання амінного азоту (120–130 мг%). Процес триптичного гідролізу припиняється додаванням крижаної оцтової кислоти (1–2 %) та кип'ятінням суміші. Гідролізат фільтрують, встановлюють рН 8,0–8,2 і додають пекарські дріжджі для зброджування цукрів при 80 °С протягом 1 години. У середовище додають молочнокислий натрій, фільтрують і стерилізують при 112 °С протягом 30 хвилин. Для збереження ростових властивостей поживного середовища для стерилізації можна використовувати метод мембранної фільтрації через фільтри з розміром пор не більше 0,22 мкм. Концентрація пептону в середовищі становить 1,2–1,3 %, амінного азоту – 120–130 мг%, що дозволяє забезпечити бактерії дифтерії джерелом азоту, який необхідний культурі для життєдіяльності. Як джерело вуглеводів та енергії до складу середовища вводять стерильний розчин мальтози.

Культивування дифтерійної культури можна проводити і на *синтетичному середовищі Мюллера*, яке містить амінокислоти (гліцин, валін, цистин, метіонін та ін.), мінеральні солі (магній сірчаноокислий, фосфорнокислий калій, натрій хлористий, мідь сірчаноокисла та ін.), цукри (мальтоза, глюкоза та ін.). Вміст одиниць флокуляції (від англ. *limit of flocculation*, LF) у токсині, отриманому на середовищі Мюллера, поступається отриманому на середовищі Лінгуда на 20–30 %.

Хороші результати токсиноутворення отримані на *напівсинтетичному середовищі, що містить кислотний гідролізат казеїну* (35 г/л). Накопичений досвід дає підстави говорити про вплив іонів заліза у складі поживного середовища на токсиноутворення. Високий вихід токсину спостерігається за вмістом іонів заліза в межах 0,05–0,4 мкг/л.

Оптимальність складу поживного середовища для культивування вакцинних штамів бактерій необхідно оцінювати не за показником максимального збору біомаси, а за величиною накопичення культурою протективних антигенів: для дифтерії та правця – накопичення токсинів, для гемофільної В інфекції – полісахаридів тощо.

Одержання дифтерійного токсину. Вивчення залежності процесу токсиноутворення від співвідношення об'єму поживного середовища та площі його поверхні показало, що в одному і тому самому об'ємі середовища зі збільшенням його поверхні підвищується активність росту та інтенсивність токсиноутворення дифтерійної бактерії. Аерація та перемішування поживного середовища активізує токсиноутворення дифтерійної культури. Посилена аерація збільшує енергетичну здатність мікроорганізмів, а безперервне перемішування середовища забезпечує розподіл поживних речовин та видалення з поверхні бактеріальних клітин продуктів обміну. Постійний приплив до мікробних клітин нових поживних речовин прискорює перебіг біологічних процесів порівняно з умовами росту мікробів у стаціонарних умовах.

При вирощуванні бактерій в умовах безперервного перемішування та аерації вони проходять шість фаз розвитку (рис. 4.2):

1. *Лаг-фаза, або індукційний період* починається після інокуляції в поживне середовище і є періодом адаптації до нових умов (склад поживного середовища, температура, рН тощо). Тривалість лаг-фази залежить від часу, протягом якого клітини посівного матеріалу перебували в стаціонарній фазі і від того, як сильно відрізнялося середовище, в якому культура росла до цього, і нове свіже культуральне середовище. Це диктує необхідність скорочення лаг-фази, використовуючи одну серію поживного середовища для отримання кожної партії токсину.

2. *Фаза прискорення росту.*

3. *Фаза логарифмічного (лог-фаза), або експоненційного росту* – період швидкого накопичення культури та продуктів метаболізму.

4. *Фаза уповільнення росту.*

5. *Стаціонарна фаза* характеризується збалансованістю росту у встановленому стані, тобто швидкість росту залишається постійною протягом усього цього періоду культивування, а хімічний склад культуральної рідини змінюється, оскільки споживаються поживні речовини та виробляються продукти метаболізму, у тому числі дифтерійний токсин. У цей період кількість мікроорганізмів збільшується незначно, тоді як відбувається основний приріст бактеріальних токсинів. У кінці стаціонарної фази спостерігається зниження швидкості росту культури та токсиноутворення.

6. *Фаза відмирання*, на якій енергетичні запаси клітин виявляються вичерпаними та метаболізм припиняється.

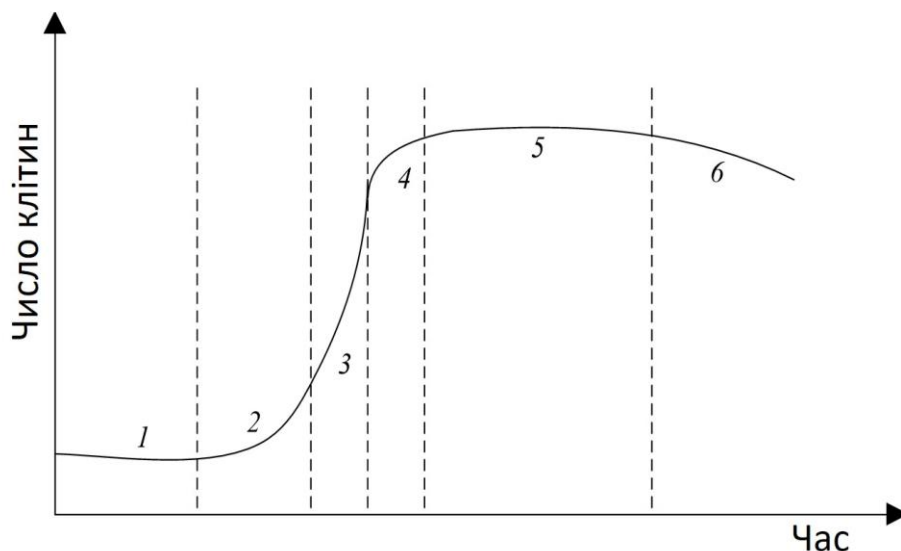


Рисунок 4.2 – Фази росту мікроорганізмів у закритих системах:

1 – лаг-фаза; 2 – фаза прискорення росту; 3 – лог-фаза; 4 – фаза уповільнення росту; 5 – стаціонарна фаза; 6 – фаза відмирання культури

Основна відмінність розмноження бактерій при перемішуванні та аерації від розмноження у стаціонарних умовах полягає у відсутності початкової стаціонарної фази та у тривалості фази уповільнення росту. Бактерії в умовах аерації відразу починають інтенсивно розмножуватися:

- ✓ 1 генерація – 34–36 °С протягом 24 годин;
- ✓ 2 генерація – 34–36 °С при перемішуванні протягом 24 годин;
- ✓ 3 генерація – 34–36 °С при перемішуванні протягом 48 годин.

При проведенні культивування всіх трьох генерацій використовується 0,3–0,6 % розчин мальтози.

Співвідношення між об'ємами 1, 2 і 3 генерацій (у різних виробників) коливається в діапазоні 1 : (28–30) : (25–30).

Культура інокуляту повинна мати специфічну морфологію. Необхідно сказати, що на тривалість лаг-фази значний вплив має фаза росту, в якій знаходиться інокулят, отриманий, у свою чергу, шляхом культивування клітин у невеликому об'ємі. Для продукції токсину в інтересах виробника *звести до мінімуму лаг-фазу*. Для цього необхідно дотримуватися таких умов:

- ❖ культура інокуляту повинна мати максимальну активність, а в момент введення в середовище великого об'єму інокулят повинен перебувати у фазі експоненційного росту;

- ❖ середовище, в якому вирощується інокулят, має за своїм складом бути ідентичним середовищу для виробничого процесу, що відбувається в біореакторі;
- ❖ інокулят повинен становити 5–10 % від об'єму середовища у виробничому біореакторі.

Ферментер обладнаний пристроями для вимірювання та регулювання температури, кількості повітря, що подається, тиску всередині ферментера, рН середовища, концентрації розчиненого кисню в культуральній рідині. У ферментері мають бути пристрої для механічного або хімічного піногасіння, а також сигналізатор рівня піни. Крім цього, біореактор обов'язково має бути забезпечений спеціальними опціями для подачі поживного середовища та вуглеводів, введення інокуляту, подачі повітря та пробовідбірника.

Велику небезпеку становить забруднення реактора грибами чи бактеріями. Тому біореактори конструюють таким чином, щоб їх можна було стерилізувати, для цього зазвичай використовують пару під тиском. Всередині реактора не повинно бути «застійних зон», недоступних для пари під час стерилізації. Обробці підлягають усі клапани, датчики, вхідні та вихідні отвори. Реактори піддають стерилізації або в автоклаві або через сорочку в режимі – 2 години при тиску 0,2 атм та температурі 132 ± 1 °С. Після стерилізації у реактор поміщають середовище.

Необхідно ретельно контролювати *температуру вирощування мікроорганізмів*. При зниженні оптимальної температури ріст бактерій сповільнюється, а підвищення температури активує клітинні протеїнази і знижує вихід токсину. Процес культивування проводять за температури 34–36 °С протягом 36–50 год. Залежно від складу поживного середовища та стану культури може змінюватися *час культивування*. Наприклад, при використанні казеїнового кислотного гідролізату за Мюллером вирощування проводять при 34 °С протягом 48–60 год з додаванням мальтози.

Важливим питанням є *концентрація водневих іонів (рН)*. Значення рН культури мікроорганізмів дуже впливає на кінцеві продукти аеробного перетворення джерел вуглецю та енергії. рН середовища завдяки своєму впливу на дисоціацію речовин, які мають кислотні та основні властивості, може впливати на інгібування синтезу цих сполук або змінювати їх токсичні властивості, антигенний склад культур та їх морфологію. Враховуючи, що для росту коринебактерій використовуються органічні аміносполуки,

pH збільшується за рахунок дезамінування цих сполук. При цьому знижується активність продукції дифтерійного токсину. У разі підвищення pH понад 8,2 після 20–24 год росту додають 40 % розчин стерильної глюкози. Встановлено, що збільшення окисно-відновного потенціалу приводить до інтенсивного накопичення дифтерійного токсину.

Серйозною перешкодою при глибинному культивуванні мікроорганізмів є *утворення піни* в процесі біосинтезу, що пов'язано зі збільшенням у складі поживних середовищ субстратів, продуктів метаболізму і поверхнево-активних речовин. У випадку отримання дифтерійного токсину, цей ефект посилюється за рахунок введення газової фази – подачі повітря. Інтенсивне піноутворення ускладнює максимальне використання ємності біореактора, оскільки сприяє викиду піни та втраті цільового продукту. Крім того, викид піни часто призводить до нестерильності продукту. Для піногасіння в даний час використовують різні методи: механічні (руйнування піни за рахунок ударної дії твердих поверхонь, обробка струменями рідини або газу, різка зміна тиску та ін.); хімічні (додавання поверхнево-активних речовин, які зменшують міцність плівок або зв'язують піноутворювачі до поверхнево-неактивних комплексів); фізичні методи (електричне піногасіння, вплив коливань звукової або ультразвукової частоти та ін.); стабілізація рівня піни шляхом тимчасового зменшення подачі повітря або тимчасового припинення механічного перемішування, виведення надлишкової піни з біореактора. Найефективнішими є хімічні та механічні способи піногасіння або їх комбінації. Використання для піногасіння при виробництві дифтерійного токсину рослинних олій, які зменшують міцність плівки, дає досить високі результати токсиноутворення та значно знижує об'єм піни. Причому необхідно відзначити відсутність впливу даного піногасника на мікроорганізми та можливість видалення у процесі фільтрації.

Контроль процесу токсиноутворення здійснюють шляхом визначення наступних показників: кількість флокулюючих одиниць (Lf/мл), морфологія культури, концентрація мікробних клітин, pH та бактеріологічна чистота, величина мінімальної смертельної дози (dlm/мл). Токсиноутворення має бути не менше 130–150 Lf/мл та не менше 10000 dlm/мл.

Методом визначення концентрації антигена є *реакція флокуляції*. Її слід виконувати з еталонним матеріалом, відкаліброваним по відношенню до Міжнародного еталонного стандарту дифтерійного анатоксину для ре-

акції флокуляції. Реакцію флокуляції проводять так: стандартну протидифтерійну сироватку розводять 0,9 %-вим розчином натрію хлориду до кінцевої концентрації 100 МО/мл. Потім готують розведення токсину (анатоксину) згідно з табл. 4.1.

Таблиця 4.1 – Розведення токсину (анатоксину)

№ пробірки	Кількість стандартної сироватки, мл	0,9 % NaCl, мл	Розведений 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

Визначають початкову пробірку (ініціальна), в якій спостерігається процес флокуляції та проводять розрахунок одиниць флокуляції (Lf):

$$Lf = \frac{CC \cdot V_{\text{сиров}}}{V_{\text{зр.токс}}} \cdot K_{\text{РТ}},$$

де CC – стандартна сироватка, МО/мл (антитоксин);

$V_{\text{сиров}}$ – об'єм сироватки в ініціальній пробірці, мл;

$V_{\text{зр.токс}}$ – об'єм зразка токсину, мл;

$K_{\text{РТ}}$ – коефіцієнт розведення токсину.

Зразки культур, використовуваних для отримання разових зборів анатоксину, мають проходити випробування на чистоту за допомогою мікроскопії забарвлених мазків або посіву на відповідні культуральні середовища. Разові збори не можна використовувати для отримання об'єднаного матеріалу, якщо на будь-якій стадії їхнього приготування відбулася контамінація.

Після завершення процесу культивування мікробну суспензію піддають *ультрацентрифугуванню* для відділення біомаси на сепараторах, наприклад, типу *Westfalia*, або суперцентрифугах зі швидкістю до 15000 об/хв. При цьому мають вживатися відповідні заходи, що запобігають утворенню потенційно небезпечних аерозолів. Для відділення клітин із

великих об'ємів культурального середовища часто використовують високошвидкісні центрифуги. Суспензію клітин безперервно подають у барабан (ротор) працюючої центрифуги, клітини мікроорганізмів концентруються в ньому, а освітлене середовище, яке містить токсин, видаляється. Недоліками цього методу є необхідність періодично зупиняти центрифугу або сепаратор для очищення барабана (ротора) від біомаси, висока вартість обладнання, можливість попадання мікроорганізмів у розчин токсину.

Отриманий прозорий розчин токсину направляють на *стерилізуючу фільтрацію* через фільтри з розміром пор не більше 0,22 мкм, наприклад, фільтри типу Millipore.

В останні роки запропоновано пропускати клітинну суспензію з високою швидкістю паралельно поверхні ультрафільтраційної мембрани так, що через мембрану за один цикл проходить лише невелика частина циркулюючої рідини. Решта рідини очищає мембрану від клітин, які накопилися на ній, в результаті чого швидкість фільтрації падає не так швидко, як при незворотному забиванні фільтра. Після численних циклів фільтрації через мембрану проходить майже вся культуральна рідина. Даний принцип зручний ще й тим, що існує можливість одночасного проведення і стерилізуючої фільтрації. Існує варіант ультрафільтрації на спеціальних керамічних модулях, коли через керамічні фільтри з встановленим порогом відсікання проходить токсин, а біомаса концентрується в реакторі. Перевагами такої фільтрації є відсутність аерозолів, відносно низька ціна обладнання та стандартизація процесу. Крім того, дві стадії замінюються однією, оскільки така фільтрація дозволяє отримати стерильний продукт, який надходить у реактор-детоксикатор. Баластні білки в процесі подальшої детоксикації за рахунок обробки формальдегідом зазнають тих самих змін, що і специфічний білок токсину, і при осадженні випадають в осад при тих же значеннях рН. Для зменшення об'єму токсину, зниження кількості баластних білкових компонентів, видалення залишкових продуктів поживних середовищ, тощо проводиться ультрафільтрація через апарати з різним порогом відсікання від 10 до 50 кДа. Різні виробники визначають умови процесу залежно від складу поживного середовища, штама-продуцента, подальших методів детоксикації та очищення.

Детоксикація та очищення дифтерійного токсину. В основі процесу знешкодження дифтерійного токсину закладено принцип незворотної

зміни ділянки білкової молекули, яка відповідає за прояв токсичності, при повному збереженні антигенної активності. Метод детоксикації дифтерійного токсину формальдегідом при температурі $37\pm^{\circ}\text{C}$ був запропонований Рамоном у 1924 році. При вивченні механізму анатоксинування було встановлено, що *процес переходу токсину в анатоксин проходить у два етапи*:

Перший етап пов'язаний з реакцією між формальдегідом та NH_2 -групами білка, в результаті якої утворюється метилоамінна група. На цьому етапі детоксикація дифтерійного токсину протікає дуже швидко, вже протягом 1–2 доби спостерігається зниження токсичності на 95 %. Однак таке знешкодження зворотне, і якщо з препарату видалити надлишок формаліну, токсичність відновлюється (реверсія).

На другому етапі відбуваються внутрішньомолекулярні реакції: метилоамінні групи взаємодіють із деякими активними радикалами амінокислот (амідні, індольні, фенольні та ін.), що приводить до створення стабільних метиленових містків. Стабільного знешкодження можна досягти лише після другого етапу формальдегідної детоксикації – утворення метиленових груп. Другий етап необоротний. Він протікає досить повільно (20–40 діб) при температурі $39\text{--}40^{\circ}\text{C}$ в зоні нейтрального або слабколужного рН і завершується утворенням дифтерійного анатоксину. Варто зазначити, що умови детоксикації токсинів є специфічними для кожного виду препарату. Так, можна навести дані про детоксикацію токсину *Cl. septicum*: концентрація формаліну – 0,75 %; рН – 6,9–7,1; температура – $20\text{--}22^{\circ}\text{C}$; тривалість – 10–14 діб. Питаннями детоксикації дифтерійного токсину займаються понад 70 років, і попри це точний механізм цього процесу досі не визначено.

Знешкодження дифтерійного токсину здійснюється в реакторі-детоксикаторі з нержавіючої сталі з сорочкою для водного обігріву або охолодження та мішалкою (60–80 об/хв). При постійному перемішуванні додають 40 %-вий розчин формаліну до кінцевої концентрації формальдегіду 0,4–0,6 % та витримують при температурі $39\text{--}40^{\circ}\text{C}$ протягом 5 діб. Після чого препарат охолоджують до температури $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$ безпосередньо в реакторі-детоксикаторі та проводять процес осадження токсину та його очищення. Очищення дифтерійного токсину від баластних речовин дозволяє зменшити реактогенність препарату, а також підвищити його імуногенність за рахунок кращої сорбції на мінеральних гелях.

При постійному перемішуванні до токсину додають 10 % стерильний розчин натрію гексаметофосфату (сіль Грехема) до кінцевої концентрації 0,25 %. При постійному перемішуванні розчину частково знешкодженого токсину додають 2Н розчин трихлороцтової кислоти до рН 3,8–4,0 (ізоелектрична точка). Важливим є етап формування осаду, який складається зі стадії утворення та росту індивідуальних частинок, а також їх подальшої агрегації, в результаті якої утворюються пластівці з розмірами, що забезпечують їх подальше відділення сепаруванням. Суміш витримують протягом 40–60 хв при 4–10 °С. Отриману суміш піддають сепаруванню при 10–12 тис.об/хв та температурі 4–10 °С. Осад промивають водою для ін'єкцій і розчиняють у борно-боратному буферному розчині при рН 7,8–7,9 у співвідношенні 1:15–1:20 до його початкового об'єму. Продукт очищають від пігментних компонентів (порфіринові сполуки) обробкою активованим вугіллям у кількості 0,8–1,2 % та мінеральними сорбентами, наприклад, гідроксидом алюмінію. Розчин піддають стерилізуючій фільтрації через каскад фільтрів з розміром пор від 1,2 до 0,22 мкм. До отриманого розчину токсину додають 40 %-вий розчин формаліну до кінцевої концентрації 0,15–0,2 % формальдегіду та витримують при температурі 39–40 °С не менше 15 діб. До цього терміну токсин повністю перетворюється на анатоксин. Можливе очищення отриманого препарату шляхом ступінчастої ультрафільтрації розчину анатоксину через апарати з порогом відсікання 50–300 кДа. При цьому можна видалити баластні домішки з молекулярними масами меншими та більшими відносно дифтерійного анатоксину.

Ми розглянули один із варіантів отримання дифтерійного анатоксину (токсоїду), що ґрунтується на очищенні частково знешкодженого токсину. Водночас ряд виробників використовують іншу схему отримання препарату – очищення на стадії дифтерійного токсину. Отриманий стерильний розчин токсину концентрують шляхом обробки сірчаноокислим амонієм до 40 %-вого насичення. Суміш витримують при температурі 4–8 °С протягом 1 години, а осад баластних білків відокремлюють центрифугуванням. До прозорого розчину знову додають сірчаноокислий амоній до 60 %-вого насичення, витримують при 4–8 °С для формування осаду токсину, який відокремлюють центрифугуванням. Отриманий осад розчиняють у воді для ін'єкцій та проводять визначення специфічної активності (Lf/мл) та вміст білкового азоту (мг/мл). Потім розчин піддають колоноч-

ній іонообмінній хроматографії на *Q-Sepharose Fast Flow*, а сорбовані фракції елюють спеціальним буферним розчином. Процес хроматографічного очищення проводять двічі. Отриманий розчин токсину концентрують та очищають ультрафільтрацією або діалізом. Очищений дифтерійний токсин контролюють на вміст флокулюючих одиниць (Lf/мл), білкового азоту (мг/мл) та ендотоксину. Розчин токсину піддають детоксикації за допомогою формаліну. Для стабілізації токсину в розчин додають амінокислоти лізин і N-ацетилтриптофан, а процес детоксикації продовжують протягом 18–21 доби при температурі 34–35 °С, причому формалін додають порціями протягом перших трьох днів. При очищенні повністю знешкодженого анатоксину використовують метод спиртового фракціонування з подальшою стабілізацією препарату амінокислотою гліцином.

Принципова схема описаного процесу виготовлення дифтерійного анатоксину наведено на рис. 4.3.

Контроль очищеного концентрованого дифтерійного анатоксину – це наступний етап виготовлення. Під час контролю препарат зберігається при температурі 2–8 °С. Отриманий препарат контролюють відповідно до рекомендацій ВООЗ за такими тестами:

1. *Стерильність* – проводять тест на бактеріальну та грибкову стерильність відповідно до вимог ДФУ.

2. *Специфічна токсичність* – проводять на 5-ти морських свинках масою 250–350 г. Кожній свинці підшкірно вводять 1 мл анатоксину того розведення, в якому міститься не менше 500 Lf анатоксину. Загиблих тварин слід піддати аутопсії з метою виявлення симптомів дифтерійної інтоксикації (наприклад, червоні надниркові залози). Очищений анатоксин вважається таким, що успішно пройшов випробування, якщо в жодної морської свинки протягом 6 тижнів з моменту введення не виявлено симптоми специфічної інтоксикації і якщо до кінця періоду спостереження живими залишається не менше 80 % тварин.

В Україні додатково проводять контроль на кроликах, шляхом внутрішньошкірного введення 20 Lf анатоксину з подальшим спостереженням за появою специфічної еритеми в місцях введення. Крім того, в Україні морським свинкам вводять препарат у дозі 1500 Lf, що значною мірою гарантує нешкідливість використовуваного препарату. При отриманні негативних результатів допускається проведення повторного процесу детоксикації із наступним контролем.

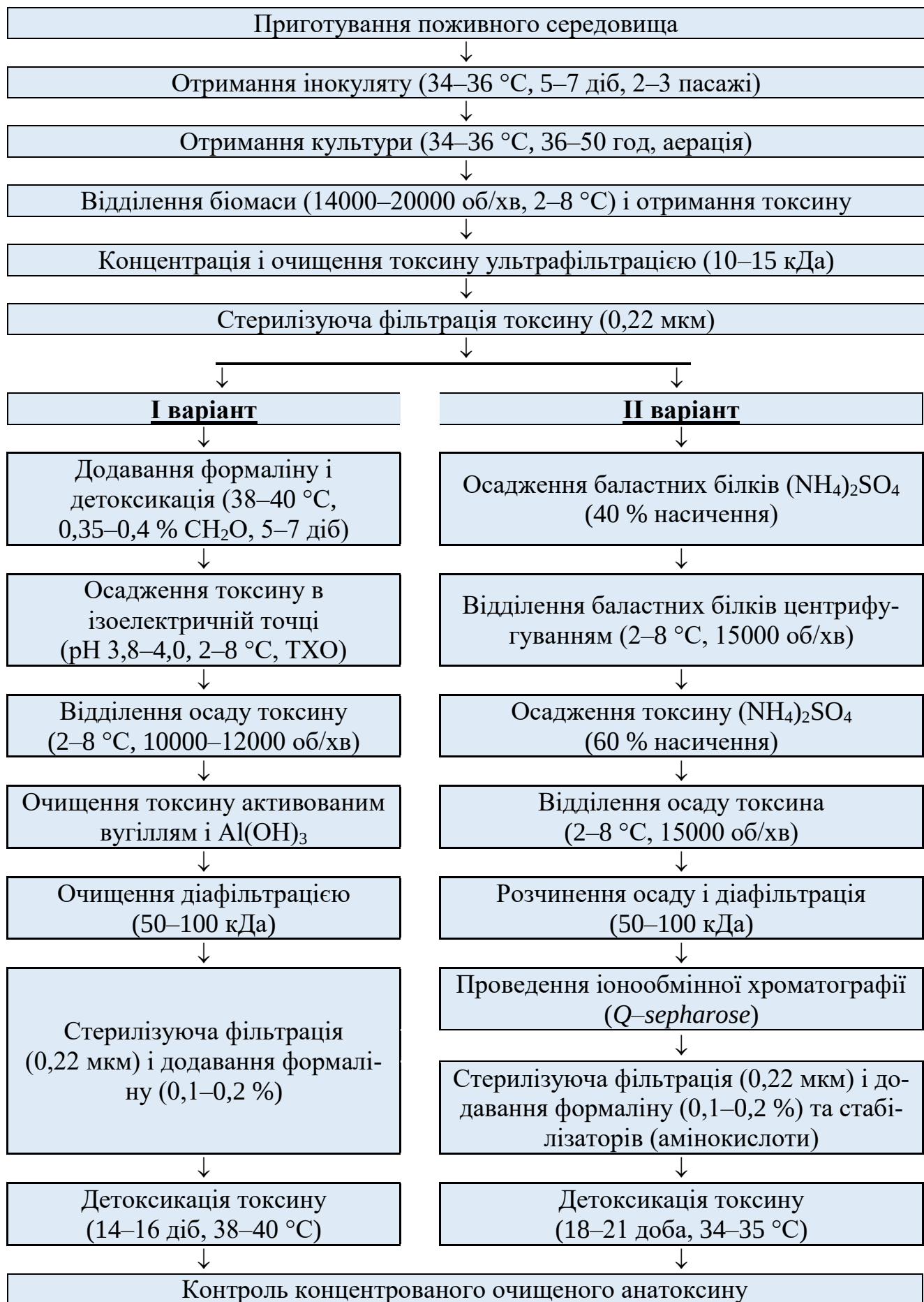


Рисунок 4.3 – Схема отримання дифтерійного анатоксину

3. *Реверсія токсичності* – проводять з метою підтвердження неможливості реверсії токсичності у процесі зберігання. Очищений концентрований анатоксин розводять до такої його концентрації та концентрації хімічних речовин, які прийняті для готової вакцини. Розведений препарат зберігають при температурах 34–37 °С та 2–8 °С протягом 6 тижнів. Потім зразки препарату контролюють за тестом «специфічна токсичність».

4. *Чистота антигена* – проводять шляхом визначення флокулюючих одиниць (Lf/мл) та білкового азоту (мг/мл). Очищений анатоксин вважається таким, що пройшов випробування, якщо він містить не менше 1500 Lf на 1 мг білкового азоту.

5. *pH* – визначення проводять потенціометрично. pH – 6,0–7,3.

6. *Кількість залишкового вільного інактивуючого агента (формальдегіду)* – визначають, наприклад, калориметричним методом при взаємодії формальдегіду з сумішшю фуксину та сірчаної кислоти. Вміст формальдегіду в анатоксині, розведеному до концентрації готового препарату, не повинен перевищувати 0,2 г/л.

7. *Визначення концентрації антигена* – проводять за допомогою реакції флокуляції (Lf/мл) із протидифтерійною флокулюючою сироваткою.

8. *Визначення білкового азоту* – методом К'ельдаля або Несслера.

9. *Визначення ендотоксинів* – LAL тестом або тестом на пірогенність.

10. *Визначення фракційного складу анатоксину* – методом електрофоретичного розділення в поліакриламідному гелі з додецил-сульфатом натрію.

Як альтернатива вакцині на основі хімічно інактивованого (детоксикація формаліном) токсину дифтерії запропонована вакцина на основі генетично детоксикованого токсину дифтерії (CRM197). Білок CRM197 є нетоксичним похідним дифтерійного токсину і характеризується однією мутацією, а саме заміною гліцину на глутамінову кислоту в положенні 52. Білок CRM197 є перспективним ад'ювантом нового покоління, який може бути успішно використаний у вакцинних та терапевтичних препаратах. Як показано в цьому розділі, класичним способом отримання дифтерійного токсину та його нетоксичних похідних є продукція у клітинах *Corynebacterium diphtheriae*. Перевагами використання *E. coli* як продуцента є те, що даний метод є більш простим і дешевим, а також дозволяє

отримувати рекомбінантний білок CRM197 у короткий термін з використанням непатогенного мікроорганізму. В ході дослідження авторами підібрано оптимальну технологічну схему індукції експресії гена CRM197, розроблено метод отримання високоочищеного препарату рекомбінантного CRM197 шляхом послідовного застосування іонообмінної, гідрофобної та молекулярно-ситової типів хроматографії. CRM197 використовується як білок-носіє у багатьох кон'югованих вакцинах, таких як пневмококові (*Prevenar™*), менінгококові (*Menveo®*, *Menjugatec®*, *Meningitec®*), а також проти гемофільної палички *H. influenzae B* (*HibTITER®*, *Vaxm-H®*). В даний час крім оцінки ефективності препаратів, що вже застосовуються, до складу яких сходять CRM197, активно йде розробка нових полі- і олігосахаридних вакцин проти різних бактеріальних інфекцій з CRM197 у своєму складі. Однак нещодавно з'явилася повідомлення про альтернативні методи виділення нерозчинних білків, експресованих у *E. coli*. У порівнянні з традиційною денатурацією/рефолдингом у цих методах використовується неденатуруючий агент N-лауроїлсаркозин (інгібітор транскрипції ДНК), що дозволяє отримати більшу ступінь вилучення нативних білків. Білки солубілізували з використанням N-лауроїлсаркозину, очищення білків проводили Ni-афінною та ексклюзійною хроматографією.

4.1.2. Вакцини для профілактики правцевої інфекції

Правцевий токсин (*Clostridium tetani toxin*) являє собою білок, неміцно зв'язаний зі стромою бактеріальної клітини. Процес утворення токсину (тетаноспазміну) в культурі знаходиться в прямій залежності від наявності в поживному середовищі гістидин-вмісних пептидів. Припускають, що ці пептиди індукують у правцевих паличок синтез особливої протеази (пептидази), яка бере участь або в активації тетаноспазміну, або його відщепленні від субклітинних мембранних структур. Молекулярна маса тетаноспазміну знаходиться в межах 141–160 кДа. Токсичний білок є термолабільним і втрачає активність після 20–25 хв прогрівання при 60–62 °С. Токсин складається з двох субодиниць з молекулярними масами 53 і 107 кДа, причому при дисоціації обидва фрагменти позбавлені токсичних властивостей. Крім тетаноспазміну у культуральній рідині виявляється ще один компонент – тетанолізін з молекулярною масою близько 60 кДа. Тетанолізін виділяється з клітин як екзотоксин з перших днів розвитку по-

пуляції через неушкоджені структури клітини, імовірно, за допомогою активного перенесення. Тетаноспазмін не проходить через клітинні стінки і виділяється в культуральну рідину лише при розпаді мікробних клітин, переважно у фазі прискореної загибелі популяції.

Ефективні вакцини проти правця стали доступні з 1920 років і завдяки їх масовому застосуванню смертність від інфекції знизилася на 99 %.

Штamu *Clostridium tetani*. Збудник правця належить до анаеробів і являє собою спороутворюючі грампозитивні палички довжиною 4–8 мкм і товщиною 0,3–0,8 мкм, які розташовуються поодинокі або ланцюжком. *Cl. tetani* добре росте на середовищах, призначених для анаеробів. На середовищі типу Кітт-Тароцці ріст правцевих бацил проявляється у вигляді помутніння середовища та супроводжується виділенням осаду та газу. На напіврідкому агар-агарі стовпчиком при рості цієї палички можна спостерігати появу щільних сочевицеподібних колоній (R-форми) і колоній, які нагадують пушинку (S-форми). S-форма має більш виражені токсигенні властивості. Між спороутворенням та токсиноутворенням існує певний зв'язок. Високотоксигенні штами мають слабо виражену здатність до спороутворення, і навпаки. Правцева паличка виробляє кілька токсичних і ферментних речовин, які відіграють важливу роль у патогенезі захворювання: тетаноспазмін, гемолізін та ферменти – фібринолізин та протеази. Тетаноспазмін викликає типову клінічну картину правця. Гемолізін має кардіотоксичну та гемолітичну дію. Ферменти правцевої палички розщеплюють високомолекулярні сполуки тканин макроорганізму та сприяють найшвидшому проникненню та поширенню тетаноспазміну. В Україні та Німеччині, наприклад, при виробництві правцевого токсину використовують штам Колле 154 № 471 і 473, в інших країнах використовується штам Гарвард.

У літературі є дані про важливість «віку» посівного матеріалу – відзначається перевага «старих» культур від 2 місяців до 3 років. Робочі штами зберігають на поживних середовищах при 4–8 °С. Зберігання архівних штамів здійснюється у ліофілізованому стані. Штами, що використовуються для виробництва вакцин, повинні бути ідентифіковані на підставі документа, в якому містяться відомості про їх походження, характеристики в момент виділення, а також докладні дані про результати всіх тестів, які регулярно проводяться для підтвердження властивих цим штамам характеристик.

Поживні середовища. Для отримання правцевого токсину використовується ряд поживних середовищ, докладно описаних у літературі. Вибір поживного середовища багато в чому залежить від штаму бактерій, методів культивування, очищення та детоксикації. Уряді країн для культивування використовується *казеїново-рослинне середовище*, оскільки в цих країнах використовується один штам правцевої культури та досить близькі технологічні схеми одержання препаратів. Казеїн (глікопротеїн молока) є прийнятним джерелом харчування правцевої культури. Під час проведення кислотного гідролізу казеїну в гідролізаті виявляються амінокислоти, необхідні росту культури *Cl. tetani* та утворення правцевого токсину.

Методика виготовлення середовища: готують суміш казеїну (вміст жиру не більше 2 %), води очищеної, концентрованої хлоридної кислоти у співвідношенні 1 : 15 : 0,5. Гідроліз проводять при температурі 127 °C протягом 2 годин. Нерозщеплений у процесі гідролізу білок осаджують в ізоелектричній точці. Отриманий гідролізат розводять водою до кінцевого вмісту пептону близько 3,0 % та обробляють активованим вугіллям для освітлення (із розрахунку 2 кг вугілля на 100 л гідролізату). Суміш кип'ятять протягом 10–15 хв, а потім вугілля відокремлюють фільтрацією. Освітлений гідролізат містить 450–470 мг% загального азоту, 220–240 мг% амінного азоту, 2,6–3,0 % пептону.

При виробництві правцевого токсину якість отриманого кислотного гідролізату значною мірою визначає як токсиноутворення, так і процес подальшого очищення. Необхідно враховувати, що кислотний гідроліз білкової сировини відбувається не тільки на стадії власне витримування реакційної суміші при заданій температурі, але і під час доведення її до цієї температури, а також при охолодженні отриманого гідролізату до температури, вказаної в технології. Так, при гідролізі казеїну 80 % продуктів гідролізу накопичується на стадії нагрівання. Причому внесок стадій нагрівання та охолодження у цей процес зростає зі збільшенням місткості апарату, що очевидно вимагає проведення валідації процесу при масштабуванні.

Для приготування автолізату висівок використовують пшеничні висівки крупного помелу (вологість – 11–13 %, вміст крохмалю – 23–30 %), які поміщають у воду очищену в співвідношенні 1 : 6, додають 1 % хлороформу та витримують при 45 °C протягом 15 год при періодичному по-

мішуванні для проведення автолізу. До 100 л казеїнового гідролізату додають 25 л автолізу висівок. Суміш розводять водою до вмісту амінного азоту – 130–150 мг%, доводять до кипіння, додають 0,05 % двозаміщеного фосфату натрію та 0,05 % однозаміщеного фосфату калію, встановлюють рН на рівні 7,4–7,6 та кип'ятять ще 10 хвилин. У середовище додають вітаміни (піридоксин, рибофлавін, тіамін, фолієву та нікотинову кислоти). Середовище фільтрують та стерилізують при 110–112 °С протягом 30 хв. Для збереження ростових властивостей поживного середовища можна використовувати метод мембранної фільтрації.

Концентрація пептону в середовищі становить 1,5–1,7 %, амінного азоту – 130–150 мг%, що дозволяє забезпечити бактерії правця джерелом азоту, який необхідний культурі мікроорганізмів для життєдіяльності. Як джерело вуглецю та енергії до складу середовища вводиться 0,5 % стерильний розчин глюкози, який вводиться в стерильне середовище. Продукти автолізу висівок та вітаміни використовуються як фактори росту, які необхідні мікроорганізмам у малих дозах для синтезу біологічно активних речовин, які регулюють внутрішньоклітинний метаболізм. Джерелом фосфорного харчування є фосфати калію і натрію, які додаються в середовище. Неорганічні солі служать джерелом іонів, необхідних для нормального функціонування клітин *Cl. tetani*, а також виконують буферну функцію, нівелюючи значні зміни рН у процесі росту мікроорганізмів.

Ряд виробників використовують синтетичні середовища, наприклад, середовище Мюллера в модифікації Міллера з додаванням екстракту тканини бичачого серця та казамінових кислот. Казамінові кислоти являють собою суміш амінокислот і коротких пептидів, одержуваних в результаті кислотного гідролізу казеїну. Казамінові кислоти зазвичай використовуються для приготування штучних мікробіологічних поживних середовищ. Додавання у середовище білків тваринних тканин призводить до труднощів у процесі очищення та детоксикації токсину. Останнім часом проводяться роботи з отримання поживних середовищ з панкреатичних гідролізатів соєвих білків, причому важливу роль у токсиноутворенні відіграє співвідношення ароматичних амінокислот і проліну.

Отримання правцевого токсину. Спочатку отримують маточні культури 2–3 генерацій на поживному середовищі, яке використовується для виробничого посіву, або першу генерацію проводять на середовищі для вирощування анаеробних мікроорганізмів.

Для виробничого процесу використовують реактори об'ємом від 500 до 2000 л поживного середовища. Реактор є ємністю з нержавіючої сталі, має сорочковий простір для подачі пари або води. Чим більший об'єм поживного середовища в реакторі, тим вищий вихід при отриманні нативного токсину. Очевидно, це пов'язано зі специфічними особливостями перебігу процесу токсинування у великих ємностях, де спостерігається інтенсивне наростання мікробної маси (високий стовп середовища – анаеробні умови), антигенних та токсигенних властивостей токсину, що супроводжується більшою зміною азотистого складу середовища. Так, кількість білкового азоту та високомолекулярних пептидів знижується, а вміст амінного азоту зростає. Крім того, при токсинуванні відмічено більш енергійне споживання аспаргінової, глютамінової кислот та гістидину.

Реактор стерилізують при 132 °C протягом 2 год. Потім завантажують поживне середовище на 65–70 % об'єму реактора та стерилізують при 112 °C протягом 40 хв. Після закінчення стерилізації поживне середовище охолоджують до 40–45 °C і через пробовідбірник беруть пробу для контролю стерильності. Потім в асептичних умовах у реактор вводять 5–10 % інокуляту маточної культури. Вирощування можна проводити як за звичайних умов, так і при барботажі стерильним азотом або інертним газом. Є дані про позитивний вплив періодичного перемішування при 50 об/хв на токсинування культури правця. Активність токсину значно підвищується при використанні шару азоту над рідиною. Вирощування проводять при температурі 34–35 °C протягом 5–7 діб. До 3–4 дня культивування газоутворення значно знижується. Кожен виробник визначає термін вирощування, який залежить як від токсигенності використовуваного штаму, так і від повноцінності поживного середовища, і навіть умов культивування. При тривалому вирощуванні кількість біомаси накопичується і очищення кінцевого продукту ускладнюється, при цьому вміст токсину практично не збільшується і навіть навпаки – токсин гідролізується власними протеазами.

Після закінчення культивування проводять вилучення вмісту реактора для перевірки чистоти культури. Суспензію правцевої культури подають на суперцентрифуги або сепаратори зі швидкістю обертання не менше 12–15 тис. об./хв. Отриману культуральну рідину фільтрують через багаторамні фільтри з встановленими на них глибинними фільтрами з розміром пор від 2 до 0,22 мкм мкм. Фільтрацію проводять послідовно на

двох видах глибинних фільтрів: освітлювальних (1–2 мкм і 0,5 мкм) і стерилізуючих (0,22 мкм). Профільтрований токсин надходить у реактор-детоксикатор. На цьому етапі можливе проведення ультрафільтрації токсину на мембранах з порогом відсікання 50 кДа з метою видалення низькомолекулярних домішок токсину, залишків поживного середовища та концентрації. Запропоновано також пропускати суспензію клітин *Cl. tetani* з високою швидкістю паралельно поверхні мембрани. Даний метод ми обговорювали в описі виробництва дифтерійного токсину, а враховуючи великі об'єми культуральної рідини, одержувані під час виробництва правцевого токсину, цей метод є ще перспективнішим. Зважаючи на те, що правцевий токсин дуже нестійкий і швидко руйнується під впливом повітря, світла, температури та різних хімічних факторів, важливо підібрати такі умови знешкодження, які б дозволили отримати нешкідливий препарат, який максимально зберіг антигенну активність. За даними літератури, токсин, що містить не менше 500 000 dlm/мл, найбільш придатний для подальшої детоксикації та очищення.

Детоксикація та очищення правцевого токсину. Детоксикація правцевого токсину, як і у випадку з дифтерійним токсином, протікає у дві стадії. Протягом першої стадії (швидкої та оборотної) відбувається взаємодія вільних аміногруп (насамперед лізину) з формальдегідом, при цьому утворюються метилоамінні групи. На другому етапі реакції беруть участь активні радикали циклічних амінокислот, що містять фенольні, амідозольні, індольні і гуанідинові групи (тирозин, аргінін, гістидин, триптофан). Ці групи, поєднуючись за рахунок активних атомів водню з метилоамінними групами, утворюють міцні зв'язки із залишками лізину через метиленові містки. Найбільше значення має з'єднання через формальдегід вільних аміногруп лізину з СН-групами тирозину та гістидину, які характеризуються великою стійкістю. Блокування формаліном активних радикалів токсину призводить до його знешкодження.

При знешкодженні нативних правцевих токсинів полімерів не утворюється, проте має місце часткова конденсація з низькомолекулярними речовинами, що призводить до незначного збільшення молекул антигена. Внаслідок блокування вільних аміногруп відбувається також зміна заряду молекул антигена, а саме збільшення його негативного заряду, що виражається у відмінності ізоелектричних точок токсину та анатоксину. Усі

основні зміни відбуваються у перші 12 годин, коли токсичність та вільний формалін знижуються на 98 % та 63 % відповідно.

У реактор-детоксикатор додають 0,35–0,4 % формаліну і знешкодження проводять при 37–38 °С протягом 2–4 діб. При детоксикації відбувається як знешкодження токсину, так і стабілізація структури антигена.

Важливе значення у процесі знешкодження токсину має величина рН. Підвищення рН сприяє збільшенню фіксації формальдегіду. Для знешкодження найоптимальнішим є рН 7,2–7,3. Зв'язування аміногруп призводить до вивільнення СООН-груп та зниження рН, що потребує постійного коригування величини рН.

Для детоксикації правцевого токсину було вивчено ряд сполук: формальдегід, глутаровий діальдегід, малоновий діальдегід, бурштиновий діальдегід і бета-пропілактон. Формальдегід та глутаровий альдегід продемонстрували практично однакові результати, інші сполуки показали невисоку активність при детоксикації правцевого токсину. Виявлено кореляцію між процесом детоксикації та реакціями метилювання. Незважаючи на значний обсяг досліджень, присвячених процесу детоксикації правцевого (як і дифтерійного) токсину, чіткого механізму цього явища досі не описано.

Очищення правцевих антигенів на стадії анатоксинів має істотний недолік, тому що очищенню піддається препарат, в якому молекули специфічного білка вже частково утворили комплекс із низькомолекулярними та середньомолекулярними сполуками нативного анатоксину та поживного середовища. Крім того, у процесі формольної детоксикації відбувається утворення полімерних комплексів зі сполук поживного середовища, які ускладнюють подальше очищення.

Правцевий токсин після 2-денного знешкодження осаджують в ізоелектричній точці (рН 3,4–4,0), що створюється 1Н хлоридною кислотою в присутності 0,25 % гексаметофосфату натрію (сіль Грахама – використовується як коагулянт для осадження білків). Осадження проводять у реакторі-детоксикаторі при температурі 2–6 °С та постійному перемішуванні при 50–70 об/хв. Отриманий препарат за допомогою тиску чи перистальтичного насосу передають на суперцентрифугу або сепаратор з охолодженням, щоб температура супернатанту не перевищувала на виході 4–6 °С. Осад розчиняють у 0,005 М фосфатному буфері. Далі проводять очищення препарату від баластних білкових домішок.

Існує кілька *методів очищення, які використовуються на сьогоднішній день світовими виробниками вакцин:*

1. *Ультрафільтрація.* Ґрунтується на різному розмірі молекул правцевого анатоксину та низькомолекулярних речовин, які вільно проходять через розділяючі мембрани. Проводячи ступінчасту ультрафільтрацію можна відокремити високомолекулярні домішки. Підбір мембран для розділення проводять враховуючи діаметр молекул речовин, які розділяються, їх молекулярної маси, рН розчину, концентрації білкових компонентів у розчині і температури процесу. Необхідно також враховувати ефект поляризаційного шару макромолекул, який накопичується і може призвести до утворення гелевої фази, що помітно впливає на швидкість і ефективність процесу ультрафільтрації.

2. *Гель-фільтрація* забезпечує розділення речовин відповідно до розміру та молекулярної маси молекул. При гель-фільтрації через пористі структури малі молекули глибше проникають у пори гранул і відстають від молекул великого розміру, які обходять ці гранули. Наприклад, при гель-фільтрації через гелі Сефадекс G-75, G-100 першими елююються найбільші молекули, а потім інші в порядку зменшення їх розміру. Гель-фільтрація дозволяє відділити правцеві анатоксини від основної маси низькомолекулярних та середньомолекулярних домішок. На швидкість руху розчиненої речовини можуть впливати коефіцієнт ефективної дифузії розчиненої речовини в гелі, здатність розчиненої речовини адсорбуватися на внутрішніх поверхнях адсорбенту, а також осмотичний тиск.

3. *Іонно-обмінна хроматографія* проводиться на диетиламіноетилцелюлозі (ДЕАЕ-целюлозі), карбоксиметилцелюлозі (КМ-целюлозі), іонообмінних сефадексах. Метод ґрунтується на використанні відмінностей у зарядах молекул анатоксину та баластних білків у препараті. В іонно-обмінній хроматографії розчин суміші білків токсину (анатоксину) пропускають через колонку з нерухомим шаром іонообмінної смоли. Наприклад, КМ-целюлоза – катіонообмінна смола, одержувана за допомогою введення карбоксиметильних груп, які несуть негативний заряд, в целюлозну матрицю. Білки в катіонній формі, які несуть позитивний заряд, зв'язуються з цією смолою електростатичними силами. Потім адсорбований білок елюють буферними розчинами зі зростаючими значеннями іонної сили (або рН). Поступова зміна властивостей елюентів призводить до того, що слабо зв'язані зі смолою білки десорбуються першими, а по-

тім елююються білки, які зв'язані міцніше. Аналогічно здійснюють і хроматографію анатоксинів на аніонообмінниках, наприклад, ДЕАЕ-целюлозі. Елюювання проводять буферними сумішами з рН близько 7,5 (наприклад, трис-буфером, що містить 80 мМ хлористого натрію). Отриманий частково знешкоджений очищений концентрований анатоксин піддають стерилізуючій фільтрації через фільтри з розміром пор 0,22 мкм, додають 0,15–0,2 % формаліну та інкубують при температурі 37–38 °С протягом 15–18 днів для повного знешкодження. При необхідності в процесі детоксикації використовують L-лізин, який згодом видаляється ультрафільтрацією. На цьому етапі позбавляються присутності в препараті вільного формальдегіду.

Таким чином, розглянуто один із варіантів отримання правцевого анатоксину (токсоїду), який ґрунтується на очищенні частково знешкодженого токсину. Водночас, ряд виробників використовують й іншу схему отримання препарату – очищення на стадії правцевого токсину. Отриманий стерильний розчин токсину концентрують шляхом обробки сірчано-кислим амонієм до 25 % насичення. Суміш витримують при температурі 4–8 °С протягом 1 год і осад баластних білків відокремлюють центрифугуванням. До прозорого розчину знову додають сірчано-кислий амоній до 45 % насичення витримують для формування осаду при 4–8 °С, осад відокремлюють центрифугуванням. Отриманий осад розчиняють у воді для ін'єкцій та проводять визначення специфічної токсичності та вмісту білкового азоту. Визначення Lf проводять аналогічно методу у дифтерійному анатоксині. Потім розчин піддають колоночній іонообмінній хроматографії на *Q-Sepharose Fast Flow*. Сорбовані фракції елюють спеціальним буферним розчином. Процес хроматографічного очищення проводять двічі. Отриманий розчин токсину концентрують та очищають ультрафільтрацією або діалізом. Очищений правцевий токсин контролюють на вміст Lf/мл, білкового азоту та ендотоксину. Розчин токсину піддають детоксикації за допомогою формаліну. Для стабілізації токсину розчин додають амінокислот (лізин і N-ацетил-триптофан) і проводять детоксикацію протягом 18–21 днів при 34–35 °С, причому формалін додають дробно протягом перших трьох днів. Після завершення процесу детоксикації розчин анатоксину піддають стерилізуючій фільтрації через фільтри 0,22 мкм, додають консервант мертіюлят і поміщають при температурі 2–8 °С на весь період подальшого контролю. Принципова схема наведена на рис.4.4.

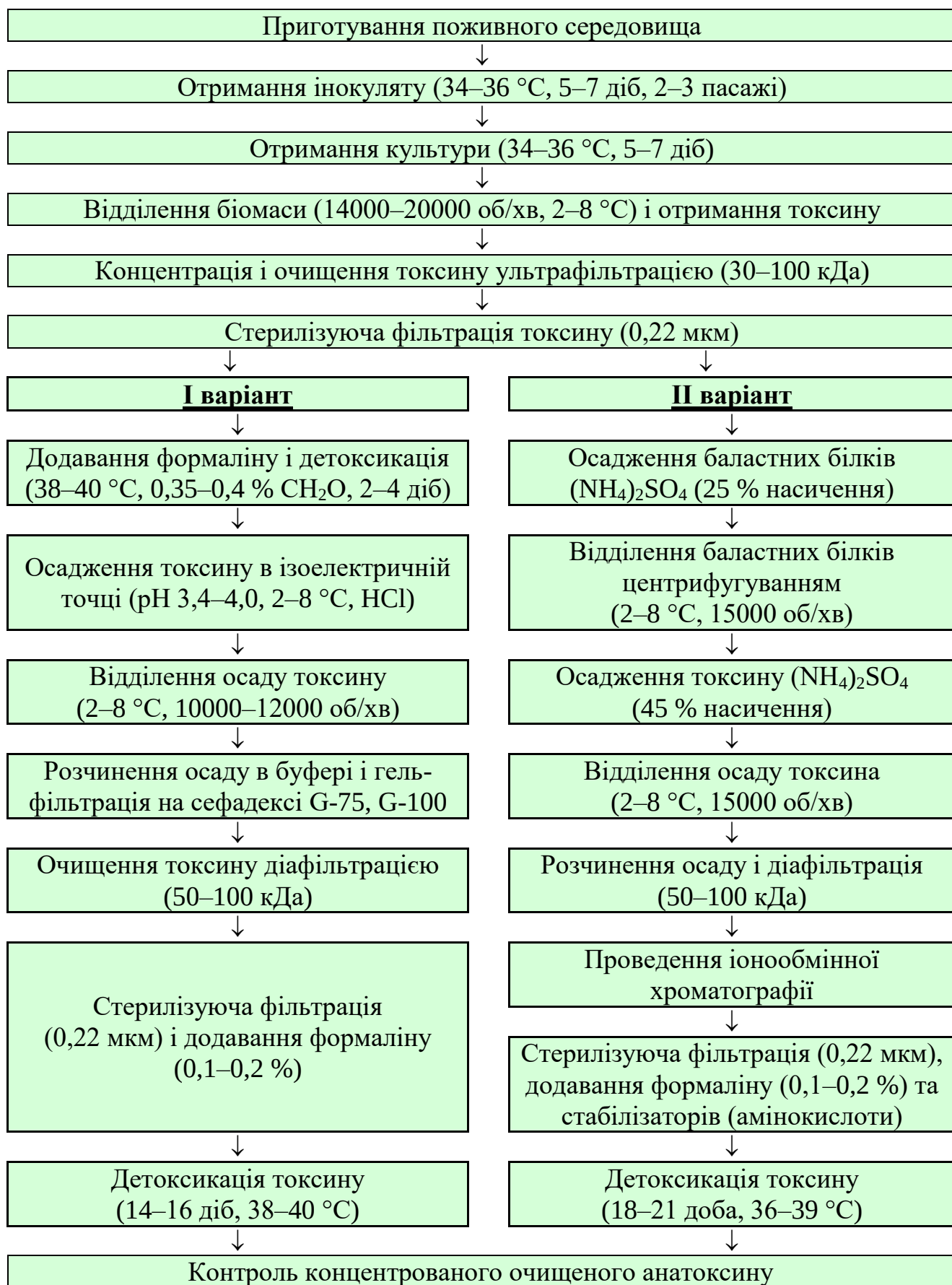


Рисунок 4.4 – Схема отримання правцевого анатоксину

Контроль очищеного концентрованого правцевого анатоксину

здійснюється відповідно до рекомендацій ВООЗ, перелік тестів аналогічний контролю дифтерійного анатоксину (див. розділ 4.1.1). Очищений правцевий анатоксин має містити не менше 1000 Lf (1000 ОЗ (одиниць зв'язування)) на 1 мг білкового азоту. Величина рН має бути від 6,0 до 7,0. Концентрацію антигена бажано оцінювати шляхом визначення тестів *in vivo* – реакцією антитоксин зв'язування. Іншим відповідним методом є реакція флокуляції (Lf) з протиправцевою флокулюючою сироваткою.

Отриманий по даній схемі правцевий анатоксин та вакцини, які містять ці антигени використовуються для вакцинації населення і сьогодні. У попередньому розділі ми зазначили наявність генетично інактивованого дифтерійного токсину. Зовсім недавно (2019–2020 рр.) було показано, що одна амінокислотна мутація знижує транслокацію легких ланцюгів в молекулі правцевого токсину, що дозволило розробити рекомбінантний повнорозмірний правцевий токсин (відомий як 8МТТ з молекулярною масою 150 кДа) з 8 окремими амінокислотними мутаціями, які інактивували каталазу, транслокацію легких ланцюгів та зв'язування з рецептором, зберігаючи при цьому амінокислотну ідентичність з нативним правцевим токсином на 99 %. Як згадувалось вище, навантаження правцевого антигена за вимогами ВООЗ становить 1000 Lf на 1 мг білкового азоту, тоді як навантаження генетично інактивованого антигена склало 3500 Lf на 1 мг білкового азоту. Це особливо важливо у зв'язку з тим, що в антигенах, отриманих за старими протоколами виготовлення, міститься від 20 до 70 % білкових домішок.

Для отримання 8МТТ був створений штам *E. coli* Gor/Met™, який експресує в цитоплазмі розчинні правильно укладені дисульфідно-зв'язані білки і відщеплює N-кінцевий метіонін від знов синтезованих білків. Gor/Met™ *E. coli* був сконструйований шляхом делеції гена глутатіонредуктази (*gor*) для створення цитоплазми, яка дозволяє експресувати розчинні білки, зв'язані дисульфідним зв'язком, а також проведена вставка гена, що кодує метіонінамінопептидазу. Вирощування штаму Gor/Met™ *E. coli* проводили при температурі 22–28 °С, з подальшим відділенням біомаси, очищенням білка на іонобмінній смолі, концентрацією тангенціально-проточною фільтрацією через мембрани з порогом відсікання 50 кДа до 10 мг 8МТТ/мл, іонообінною хроматографією та стерилізуючою фільтрацією. Вміст ендотоксинів у процесі очищення знижувався з 1000 МО/мг

до <5 МО/мг білка 8МТТ. Виявлено, що 8МТТ у 50 млн разів менш токсичний, ніж активний правцевий токсин при збереженні імуногенної активності.

Імунізація мишей показала, що 8МТТ є імуногенною вакциною, ефективною і як білок-носієм для кон'югатів пептидів і полісахаридів. Дослідження підтвердили, що 8МТТ є перспективною та життєздатною вакциною при кон'югуванні з іншими компонентами. Розробка рекомбінантного, генетично детоксикованого токсину, що продукується *E. coli*, приводить протиправцеву вакцину у відповідність до сучасних вимог виробництва, нормативних вимог, стандартизації та безпеки. Переваги цієї вакцини на основі рекомбінантного білка 8МТТ очевидні: високий ступінь очищення продукту; можливість використання як білка носія для кон'югованих вакцин, наприклад, кон'югація з полісахаридами; виробництво є значно простішим, швидшим та безпечнішим порівняно з виробництвом хімічно інактивованого токсину; потребує значно меншого використання лабораторних тварин на всіх етапах виробництва та готового препарату; можливість одержання продукту на стандартних біотехнологічних виробництвах.

Запропоновані стандартні методи контролю препарату для серійного виробництва: вестерн-блот, SDS-PAGE, мас-спектроскопія, аналіз пептидів, картування пептидів для визначення послідовності та утворення дисульфідних зв'язків, безпечність виробництва (ендотоксини, домішки клітин-господарів), агрегація (BEPX), термостабільність, випробування на токсичність.

4.1.3. Вакцина для профілактики кашлюкової інфекції: клітинна та ацелюлярна

Кашлюкові антигени (*Bordetella pertussis*) представлені переважно чотирма фракціями. Кашлюковий токсин міцно зв'язаний із стромою кашлюкових бактерій. Максимальна кількість виявляється в період експоненційної фази, а в популяціях, які відмирають, токсин не виявляється. Для вилучення токсину з клітин найчастіше використовують дезінтеграцію. Кашлюковий токсин є провідним токсином, яка визначає патогенез та клініку захворювання, а також протективним антигеном, що забезпечує формування напруженого імунітету.

Кашлюковий токсин являє собою складний білок з молекулярною масою близько 105 кДа. Подібно до дифтерійного токсину, він складається з кількох субодиниць: А-промотора (26,2 кДа) і В-олігомеру (21,9, 21,8, 12 і 11,7 кДа). Кашлюковий токсин бере участь в адгезії мікроба до циліарних клітин та подальшої його інвазії, модифікує білкові регуляторні компоненти аденілатциклазної системи еукаріотичних клітин різних органів, позбавляючи аденілатциклазу клітини можливості модулювати рівень циклічного аденозинмонофосфату. Це призводить до порушення нормальної роботи еукаріотичної клітини та її загибелі. Антитоксичні антитіла проти кашлюкового токсину виявлені в сироватках реконвалесцентів (осіб, які переохворіли) і вакцинованих корпускулярно кашлюковою вакциною (ККВ).

Філаментозний гемагглютинін (ФГА) – фактор патогенності, який також міцно зв'язаний із стромою кашлюкових бактерій і може бути вилучений при руйнуванні клітини дезінтеграцією. ФГА – це білок з молекулярною масою близько 220 кДа, не токсичний, бере участь в адгезії кашлюкової бактерії до циліарних клітин та колонізації респіраторного тракту. Антитіла проти ФГА виявлені у реконвалесцентів та вакцинованих ККВ, вони запобігають адгезії бактерії на поверхні війчастого епітелію дихальних шляхів, тим самим перешкоджаючи інфікуванню організму.

Пертактин (ПРН) – фактор вірулентності, білок з молекулярною масою 69 кДа, що входить до складу зовнішньої мембрани клітини кашлюкової бактерії, бере участь в адгезії та інвазії клітин, включаючи війчастий епітелій та альвеолярні макрофаги, нетоксичний. Антитіла до ПРН виявлені у реконвалесцентів та вакцинованих ККВ.

Аглютиногени (АГГ) – фімбрії, які визначають серологічну специфічність кашлюкових бактерій. За вмістом основних аглютиногенів штами поділяють на серологічні варіанти (серовари): 1.0.0., 1.2.0., 1.0.3. та 1.2.3. Антитіла до АГГ виявлені у сироватках реконвалесцентів та вакцинованих ККВ.

Аденілатциклаза (АЦ) – фактор вірулентності, екзофермент, біфункціональний білок з молекулярною масою 200 кДа. АЦ підвищує рівень внутрішньоклітинного аденозинмонофосфату в еукаріотичних клітинах до токсичних концентрацій, викликаючи глибокі зміни у клітинному метаболізмі аденозинмонофосфату. У осіб, що переохворіли на кашлюк, і вакцинованих антитіла проти АЦ виявляються у високих титрах.

Термолабільний токсин (ТЛТ) – білковий внутрішньоклітинний токсин, за видом пошкоджуючої дії віднесений до типу цитотоксинів, до групи дермoneкрозинів; при 56 °С повністю знешкоджується протягом 30 хв. ТЛТ вибірково діє гладку мускулатуру судин, викликаючи їх звуження з наступною дегенерацією.

Трахеальний цитотоксин (ТЦТ) – фрагмент пептидоглікану клітинної стінки призводить до місцевих ушкоджень, руйнує війчастий епітелій.

Штами *Bordetella pertussis*. По морфології штами кашлюку – нерухомі, грамнегативні, овоїдної форми палички, що розташовуються в мазках окремо або парами, без ознаки поліморфізму. На щільних середовищах утворюють опуклі, круглі, блискучі, напівпрозорі колонії із рівними краями діаметром близько 1 мм. Культури повинні аглютинуватися антибактеріальною кашлюковою сироваткою 1 фази не нижче 3/4 її титру та відповідними моноспецифічними сироватками до основних аглютиногенів 1, 2 і 3 у їхньому робочому розведенні. Вірулентні властивості визначають шляхом введення свіжоприготовленої мікробної суспензії мишам масою 14–16 г. При зараженні інтраназально величина LD₅₀ повинна бути в межах 0,01–0,2 MEM (1 MEM = 1 млрд кашлюкових бактерій) та при внутрішньомозковому – не вище 0,025 MEM. Токсичність визначають на кроликах і мишах: суспензія зі свіжої 2-добової культури при введенні кроликам внутрішньошкірно в дозі 1 MEM повинна викликати некроз у діаметрі не більше 2 см; на мишах токсичність визначають за приростом маси тіла. Зберігають штами в рідкому азоті або в ліофілізованому вигляді.

Штами, що використовуються для виробництва вакцин, повинні бути ідентифіковані на підставі документа, в якому містяться відомості про їх походження, характеристики в момент виділення, а також докладні дані про результати всіх тестів, які регулярно проводяться для підтвердження властивих цим штамам характеристик. Штами необхідно вибирати таким чином, щоб у готовій вакцині містилися аглютиногени 1, 2 та 3 типів. Для виробництва ацелюлярного компонента використовують ряд штамів, наприклад, у Японії використовується штам *Tochama*.

Поживні середовища. Для виробництва кашлюкових вакцин використовуються різноманітні поживні середовища: рідкі та тверді, натуральні, напівсинтетичні та синтетичні. Ми зупинимося на твердому живильному середовищі – *казеїново-вугільному агарі* (КВА), який використовується на території кількох країн, у тому числі й в Україні. КВА складається

ся з кислотного гідролізату казеїну, діалізату дріжджів, агар-агару, активованого вугілля, розчинного крохмалю та мінеральних солей.

До казеїну додають концентровану хлоридну кислоту та воду очищену у співвідношенні 2 : 1 : 1. Суміш гідролізують при температурі 127 °С протягом 2 год. Потім гідролізат розводять водою (1: 1) і фільтрують. Фільтрат розводять водою до кінцевого об'єму, додають активоване вугілля з розрахунку 2–3 г/л гідролізату і автоклавують при 110 °С протягом 30 хв. Отриманий освітлений гідролізат фільтрують. Ступінь розщеплення білка в гідролізаті має бути не менше 97,0 %. Вміст амінного азоту становить 900–1030 мг%, загального азоту – 910–1080 мг%, хлоридів – 4,5–6,0 %. Діалізат пекарських дріжджів отримують шляхом ультрафільтрації суспензії дріжджів на апаратах з порогом відсікання 10 кДа або діалізної плівки. Перший спосіб – кращий, оскільки в процесі ультрафільтрації безпосередньо отримують стерильний продукт.

Методика приготування середовища: гідролізат казеїну розводять водою до кінцевої концентрації 150–160 мг% амінного азоту, доводять величину рН до 6,9–7,1 розчином 20 %-вого NaOH, потім вносять розчини солей (дигідрофосфат калію, сульфат заліза), діалізат дріжджів та цистеїн, доводять рН до 6,9–7,1. Визначають кількість хлориду натрію і при необхідності доводять його концентрацію до 0,9 %. Потім додають агар-агар (2,5–3,0 %), нагрівають при 100 °С протягом 30 хв, відстоюють суміш і відокремлюють від осаду, встановлюють рН $7,3 \pm 0,05$, додають активоване вугілля, розливають у ємності для вирощування кашлюкових бактерій і стерилізують при температурі 110 °С протягом 30 хв. Концентрація амінного азоту в запропонованому середовищі становить 150–160 мг%, що дозволяє забезпечити бактерії кашлюку джерелом азоту. Для покращення ростових властивостей середовища КВА використовують амінокислоту цистеїн та дріжджовий аутолізат, який містить необхідні фактори росту. Агар-агар забезпечує густину середовища, а активоване вугілля виконує функцію адсорбенту.

Культивування штамів *B. pertussis*. Вирощування проводять на двох видах поживних середовищ: твердих агаризованих та рідких.

Вирощування кашлюкових бактерій на твердих агарових середовищах. Для вирощування культури на середовищі КВА використовують скляні матраци. Суху ліофілізовану культуру кашлюкових бактерій висівають на середовище КВА, вирощують при 35–36 °С протягом 2–3 діб.

Потім пересівають на пробірки з аналогічним середовищем і вирощують за вказаної температури протягом 44–48 год. Отриману культуру бактерій контролюють на бактеріологічну чистоту та морфологію шляхом перегляду мазків, забарвлених за Грамом. Культуру використовують для підготовки посівного матеріалу та збереження штаму. Зберігають культуру при 4–10 °С з пересіваннями через кожні 7–10 днів. Для виробничих посівів культуру можна використовувати не більше 4–5 генерацій (протягом 1 місяця).

Культуру для посівного матеріалу та в масовому посіві вирощують на скляних матрацах протягом 44–48 год із обов'язковою перевіркою морфології та чистоти. Змив культури здійснюють 0,9 % розчином хлориду натрію з температурою 36–37 °С. Для отримання посівної (маточної) суспензії бактерій з 70–80 МЕМ/мл у кожний матрац додають 60–70 мл розчину хлориду натрію. Суспензію кожного матраца контролюють мікроскопічним дослідженням мазків, пофарбованих за Грамом. Потім проводять виробничий посів на матраци, додаючи у кожен 3–4 мл суспензії культури. Після рівномірного розподілу суспензії по поверхні середовища матраци поміщають при температурі 34–36 °С на 24 год засіяною поверхнею догори. Після цього матраци перевертають посівною поверхнею вниз і продовжують культивування ще 24 год. Перед змивом культури матраци переглядають і відбирають макроскопічно вільні від кантамінації. Потім із кожного матраца роблять мазки і перевіряють морфологію і відсутність сторонньої мікрофлори. У матраци, які містять лише типові кашлюкові мікроби, додають 0,9 %-вий розчин натрію хлориду, охолоджений до 10 °С по 50–60 мл, і змивають мікробну масу. Використання твердих поживних середовищ досить трудомістке, оскільки робота проводиться з кожним матрацом як при посіві, так і при подальших змивах. Крім того, значні трудовитрати припадають на мікроскопію культури кашлюку з кожного матраца, тому робота з рідкими середовищами є доцільнішою.

Вирощування кашлюкових бактерій на рідких середовищах. Для вирощування кашлюкових бактерій використовують модифіковане рідке поживне середовище *Stainer&Scholte*, яка містить 0,1 % (2,6-О-диметил)-метациклодекстрину та казамінові кислоти. Для вирощування культури у великих об'ємах використовують спеціальні ферментери з електронним автоматичним управлінням та реєстрацією основних параметрів, які конт-

ролюються при вирощуванні культур (рН, рО, температури, кількості мікроорганізмів). Вирощування проводиться протягом 48 год при 35–36 °С.

Культуру обов'язково відділяють від поживного середовища шляхом центрифугування або сепарування в асептичному режимі при 15 тис. об/хв зі швидкістю 0,3 л/хв. Осадження мікробної маси соляною кислотою хоч і трохи знижує протективну активність, але дозволяє відокремити разом з мікробною масою токсичні субстанції.

Отримання кашлюкової вакцини. Отриману суспензію кашлюкових бактерій розводять ізотонічним розчином натрію хлориду до концентрації 80-100 МЕМ/мл. У ємність із суспензією додають розчин формаліну до кінцевої концентрації формальдегіду 0,1 %, ретельно перемішують та витримують 20–24 год при кімнатній температурі. Потім суспензію перемішують, додають розчин мертіюляту (тіомерсалю) до кінцевої концентрації 0,01 % і витримують при температурі 2–10 °С протягом 3-х місяців.

Наступним етапом виготовлення вакцини є контроль кашлюкової суспензії. Отриманий препарат контролюють відповідно до рекомендацій ВООЗ за такими тестами:

1. *Інактивація бактерій та токсинів.* Вакцина не повинна містити біологічно активного термолабільного (дермoneкротичного) токсину. Слід показати, що метод приготування вакцини гарантує відсутність у готовому продукті активного дермoneкротичного токсину. Використовуваний метод інактивації токсинів повинен зводити до мінімуму біологічну активність фактора, що стимулює лімфоцитоз, зберігаючи при цьому імуногенність препарату. Оскільки ендотоксин (ліпополісахарид) є складовою частиною клітинної оболонки кашлюкових бактерій, його вміст найкраще регулюється шляхом зниження кількості бактерій, необхідних для досягнення прийнятного рівня активності вакцини. Для підтвердження повної інактивації та щоб переконатися, що мікроорганізми вбиті, зразок слід випробувати шляхом посіву на відповідне поживне середовище.

2. *Стерильність* – проводять тест на бактеріальну та грибкову стерильність відповідно до вимог ДФУ.

3. *Контроль чистоти культури* – проводять за допомогою мікроскопічного дослідження забарвлених мазків або посіву на відповідні культуральні середовища.

4. *Кількість залишкового вільного інактивуючого агента (формальдегіду)* визначають, наприклад, колориметричним методом при взаємодії

формальдегіду з сумішшю фуксину та сірчаної кислоти. Вміст формальдегіду в вакцині кашлюку, розведеної до концентрації готового препарату, не повинен перевищувати 0,2 г/л. Кількість мертіоляту визначають за допомогою будь-якого з методів: дитизонового, полярографічного, атомно-адсорбційного.

5. *Вміст мертіоляту* в кашлюковій вакцині, розведеної до концентрації готового препарату, не повинен перевищувати 0,01 %. Слід переконатися в тому, що в тій концентрації, в якій консервант присутній у готовій вакцині, він не проявляє несприятливої дії на кашлюковий імуноген або інші компоненти вакцини і не викликає будь-яких непередбачених побічних реакцій.

6. *Активність (імуногенність)* визначають шляхом порівняння з активністю еталонної вакцини, відкаліброваної за Міжнародним стандартом вакцини кашлюку або за еквівалентною стандартною вакциною, затвердженою національним органом контролю. Активність вакцини визначається за допомогою протективного тесту на мишах при внутрішньомозковому введенні заражаючої дози вірулентного штаму бактерій. Активність готової вакцини в об'ємі, рекомендованому як разова доза для людини, повинна становити не менше 4,0 МО.

Отримання ацелюлярної кашлюкової вакцини. Для профілактики кашлюку вже протягом півстоліття використовують кашлюкову клітинну вакцину. При досить високій імуногенності цієї вакцини (забезпечення захисту у щеплених дітей становить 70–90 %) виявляються досить серйозні поствакцинальні ускладнення, переважно неврологічного характеру. У зв'язку з цим у ряді країн було розпочато роботи зі створення безклітинної вакцини, що містить ацелюлярний кашлюковий компонент. Причому в різних країнах до складу вакцини вводили антигени кашлюку різної структури. Основними компонентами були: кашлюковий токсин, ФГА, ПРН та АГГ. У 1981 році в Японії на 5000 дітей була випробувана вакцина (вакцина Sato Y.), що включає ФГА, кашлюковий токсин, детоксикований формаліном, дифтерійний та правцевий анатоксини. При випробуванні препарату не виявлено побічних ефектів та продемонстровано більшу ефективність порівняно з корпускулярною (клітинною) вакциною.

На сьогоднішній день оптимальний склад ацелюлярного компонента вакцини не встановлено, водночас накопичений досвід застосування безклітинних вакцин показує, що відповідь при первинній імунізації та рева-

кцинації дорівнює або навіть перевершує імунну відповідь на корпускулярну вакцину.

Технологічну схему отримання антигенів можна представити так (рис. 4.5):

- приготування рідкого поживного середовища *Stainer&Scholte*, модифікованого додаванням казамінових кислот і 1 мг/мл метил- β -циклодекстрину. рН середовища – 7,2–7,5, який встановлюють за допомогою 50 % розчину H_3PO_4 . Солі, які входять у середовище, стерилізують автоклавуванням при 120 °С протягом 15 хв, охолоджують і додають концентрат вітамінів, який пройшов стерилізуючу фільтрацію;

- отримання 2–3 генерацій культури кашлюкових бактерій у колбах у шейкері-інкубаторі, наприклад New Brunswick (модель 4300) при температурі 34–36 °С протягом 6, 12 і 28 годин для кожної генерації;

- культивування кашлюкових бактерій при температурі 34–36 °С протягом 48–60 годин при постійному перемішуванні (на даній стадії проводять визначення бактеріальної щільності при 650 нм, кольоровості суспензії, вмісту кашлюкового токсину та ФГА). При необхідності проводять додавання нових порцій середовища або її окремих компонентів. Можливе проведення аерації у процесі культивування. Інокулят, що додається в реактор, повинен перебувати у логарифмічній стадії росту;

- відділення біомаси від культуральної рідини шляхом суперцентрифугування або ультрафільтрації (у культуральній рідині проводять визначення білкового азоту, вмісту кашлюкового токсину та ФГА);

- концентрування культуральної рідини ультрафільтрацією у 10–15 разів, наприклад, на мембранах з порогом відсікання 20 кДа;

- фільтрація культуральної рідини через фільтри з величиною пор не більше 0,22 мкм;

- виділення ФГА та кашлюкового токсину з профільтрованої культуральної рідини;

- осадження гемагглютининів сульфатом амонію;

- очищення кашлюкового токсину хроматографією проводиться на колонках з афінним сорбентом (при цьому ФГА не зв'язується з сорбентом, а залишається в культуральній рідині). Потім кашлюковий токсин елюють з колонки буферним розчином і піддають діалізу, наприклад, трис-буфером (рН близько 8,0), що містить 0,6М натрію хлориду. Отриманий розчин повторно хроматографують на афінному сорбенті і після

елюювання та очищення ультрафільтрацією визначають вміст кашлюкового токсину, білкового азоту, ендотоксинів, домішок ФГА;

➤ очищення ФГА проводиться колоночною хроматографією на афінних сорбентах. Зв'язані фракції елюють спеціальним буфером, що десорбує ФГА. Процес хроматографії повторюють ще раз, у розчині контролюють вміст ФГА, ендотоксини, білковий азот та кашлюковий токсин. Необхідною умовою очищення антигенів є видалення ліпо-полісахаридів, наявність яких в антигені призводить до пірогенності препарату;

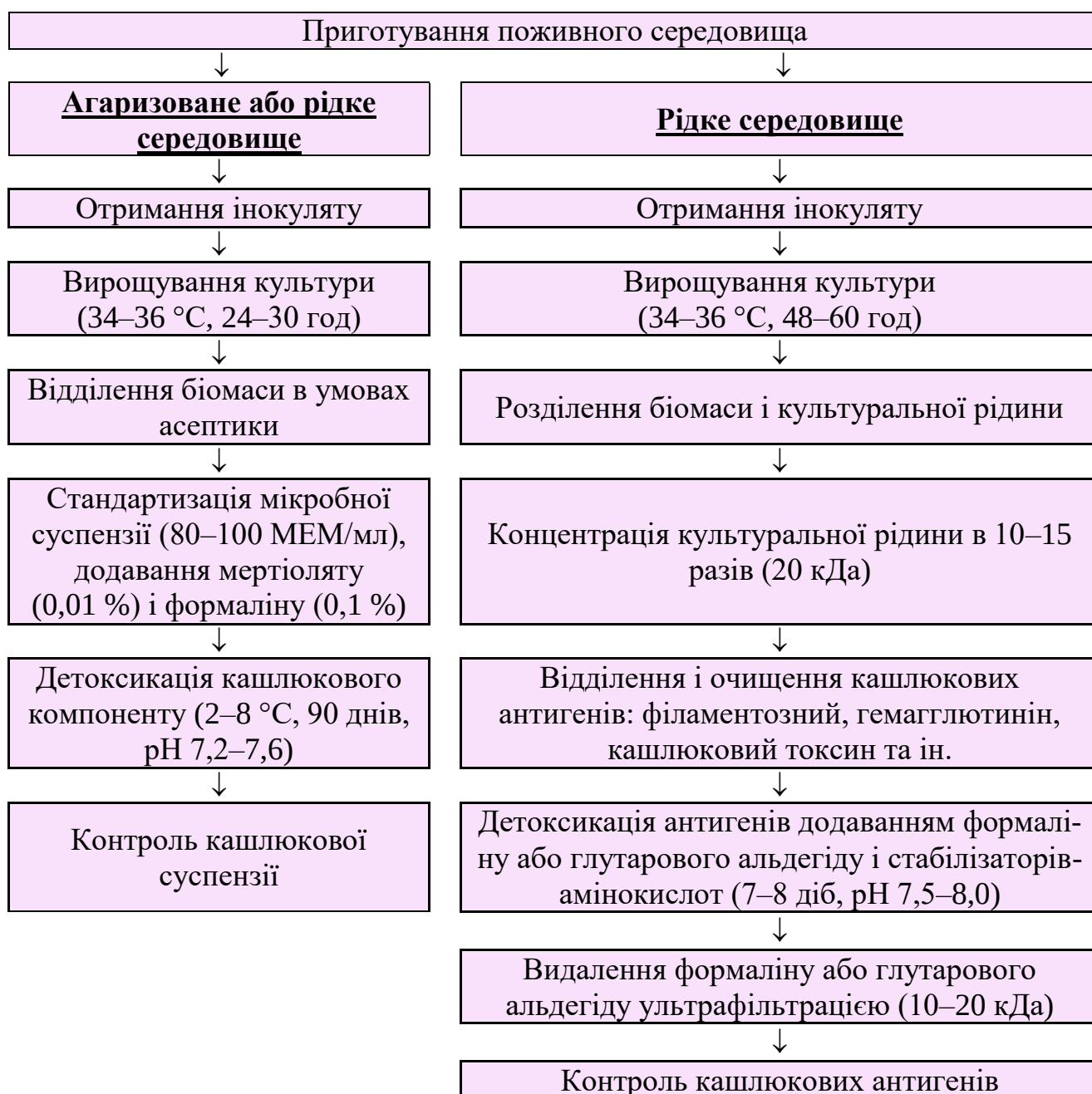


Рисунок 4.5 – Схема отримання кашлюкового компонента

➤ детоксикацію очищених антигенів проводять шляхом обробки формаліном (кінцева концентрація формальдегіду 0,25 %) у присутності L-лізину (1,5М розчин) та N-ацетилтриптофану при 37–40 °С протягом 7–14 днів для ФГА та 14–18 днів для кашлюкового токсину при рН 7,5–8,0. На цьому етапі (після завершення детоксикації) рядом виробників проводиться ультразвукова обробка та видалення вільного формаліну діалізом або ультрафільтрацією. Як стабілізатор використовують глюкозу, а як консервант – мертіюлят. Можливе проведення детоксикації кашлюкового токсину в цих умовах глутаровим альдегідом. Проведення обробки формаліном або глутаровим альдегідом у присутності амінокислот скорочує тривалість процесу детоксикації та стабілізує продукт, запобігаючи можливості реверсії анатоксину в токсин. У ряді випадків детоксикацію альдегідами проводять протягом 35–42 днів за вказаних умов.

➤ контроль виділених антигенів включає такі показники: електрофорез на натрій-додецил-сульфат-поліакриламідному гелі (SDS-PAGE), радіальна імунодифузія, ВЕРХ, вміст детоксикатора (формальдегіду, глутарового альдегіду та ін.), консерванта (наприклад, мертіюляту), визначення рівня ендотоксинів LAL-тестом, визначення реверсії токсичності після зберігання проби антигенів при 37 °С протягом 4 тижнів, визначення токсичності з використанням гістамінчутливого тесту для оцінки гістамінсенсibilізуючої активності, імуноблотинг, ELISA, оцінка лейкоцитозстимулюючої активності, білкового азоту та імуногенності.

Цільноклітинні кашлюкові вакцини використовуються понад 60 років, а ацелюлярні вакцини близько 35 років. З розвитком біотехнології робляться спроби створення **рекомбінантних кашлюкових вакцин**.

Вакцини, які ми розглядали раніше, містять анатоксини, отримані з токсинів, оброблених формаліном. Хімічна процедура отримання анатоксинів має певні недоліки, а саме: зміна захисних епітопів, що веде до зниження імуногенності, та потенційне повернення до біологічно активного токсину. Сьогодні отримано генетично інактивовані токсини збудників правця, дифтерії, кашлюку, сибірки, синегнійної інфекції.

Технологія отримання інактивованих токсинів зводиться до наступного:

- ✓ делеція ділянки гена, що кодує детоксичність;
- ✓ клонування модифікованого гена;
- ✓ введення його у систему експресії;

- ✓ одержання імунного білка, позбавленого токсичності.

Для отримання інактивованих токсинів створювалася мутація кодонів амінокислот, необхідних для біологічної активності токсину (аденозиндифосфат (АДФ) рибозилтрансфераза). Змінений ген замінив собою нативний ген у батьківському організмі, на основі якого потім було отримано імуногенний, але стабільно інактивований токсин. Подальше клонування та секвенування одного з таких мутантних генів токсину виявило мутацію однієї амінокислоти у ферментативно активному сайті (також АДФ-рибозилтрансферази).

Генетично інактивований дифтерійний токсин, відомий під назвою CRM-197, отримано ще наприкінці XX століття. Продукт відрізняється від нативного токсину заміною C52 гліцину глютаміною кислотою. Для повної його детоксикації використовували 1 % формальдегіду від кількості, необхідної для інактивації нативного токсину. Отриманий генетично інактивований дифтерійний токсин CRM-197 рекомендований для використання у Ніб-вакцині. В даний час АКДП-вакцина з генетично інактованим кашлюковим токсином використовується в Італії. *Основною перевагою рекомбінантних токсинів є те, що вони позбавлені потенційної небезпеки реверсії.*

Певна річ, що повторна поява кашлюку в місцях з широким охопленням вакцинацією вимагає покращення методів імунізації та створення високоефективних вакцин проти кашлюку. Запропоновано *живу атенуювану вакцину-кандидат на основі B. pertussis для інтраназальної вакцинації*, яка особливо цікава як носій антигенів збудників респіраторних захворювань. Дослідження проведено на моделях мишей BALB/c та C57Bl/6, які були заражені пневмококовою інфекцією *St. pneumoniae*. Одноразове введення вакцини BPZE1 (10^6 КУО) не захищало тварин, проте дворазове введення вакцини з інтервалом у 3 тижні захищало тварин від летальності, колонізації легень та дисемінації.

В даний час висококонтагіозний і потенційно небезпечний для життя дітей кашлюк, що викликається бактерією *B. pertussis*, продовжує поширюватися по всьому світу. Як показано вище, сьогодні у світі користуються переважно ацелюлярною кашлюковою вакциною. Ця вакцина має обмежений термін придатності і не може запобігти бактеріальній інфекції, яка призводить до її передачі між людьми. Нова вакцина BPZE1, яка потенційно здатна запобігати бактеріальній колонізації дихальних шляхів, є

особливою цінністю, коли йдеться про розрив епідемічних ланцюжків передачі хвороби. Введення ацелюлярної кашлюкової вакцини забезпечує захист від кашлюку, проте з часом захист знижується і є необхідність у введенні бустерних доз. Крім того, це допомагає запобігти появі симптомів кашлюку, але не запобігає зараженню самою бактерією або її передачі іншим. Тому епідемії кашлюку зберігаються у всьому світі, незважаючи на високі показники вакцинації. Розробка нової вакцини від кашлюку під назвою BPZE1 спрямована на те, щоб компенсувати недоліки безклітинної вакцини та полегшити боротьбу з цими епідеміями.

Вакцину BPZE1 розроблено в Інституті Пастера де Лілль, вона являє собою атенуйоване похідне *B. pertussis* Toham I, в якому містяться три основні токсини: кашлюковий токсин, дермoneкротичний токсин і трахеальний цитотоксин, які були генетично інактивовані або видалені. Імунопротеомне профілювання показало, що BPZE1 індукує більш широку та різноманітну специфічність антитіл до антигенів *B. pertussis* порівняно з ацелюлярною кашлюковою вакциною. BPZE1 ефективно індукує опсонізуючі антитіла, які стимулюють вироблення відповіді в нейтрофілах та посилює бактерицидну функцію антитіл проти аденілатциклазного токсину, що відсутня при використанні інших протикашлюкових вакцин. Існуючі вакцини кашлюку захищають від хвороби, але не захищають від колонізації і передачі *B. pertussis*, тоді як природна інфекція захищає від обох процесів. Особливістю цієї живої атенуйованої вакцини є те, що її вводять інтраназально, тим самим імітуючи природні шляхи передачі та колонізації *B. pertussis* на слизових оболонках дихальних шляхів.

Оцінка ефективності та безпечності (нетоксичності) BPZE1 у клінічному випробуванні 2 фази за участю 300 здорових дорослих учасників була проведена у США. Учасники дослідження були розділені на дві групи: 1 – отримала одну назальну дозу BPZE1 і одну внутрішньом'язову дозу плацебо, 2 – отримала одну ін'єкцію внутрішньом'язової ацелюлярної кашлюкової вакцини і одну назальну дозу плацебо. Через три місяці половина учасників з кожної з двох груп отримала одну дозу BPZE1 (для імітації ослабленої природної інфекції), а інша половина отримала інтраназально плацебо.

У 2019 році проведено подвійне сліпе дослідження 2В фази у 3 дослідницьких центрах США на здорових дорослих у віці 18–50 років. Дослідження провели на 458 учасників із 17 червня до 3 жовтня 2019 року.

Біотехнологія отримання вакцини BPZE1 проводиться за наступною технологічною схемою:

1. Отриманий вакцинний штам BPZE1 вирощували на синтетичному середовищі Thijs (похідне поживного середовища *Stainer&Scholte*) при 35 °C протягом 24 год при струшуванні.

2. В отриману біомасу додавали 20 % (об/об) гліцерину у вигляді 86 %-вого розчину і розливали по 1,5 мл у кріопробірки та заморожували при мінус 70 °C.

3. 1.5 мл культури інокулювали в колби Ерленмеєра об'ємом 125 мл, що містять 28,5 мл середовища Thijs (середовище оптимізовано за хімічним складом для експресії генів вірулентності). Вирощування проводили при 35 °C протягом 24 год при струшуванні.

4. 28 мл культури інокулювали в колби Ерленмеєра об'ємом 2,0 л, що містять 0,5 л середовища Thijs. Вирощування проводили при 35 °C протягом 24 год при струшуванні.

5. У біореактор об'ємом 50 л із вмістом середовища Thijs 20 л вносили інокулят і проводили культивування при температурі 35 °C протягом 48 год до оптичної щільності 1,1–1,4 при 600 нм. Вміст розчиненого кисню підтримували на рівні близько 20 % шляхом барботування стерильним повітрям. рН підтримували на рівні 7,5 коригуванням молочною кислотою.

6. Концентрування культури проводили шляхом тангенціальної діалізації через порожнисті волокна з розміром пор мембрани 750 кДа.

7. Як кріопротектор до концентрованої суспензії додавали сахарозу або трегалозу (може бути присутнім глюомат натрію, гідроксиетилкрахмаль).

8. Розлив продукту у флакони (по 1 мл), заморожування, ліофілізація та герметизація. Перед використанням продукт відновлювали стерильною водою для ін'єкцій (по 0,4 мл у кожную ніздрю).

9. Контроль готового препарату, включаючи стерильність, генетичну стабільність, кількість живих бактерій, імуногенність, ендотоксини та ін.

Проведено порівняння ефективності двох вакцин: BPZE1 і вакцини, що містить дифтерію, правець, безклітинний кашлюковий компонент. При назальному введенні BPZE1 виявлено появу секреторних імуноглобулінів А, які не виявлялись при внутрішньом'язовій ін'єкції класичної вакцини. Обидві вакцини добре переносилися і не мали побічних дій. Сероконвер-

сія для внутрішньом'язової вакцини становила 90–93 %, для інтраназальної – 95 %.

Таким чином, сьогодні жива атенуйована вакцина на основі *B. pertussis* є рекомендованим кандидатом для профілактики кашлюку, яка має пройти 3 фазу клінічних випробувань.

4.1.4. Отримання адсорбованої кашлюково-дифтерійно-правцевої вакцини (АКДП)

У попередніх розділах було детально розглянуто вимоги до всіх компонентів, що входять до складу вакцини АКДП. Тепер, маючи очищені концентровані анатоксини, кашлюкову суспензію або ацелюлярний кашлюковий антиген, які пройшли контроль, та гель гідроксиду алюмінію, ми можемо перейти до конструювання готової вакцини АКДП. Необхідну кількість кожного компонента для серії вакцини АКДП розраховують, виходячи з кількості міжнародних одиниць каламутності для кашлюкової суспензії, антигенних одиниць в анатоксинах та ацелюлярному компоненті та кількості Al_2O_3 мг в суспензії адсорбенту. При додаванні мертіюляту як консерванту до складу вакцини необхідно враховувати його вміст у кашлюковому компоненті. У табл. 4.2 наведено контрольні показники для всіх компонентів вакцини АКДП.

Таблиця 4.2 – Контрольні показники компонентів вакцини АКДП

Контрольний показник	Компоненти вакцини АКДП					
	Правц. анатоксин	Дифтер. анатоксин	Кашлюк. компонент	$Al(OH)_3$	0,9 % NaCl	1 % Мертіюлят
Стерильність	Стерильний	Стерильний	Стерильний	Стерильний	Стерильний	Стерильний
Токсичність	Нешкідливий	Нешкідливий	Нешкідливий	Нешкідливий	Нешкідливий	Нешкідливий
Вміст формаліну	<0,01 %	<0,01 %	<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
Кількісне визначення	>1000Lf/мг білкового азоту	>1500Lf/мг білкового азоту	Імуногенний	3–4 мг/мл	0,87–0,93 %	0,99–1,01 %
Пірогенність	Апірогенний	Апірогенний	Апірогенний	Апірогенний	Апірогенний	Апірогенний
Реверсія токсичності	Відсутня	Відсутня	–	–	–	–

Виготовлення АКДП вакцини проводять у реакторі, робочий об'єм якого зазвичай не перевищує 0,65–0,7 від загального об'єму. Слід контролювати роботу окремих вузлів реактора та такі параметри: температура стерилізації, рН, швидкість обертання мішалки та ін. Реактор повинен бути обладнаний пробовідбірниками та пристроєм, що забезпечує можливість асептичного додавання компонентів, патрубками і датчиками. Необхідно забезпечити можливість автоматичного контролю та регулювання основних параметрів конструювання вакцини.

На ефективність сорбції анатоксинів на гелі гідроксиду алюмінію впливає ряд факторів: концентрація та ступінь очищення анатоксину, іонна сила, рН та температура проведення процесу, концентрація сорбенту та його дисперсність. Кожен виробник сорбованих вакцин самостійно встановлює параметри процесу сорбції, виходячи з фізико-хімічних характеристик антигена та ад'юванту.

Адсорбент (гель гідроксиду алюмінію) вносять у реактор і перемішують. Потім у реактор додають розраховану кількість анатоксинів, встановлюють рН в межах 6,3–7,3 і залишають в реакторі при температурі 15–20 °С на 20–24 год при періодичному перемішуванні, після чого відбирають пробу і проводять контроль вакцини на повноту сорбції анатоксинів. При повній сорбції в реактор додають кашлюковий компонент вакцини і перемішують. Потім у реактор в умовах асептики додають стерильний 1 %-вий розчин мертіоляту і 0,9 %-вий розчин натрію хлориду ізотонічного до розрахункового об'єму. Суміш перемішують протягом 30–40 хв. Визначають та встановлюють величину рН у межах 6,3–7,3 за допомогою 1Н хлоридної кислоти. За наявності достатньої кількості реакторів препарат залишають при 2–8 °С на період контролю. При необхідності препарат із реактора переносять у стерильні ємності об'ємом 20–40 л і зберігають при температурі 2–8 °С на період контролю.

Безперечний інтерес викликає можливість виготовлення та зберігання вакцини (на період контролю) в одноразовому обладнанні, наприклад *BIOSTAT® CultiBag RM* фірми *Sartorius STEDIM Biotech*. Обладнання являє собою валідовані пластикові контейнери одноразового використання, у яких здійснюється об'єднання компонентів вакцин, їх перемішування, відбору зразків на контроль та зберігання при температурі 2–8 °С. Наявність перистальтичного насоса, спеціальних з'єднань та фільтрів дозволяють проводити роботи з біотехнологічними продуктами в асептичних

умовах. Швидкість перемішування може досягати 780 л/год. Так, наприклад, контейнери Flexboy® об'ємом 20 та 50 л дозволяють провести повне перемішування їхнього вмісту протягом 3–5 хв в асептичних умовах. Вивчення нейтральності матеріалів, що безпосередньо контактують з рідиною в контейнері, підтвердило їх інертність для біотехнологічних продуктів та можливість тривалого зберігання препаратів у цих умовах без зміни їхніх характеристик. Контейнери є апірогенними, їх виготовлення проводиться в умовах, що відповідають вимогам GMP. Використання такої системи дозволяє проводити стерилізуючу фільтрацію, наприклад, анатоксинів, і приймати стерильний продукт безпосередньо в контейнер з наступним відбором зразків і зберіганням продукту. Враховуючи, що місткість таких контейнерів варіює від 2 до 1000 л, у них можна проводити різні біотехнологічні процеси: культивування бактерій та вірусів, змішування компонентів вакцин, зберігання препаратів протягом усього періоду контролю та розлив із них продукції у первинну упаковку.

Контроль вакцини АКДП – це наступний етап виготовлення. Отриманий препарат контролюють відповідно до рекомендацій ВООЗ за такими тестами:

1. *Опис* – суспензія жовтуватого-білого кольору, яка при стоянні розшаровується на прозору надосадну рідину та аморфний осад, що повністю розбивається при струшуванні.

2. *Стерильність* – проводять тест на бактеріальну та грибкову стерильність відповідно до вимог ДФУ.

3. *Токсичність*:

3.1. Проводять на 5 морських свинках масою 250–350 г: кожній свинці підшкірно вводять 3 мл вакцини (6 доз щеплення), проводять спостереження тварин протягом 30 днів. Препарат вважають нешкідливим, якщо під час спостереження всі свинки залишаються живими без прояву дифтерійної та правцевої інтоксикації, місцева реакція допускається лише у вигляді невеликого інфільтрату у місці введення вакцини (1–2 см). При виявленні некрозів та абсцесів препарат не підлягає випуску.

3.2. Проводять на групі з 10 мишей масою 14–16 г (групову масу мишей визначають безпосередньо перед введенням вакцини): кожній миші вводять внутрішньочеревно вакцину в об'ємі 0,5 мл (1 доза), контрольній групі мишей вводять внутрішньочеревно 0,5 мл 0,9 %-вого ізотонічного розчину натрію хлориду для ін'єкцій. За тваринами спостерігають 7 діб.

Вакцина вважається нешкідливою, якщо: 1) через 72 год групова маса тіла піддослідних тварин не нижче за масу їх тіла перед введенням препарату; 2) через 7 діб відносний приріст маси тіла мишей, які отримали вакцину, становить не менше 60 % приросту маси тіла контрольних тварин.

4. *Імуногенність всіх трьох компонентів.* Вакцина АКДП повинна мати імуногенну активність і містити в 1 мл препарату не менше 8 міжнародних захисних одиниць (МЗО) кашлюкового компонента, не менше 60 міжнародних імунізуючих одиниць (МІО) дифтерійного анатоксину і не менше 120 МІО правцевого анатоксину.

4.1. *Визначення імуногенності кашлюкового компонента:* вакциною АКДП імунізують три групи мишей масою близько 12 г (по 18–20 тварин у кожній групі) різними дозами препарату. Одночасно аналогічні групи тварин імунізують стандартною вакциною. Через 14 діб тваринам обох груп вводять внутрішньочеребрально не менше 100 LD₅₀ живої культури тест-штаму кашлюку. За твариною спостерігають протягом 14 діб, щоденно реєструючи виживання тварин. Розрахунок кількості МЗО у досліджуваному препараті проводять за методом Вільсона та Вустера з використанням таблиць Національного інституту здоров'я США.

4.2. *Визначення імуногенності дифтерійного компонента:* вакциною АКДП імунізують 3 групи морських свинок масою 300±50 г по 10 тварин у групі різними дозами препарату. Одночасно аналогічні групи тварин імунізують різними дозами стандартного зразка дифтерійного адсорбованого анатоксину. Через 30 діб тваринам вводять по 100±50 LD₅₀ дифтерійного тест-токсину. За тваринами спостерігають протягом 7 діб, щодня реєструючи кількість тварин, що вижили. Розрахунок кількості МІО у дозі препарату проводять за методикою, затвердженою національним органом контролю.

4.3. *Визначення імуногенності правцевого компонента:* вакциною АКДП у різних дозах імунізують 5 груп білих мишей масою близько 17 г по 16–20 тварин у групі. Одночасно аналогічні групи білих мишей імунізують різними дозами стандартного зразка адсорбованого правцевого анатоксину. Через 28 діб тваринам вводять по 100±50 LD₅₀ правцевого тест-токсину. За тваринами спостерігають 6 діб, щодня реєструючи кількість тварин, що вижили. Розрахунок кількості МІО у дозі проводять за методикою, затвердженою національним органом контролю.

На теперішній час ряд виробників вакцини АКДП (англ. – *DPT-vaccine*) використовують й інші *методи контролю протективних властивостей вакцин*:

✓ реакція нейтралізації дифтерійного/правцевого токсину відомої активності протидифтерійними/протиправцевими антитілами: морських свинок імунізують вакциною і через 28 днів одержують сироватку, яку використовують для реакції нейтралізації дифтерійного/правцевого токсину. Отриману суміш вводять морськими свинками. За їх виживанням та реакціями на введення оцінюють протективні властивості антигенів вакцин;

✓ визначення протидифтерійних/протиправцевих антитіл методом ІФА: морських свинок імунізують вакциною, через 28 днів одержують сироватку, в якій визначають вміст специфічних протидифтерійних/протиправцевих антитіл.

5. *Визначення повноти сорбції*: в 1 мл надосадової рідини вакцини АКДП може бути не більше 1 Lf дифтерійного анатоксину (визначають реакцією флокуляції зі стандартною протидифтерійною сироваткою) і не більше 0,1 Lf правцевого анатоксину (визначають реакцією зв'язування анатоксину зі стандартною протиправцевою сироваткою).

6. *pH* – визначення проводять потенціометрично. Величина pH має бути від 6,0 до 7,0.

7. *Кількість залишкового вільного інактивуючого агента (формальдегіду)* визначають, наприклад, колориметричним методом при взаємодії формальдегіду з сумішшю фуксину та сірчаної кислоти. Вміст формальдегіду у вакцині, розведеній до концентрації готового препарату, має бути не більше 0,01 %.

8. *Визначення вмісту оксиду алюмінію*: 1 мл препарату може містити не більше 1,25 мг алюмінію. Визначення проводять, наприклад, методом атомної адсорбції.

9. *Визначення вмісту мертіоляту*: вміст мертіоляту у препараті має складати не менше 80 % і не більше 120 % від зазначеного у складі.

Протягом періоду контролю вакцини у формі *in bulk* препарат зберігається при температурі 2–8 °С. На рис. 4.6, показана схема отримання комбінованої вакцини АКДП згідно з табл. 4.2.

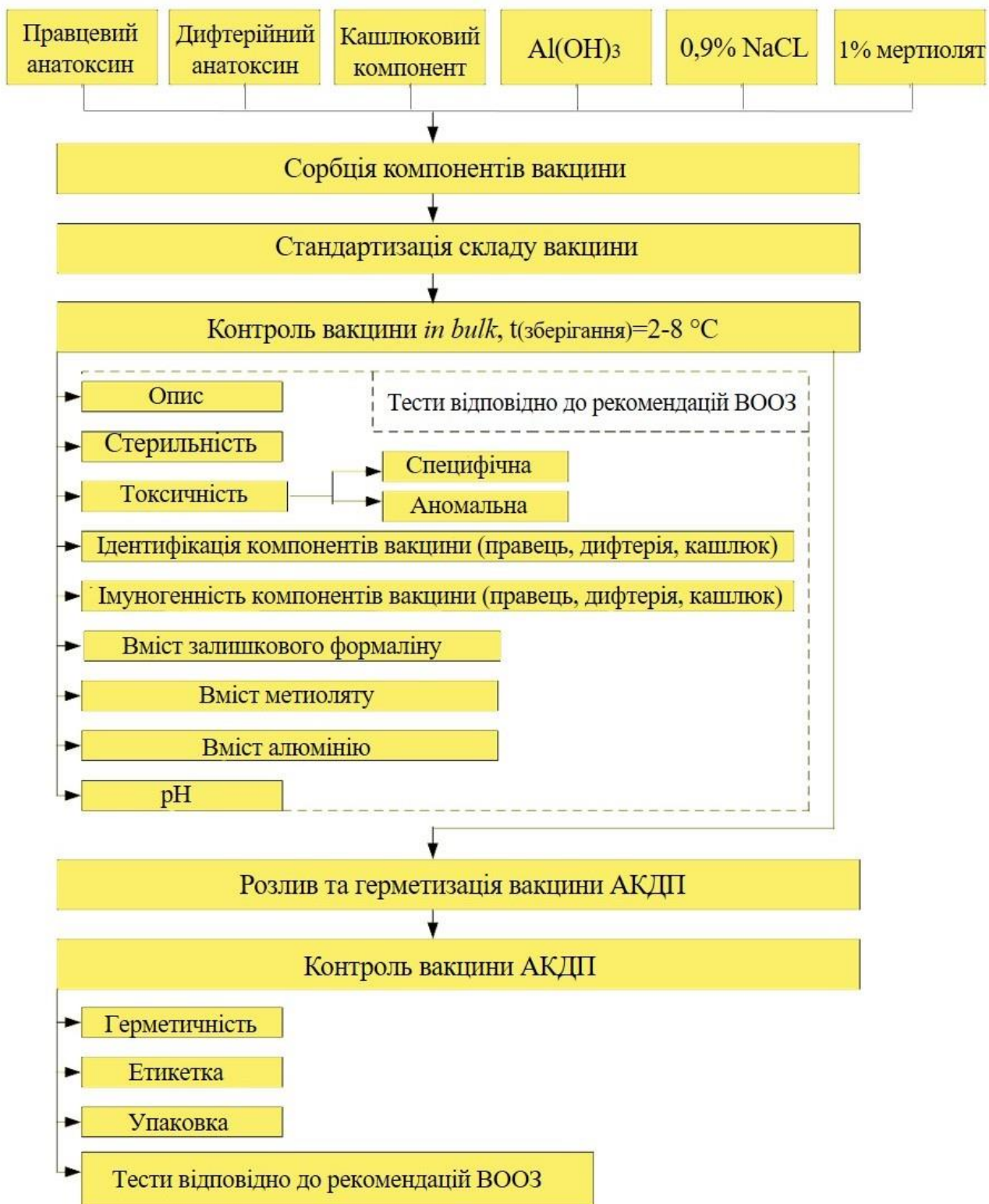


Рисунок 4.6 – Схема отримання комбінованої вакцини АКДП

Розлив та герметизація вакцини АКДП. Після проведення контролю та підтвердження відповідності встановленим нормам препарат розливають у первинну упаковку (флакони та ампули). Вимоги до первинної

упаковки для розливу та зберігання вакцин викладено у Державній Фармакопеї України та Європейській Фармакопеї.

Для розливу та герметизації сорбованих вакцин необхідна технологічна лінія, що складається з синхронно працюючого обладнання, об'єднаного в єдину технологічну лінію: мийні машини для обробки первинної упаковки (ампули та флакони), стерилізаційні та сушильні тунелі, апарати для наповнення та герметизації ампул (флаконів), апарат для миття та стерилізації гумових пробок, апарати контролю на герметичність. Зручним в обслуговуванні та ефективним є обладнання концерну STERIS – системи миття та дезінфекції, НАМО – ефективне миття лабораторного посуду, частин технологічного обладнання та контейнерів, що використовуються в асептичному виробництві.

Технологія заповнення первинної упаковки зводиться до наступного:

- ✓ візуальний перегляд ампул/флаконів з метою відбракування некондиційної продукції, яка містить сколи, тріщини, сторонні включення у скло;

- ✓ миття ампул/флаконів за схемою: ультразвукова обробка у воді очищеній; шприцювання водою очищеною, продування стерильним повітрям, шприцювання водою для ін'єкцій; продування стерильним повітрям. Повітря, вода очищена та вода для ін'єкцій піддаються фільтрації через стерилізуючі фільтри типу Millipore. Вода використовується із температурою 60–90 °С. Після обробки первинної упаковки обов'язковим є контроль на присутність у ній механічних включень;

- ✓ далі ампули/флакони надходять до стерилізаційного тунелю, що має три технологічні зони: сушіння стерильним повітрям, стерилізація при температурі 300 ± 15 °С, охолодження стерильним повітрям до температури близько 20 °С. Після цієї стадії здійснюють контроль на механічні включення та стерильність первинної упаковки. За рахунок спрямованого потоку гарячого повітря відбувається не тільки стерилізація, а й депірогенізація ампул та флаконів;

- ✓ наповнення та герметизація первинного пакування шляхом запаювання ампул у газокисневому середовищі або герметизація флаконів пробками, з наступним насаджуванням алюмінієвих ковпачків. При наповненні флаконів та ампул передбачено програму, що дозволяє герметизувати первинну упаковку в стерильному повітрі, атмосфері азоту або інертних газів.

Усі вузли апарату для наповнення піддаються парової чи сухо-повітряній стерилізації. Процес відбувається у автоматичному режимі з повним документуванням зазначених етапів. Враховуючи той факт, що даний етап виробництва вакцин є завершальним, весь процес проходить у відповідних класах чистоти D, C, B, а безпосередньо наповнення, герметизація та підготовка систем з'єднання препарату з розливним апаратом відбувається у класі чистоти A.

У зв'язку із суспензійною структурою вакцин їх розлив здійснюється при постійному перемішуванні препарату. Апарати наповнення забезпечені системою регулювання об'єму при заповненні первинної упаковки. Обов'язковим є постійний контроль дози розлитого препарату.

Обов'язковою умовою виготовлення та розливу всіх ін'єкційних препаратів, у тому числі і вакцин, є систематичний контроль, що підтверджує клас приміщень згідно норм наявності аерозольних частинок та мікробної контамінації.

Сьогодні промисловість випускає десятки видів обладнання високого класу, що дозволяє проводити необхідні виміри. Наприклад, зручними в роботі та високоефективними є лічильники аерозольних частинок: 2-х каналний ННРС-2 для вимірювання частинок з розмірами 0,3 і 0,5 мкм або 6-ти каналний ННРС-6 для вимірювання частинок 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 2,0; 5 мкм. Для перевірки препарату в первинній упаковці (ампулах або флаконах) використовуються системи, що дозволяють виявляти механічні вclusions в препараті, наприклад, автоматична система контролю нерозчинних механічних включень у фармацевтичних ін'єкційних препаратах KL-04 (RION, Японія), яка діє за принципом поглинання світла і застосовується для контролю ін'єкційних препаратів.

Сьогодні фармацевтична промисловість достатньо забезпечена високоефективними лініями, що відповідають вимогам правил GMP. На світовому ринку цього обладнання повагу заслужила продукція таких фірм як *Cozzoli* (США), *Bosch* (Німеччина), *Strebel* (Німеччина). З'являються апарати-комбайни, програма яких досить гнучко може перевести процес наповнення ампул та герметизацію флаконів.

Ряд зарубіжних виробників спеціалізується на обладнанні одного типу. Наприклад, один із світових лідерів у галузі фармацевтичного обладнання *FINN AQUA* випускає широко відомі багатоступінчасті дистилятори для отримання води для ін'єкцій пароконденсаційним методом, що від-

повідують вимогам низки міжнародних фармакопей. Для контролю води для ін'єкцій відповідно до чинних вимог (ДФУ, EU-Ph) можна використовувати аналізатор загального органічного вуглецю *Aurora 1030W01 Analytical*.

Крім того, потрібно відзначити перспективність використання для розливу біологічних препаратів ізоляторної технології, при якій повністю відсутній контакт препарату, який розливається, із зовнішнім середовищем, включаючи і обслуговуючий персонал. Далі, після наповнення та герметизації проводиться контроль герметичності продукції, етикетування та упаковка.

Після розливу в ампули або флакони препарат контролюють згідно тестів, наведених у сертифікаті якості. Ряд виробників вводять у перелік регламентованих показників та інші тести, наприклад, справжність (ідентифікація), осмолярність (від 291 до 337 мОсм/кг) та вміст ендотоксинів (не більше 25,0 МО/мл). Так, у вакцині АКДП *Infanrix* фірми *GlaxoSmithKline* (Бельгія), яка містить дифтерійний та правцевий анатоксини та ацелюлярний кашлюковий компонент, ідентифікацію проводять після десорбції з гелю гідроокису алюмінію всіх компонентів за допомогою реакції імунопреципітації зі специфічними антисироватками до вказаних анатоксинів і за допомогою методу ELISA для кашлюкового антигена.

Виробництво комбінованих вакцин на основі АКДП є складним і якість вакцини оцінюється як за складом партії, так і за відповідністю історії виробництва. З моменту їх початкового виробництва змінилися як правила виробництва комбінованих вакцин АКДП, так і попит на них. Це призвело до постійної необхідності модифікувати процеси виробництва та контролю якості. В даний час проводяться дослідження не тільки щодо вдосконалення біотехнології отримання вакцин для профілактики дифтерії, правця і кашлюку, але і створення нових лікарських форм проти цих інфекцій. Так, у 2023 році вперше було запропоновано вакцину проти дифтерії та правця на основі добре відомих відповідних анатоксинів, яка не вимагала для збереження стабільності «холодового ланцюга». Запропонована вакцина *StablevaX™*, отримана на основі вакцини *Tetadif (BulBio-NCIPD, Болгарія)*, що містить дифтерійний і правцевий анатоксин, ад'ювант – гелю гідроокису алюмінію, в яку вводили 0,243 М трегалози і 0,1 % полісорбату 80. Цим складом попередньо заповнювали шприц, в якому знаходилася сі-

тчаста поліуретанова піна (губка) медичного призначення. Стабілізація досягалася висушуванням вакцини із буфера, що містить трегалозу, і висушений продукт розподілявся у внутрішніх взаємозв'язаних порожнинах еластичної сітчастої губки. Губка зберігається всередині циліндра шприца, і вакцина розчиняється шляхом додавання води до шприца. Губка міститься у шприці протягом всього процесу наповнення та висушування, а також при транспортуванні, зберіганні та ін'єкції. Вакцина вводиться пацієнту натисканням на поршень, який стискає губку, щоб повністю виштовхнути дозу. Методом прискореного старіння показано стабільність вакцини при зберіганні протягом 7-10 місяців за температури 45 °С. Створення вакцин, які не вимагають при виробництві, транспортуванні та зберіганні «холодового ланцюга», є кроком уперед при створенні перспективних *drug delivery system* для імунобіотехнологічних препаратів.

4.1.5. Вакцини для профілактики мікобактеріальної інфекції

У перші десятиліття ХХ ст. найважливішою спробою створення живих вакцин була розробка вакцини проти туберкульозу. Вона відома як BCG – *бацила Кальметта-Герена* (англ. – *bacillus of Calmette-Guerin*), названа іменами двох французьких учених, які отримали ослаблений штам туберкульозних бактерій. Процес отримання вакцини зайняв 13 років багаторазових серійних пасажів (231 послідовний пересів *in vitro*) штаму *Micobacterium bovis*. BCG фактично була першою живою бактеріальною вакциною, яку в широких масштабах застосували на людях (її повсюдне використання було відстрочено трагічною подією в Німеччині, де партія вакцини виявилася зараженою). Досвід показав, що вакцини, виготовлені з цих ослаблених туберкульозних бацил, абсолютно безпечні, і з 1950 року у Великій Британії та більшості інших країн почалися широкі компанії з імунізації школярів. Сьогодні імунізація вакциною BCG проводиться у новонароджених на 3–7 день життя внутрішньошкірно, ревакцинацію проводять дітям віком 7 та 14 років (див. рис. 4.1). Щороку вакциною BCG прищеплюються близько 100 млн осіб.

Вакцина BCG являє собою ліофілізовані живі мікобактерії вакцинних штамів, висушені в стабілізаторі – глютаміні натрію. В одній дозі 0,05 мг вакцини міститься $1,5\text{--}6,0 \times 10^5$ живих мікробних клітин. Усього зареєстровано 16 субштамів BCG (відомо – понад 30). Субштами розріз-

няються за морфологією клітин і колоній (від довгих паличок до кокоподібних форм), залишкової вірулентності, імуногенності, антигенного складу. Так, отриманий у Японії субштам *Tokuo-172* характеризується дуже дрібними клітинами, низькою залишковою вірулентністю, зниженою імуногенністю та незначною реактогенністю. Такі субштами прийнято називати «слабкими». «Сильні» субштами відрізняються більшою залишковою вірулентністю та високою захисною здатністю, проте ці штами більш реактогенні. Вакцини, виготовлені із «сильних» субштамів, викликають великий відсоток гнійних лімфоденітів при вакцинації.

За попередні роки в Україні було зареєстровано декілька вакцин, вироблених: у Росії, в якій застосований субштам *BCG Russia-1*, що містить 4 антигени, які відсутні у більшості інших субштамів, що займає при високій імуногенності середнє положення по залишковій вірулентності серед інших субштамів, тобто при високих захисних властивостях вакцина має невисоку реактогенність; у Данії, що містить штам *Copenhagen-1331* (виробництва SSI – *Statens Serum Institut*, Копенгаген); у Польщі з використанням бразильського субштаму *Moreau*; в Індії з використанням штаму *Moscow 361-1* (виробництва *Serum Institute of India*); у Болгарії, що містить субштам *BCG Sofia-SL222* (виробництва BB-NCIPD – *Bul Bio-National Center of Infectious and Parasitic Diseases*), який походить від штаму *BCG Russia-1*. Зупинимося докладніше на останньому субштамі.

Субштам *BCG Sofia-SL222* використовується у Болгарії з 1972 року. Рядом авторів вивчений геном штаму, проведено секвенування та збірка повної послідовності. Повний кільцевий геном *BCG Sofia-SL222* мав довжину 4 370 706 п.н. із середнім вмістом GC (характеристика геному – співвідношення гуаніну/цитозину) – 65,6 %. Дослідження показало, що за 49 років використання штам зберіг генетичну стабільність. Було виявлено 4 мутації, які, на думку дослідників, не впливають на основні гени. Порівняння проводили з використанням штаму *BCG-1*. У геномі мікобактерій виявлено 14 діляток відмінностей – RD (англ. – *regions of differences*). Водночас встановлено, що штам *BCG Sofia-SL222* містить ділянку RD2 типову для всіх ранніх штамів *BCG*. Всі штами *BCG* втратили область RD1, що було пов'язано з ослабленням вірулентності штаму. Субкультивування субштамів *BCG* може призводити до накопичення генетичних змін та надмірної атенуації субштамів. У зв'язку з цим ще в 1966 р. ВООЗ рекомендувала, щоб вакцини *BCG* не готували з культур, які пройшли більше,

ніж 12 пасажів, починаючи з конкретної партії ліофілізованих штамів від посівної серії. Дослідниками вивчено довжину геному використовуваних штамів BCG мікобактерій (табл. 4.3) та показано найбільшу близькість штамів *Sofia-SL222* та штаму *Russia-368*, з якого пішов болгарський штам.

Таблиця 4.3 – Характеристика геному різних штамів BCG

Штам BCG, країна виробництва	Довжина геному (п.н.)
<i>Sofia-SL222</i> , Болгарія	4 370 705
<i>Russia-368</i> , Росія	4 370 706
<i>Copenhagen-1331</i> , Данія	4 411 814
<i>Moreau</i> , Польща	4 339 996
<i>Pasteur 1173P2</i> , Франція	4 374 550

Поживні середовища. Для культивування мікобактерій використовують синтетичні живильні середовища, тобто середовища із чітко визначеним хімічним складом. Такі середовища створюються з урахуванням розчинів неорганічних солей, до яких додають необхідні джерела вуглецю, азоту, енергії. Найчастіше використовується середовище, запропоноване французьким мікробіологом Сотоном. До складу поживного середовища входять: L-аспарагін – від 4,0 до 4,54 г/л, лимонна кислота – 2,0 г/л, фосфорнокислий калій двозаміщений – 0,5 г/л, залізо лимоннокисле аміачне – 0,05 г/л, магній сірчаноокислий гептагідрат. Стерилізація середовища здійснюється при 121 °C протягом 30 хв, деякі виробники проводять стерилізуючу фільтрацію через мембрани з розміром пор 0,22 мкм.

Склад середовища значною мірою визначає якість кінцевого продукту – вакцини BCG. Підтвердженням цього є приклад вирощування мікобактерій BCG на середовищах з відмінним складом. Мікобактерії вирощували на двох складах середовищ: синтетичному середовищі Сотона та модифікованому середовищі Сотона з додаванням розчинного крохмалю (1 г/л) та бактеріологічного пептону (16,6 г/л). Вирощені мікобактерії піддавали однаковій обробці та стандартизації до одного вмісту бактерій в 1 мл. Мишей імунізували отриманими вакцинами BCG з розрахунку 100 мкг на мишу. Через однакові терміни тварин досліджували, і хоча розподіл мікобактерій по тканинах був однаковий, гуморальна відповідь була значно вищою при використанні зразків вакцини, вирощених на модифікованому середовищі Сотона.

Культивування мікобактерій та отримання вакцини BCG in bulk.

Вирощування мікобактерій проводять на середовищі Сотона у спеціальних ємностях об'ємом 1–3 л, що дозволяє мікобактеріям рости в стаціонарному положенні на поверхні поживного середовища. Вирощування проводять при температурі 37–38 °С. Посів на рідке середовище роблять плівкою культури BCG, вирощеної на гліцериновому середовищі з картоплі. Плівку обережно поміщають на поверхню рідкого середовища Сотона, щоб вона не опустилася на дно. Посіяна таким чином культура досить швидко розвивається і, зазвичай, до 7–9 днів утворює тонку плівку, яка піднімається по стінках ємності. Після цього проводять ще два аналогічні посіви. Культура мікобактерій являю собою плівку, що знаходиться на поверхні поживного середовища. Вакцина готується з культури не старше 16-денного віку. Після закінчення вирощування плівку переносять в асептичних умовах в ємність, в якій знаходяться стерильні металеві кульки, та промивають буфером від залишків поживного середовища. Останній етап є дуже важливим, оскільки наявність у біомасі бактерій залишків гліцерину знижує якість препарату та ускладнює процес ліофільного висушування. Ємність з плівкою поміщають на шейкер, додають стерильний 2,0 %-вий розчин глютамінату натрію і починають струшування культури мікобактерій до отримання гомогенної суспензії.

Такий спосіб виробництва вакцини BCG має ряд істотних недоліків: тривалість технологічного процесу, складність гомогенізації культури мікобактерій, руйнування бактеріальних клітин мікобактерій, що призводить до їхньої загибелі, а отже і до зниження ефективності препарату. Крім того, технологія вимагає високих трудовитрат і, як наслідок, високої ціни вакцини.

В останні роки для вирощування мікобактерій запропоновано біореактори невеликого обсягу, наприклад, на 20 л. Вирощування інокуляту мікобактерій проводять при $37 \pm 0,5$ °С протягом 13 діб у скляних колбах, поміщених на роторний шейкер при 200 об/хв. Потім вирощену культуру переносять в реактор, що представляє собою циліндричну ємність з боросилікатного скла. Реактор має діаметр 23 см, оснащений пропелерною мішалкою, яка знаходиться на відстані 15 см від дна. У реакторі поміщають 12 л поживного середовища Сотона, на поверхню якого зі швидкістю 15 л/год подається стерильне повітря. Мішалка працює зі швидкістю 840–1200 об/хв. За таких умов ріст мікобактерій триває 164–170 год при тем-

пературі $37 \pm 0,5$ °C. Процес супроводжується контролем процесу культивування: підрахунок колоній на середовищі Левенштейна–Йенсена; визначення вмісту кисню у середовищі; вміст азотистих сполук та гліцерину; мікроскопія культури за Цилем–Нільсеном. Отримані результати демонструють значно більший вихід живих бактерій порівняно із стаціонарним культивуванням. Вирощування в реакторі дозволяє зменшити вміст L-аспаргіну на 50 % та вміст гліцерину на 26 % у середовищі Сотона. Виявлено також гальмуючу дію Твіну-80 на ріст культури бактерій.



Рисунок 4.7 – Ферментер-біореактор *Biostat® Cplus*

Для ліофілізації було запропоновано велику кількість захисних середовищ, які мали забезпечувати життєздатність мікобактерій при сублімації, виконуючи роль кріопротекторів. У різні роки фахівцями пропонувалися желатин і сахароза, лактоза, декстран і глюкоза тощо. Проте сьогодні найефективнішим визнано глютамінат натрію в кінцевій концентрації 1,0–1,5 %. Для суспендування конгломератів мікобактерій використовують або механічне диспергування (при температурі 4–10 °C) або застосування детергентів. Отриману та відмиту від поживного середовища бактеріальну

масу суспендують у 1,0–1,5 % розчині глютаміату натрію та розливають шприцевим методом у ампули по 10 доз (0,5 мг вакцини) або 20 доз (1,0 мг вакцини). Розлив вакцини повинен проводитись при постійному перемішуванні для отримання гомогенної суспензії. У 1 мг вакцини може бути від 10 до 30 млн життєздатних бактерій. Ампули/флакони заморожують при температурі мінус 60–70 °С з наступною сублімацією. Час та режим висушування встановлюють залежно від марок сублімаційного обладнання, товщини шару біомаси та інших факторів. Отриманий після ліофілізації препарат герметизують або у вакуумі, або в атмосфері інертного газу. Вакцину BCG зберігають при 2–8 °С. Порівняння протективних властивостей препаратів, отриманих у стаціонарних умовах та біореакторах, показало їх повну ідентичність. На рис. 4.8 представлена схема одержання вакцини BCG.



Рисунок 4.8 – Схема отримання вакцини BCG

Контроль готового препарату. Кожен виробник BCG-вакцини під час контролю препарату керується рекомендаціями ВООЗ. Водночас, існують відмінності як в обсязі контролю, так і в використовуваних методах. Для підтвердження цього, у табл. 4.4 наводяться вимоги до вакцини двох виробників, зареєстрованих в Україні: Національний центр інфекційних та паразитичних хвороб, Болгарія (1); Науково-дослідний інститут епідеміології та мікробіології ім. Н.Ф. Гамалії РАМН, РФ (2).

Таблиця 4.4 – Вимоги до вакцин BCG

Параметр контролю	Виробник 1	Виробник 2
Опис	Пориста порошкоподібна маса жовто-білого кольору	Пориста порошкоподібна маса від білого до світло-рожевого кольору
Справжність	При мікроскопії мазків, забарвлених по Цілю-Нільсену, вакцина повинна складатися з тонких прямих або злегка вигнутих паличок довжиною 1–4 мкм і шириною 0,3–0,5 мкм, які часто мають невеликі здуття на кінцях, не утворюють спор та капсул, кислотостійкі, грампозитивні. При посіві вакцини на середовище Левенштейна-Йенсена через 28–30 діб на поверхні повинні утворюватися характерного виду колонії кремового кольору зі зморшкуватою поверхнею, тонкими нерівними краями розміром від 0,5 до 8,0 мм у діаметрі	При мікроскопії мазків, забарвлених по Цілю-Нільсену, вакцина повинна складатися з тонких прямих або злегка вигнутих паличок довжиною 1–4 мкм і шириною 0,3–0,5 мкм, які часто мають здуття на кінцях. При посіві вакцини на середовище Левенштейна-Йенсена через 28–30 діб на поверхні повинні утворюватися характерного виду колонії кремового кольору зі зморшкуватою поверхнею, тонкими нерівними краями розміром від 0,5 до 8,0 мм у діаметрі
Стерильність	Стерильно	Стерильно
Аномальна токсичність	Нетоксичний при введенні мишам 0,25 мг препарату (5 людських доз) в 0,5 мл – підшкірно	Нетоксичний при введенні мишам 0,25 мг препарату (5 людських доз) в 0,5 мл – підшкірно

Закінчення табл. 4.4

Параметр контролю	Виробник 1	Виробник 2
Прозорість	При додаванні в ампулу з вакциною 2 мл розчинника та 2–3-разовому струшуванні препарат повинен мати вигляд каламутної суспензії жовтуватого кольору	При додаванні в ампулу з вакциною 2 мл розчинника та 2–3-разовому струшуванні препарат повинен повністю розчинятися протягом 1 хв і мати вигляд каламутної суспензії жовтуватого кольору
Однорідність	Індекс дисперсності не менше 0,85	Індекс дисперсності не менше 1,5
Пірогенність	Апірогенний	—
pH	5,0–7,0	—
Загальний вміст бактерій	Не менше $0,4 \pm 0,05$ при 490 нм	0,32–0,38 при 490 нм
Специфічна активність	1,5–6,5 млн життєздатних бактерій у $1,0 \pm 0,01$ мг вакцини	10–30 млн життєздатних бактерій у 1 мг вакцини
Термостабільність	Стабільність не менше 20 %	Стабільність не менше 25 %
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 2,0 %	Не більше 2,0 %
Специфічна нешкідливість	Препарат має бути нешкідливим	Препарат має бути нешкідливим

Для об'єктивної оцінки якості вакцини BCG доцільно навести **специфічні методи контролю препарату**, які використовуються лише для контролю цієї вакцини:

1. *Специфічна нешкідливість:*

1.1. *Відсутність вірулентних мікобактерій:* контроль проводять на двох морських свинках однієї статі масою 250–300 г. Кожній тварині вводять 5 мг вакцини в 1 мл розчинника підшкірно у внутрішню поверхню правого стегна. Спостереження за тваринами проводять протягом щонайменше 12 тижнів. Тварини повинні залишатися здоровими, а маса їхнього тіла повинна збільшуватися. Після закінчення терміну спостереження тварин присипляють ефірним наркозом. При проведенні аутопсії у лімфовуз-

лах та внутрішніх органах тварин не повинно бути макроскопічних ознак прогресуючої туберкульозної інфекції. Тварин, які загинули до кінця терміну спостереження, також досліджують, контроль повторюють. Якщо у тварин виявляють ознаки прогресуючої туберкульозної інфекції, серію бракують, випуск наступних серій припиняють, а запаси вакцин зберігають до виявлення причин появи вірулентності.

1.2. *Шкірна реактогенність*: поствакцинальну місцеву реакцію перевіряють на чотирьох морських свинках однієї статі, масою 250–300 г. У заздалегідь депільовану бічну поверхню тіла тварин вводять внутрішньошкірно три розведення вакцини, що містять 0,1; 0,01 та 0,001 мг BCG у 0,1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду для ін'єкцій, а в іншу – такі ж розведення національного або робочого референс-препарату вакцини BCG, яка атестована державним органом контролю. Розміри місцевих реакцій на щеплення реєструють щотижня протягом 4-х тижнів. Вимірюють середні розміри реакції на кожен препарат. Відмінності між середніми реакціями на аналогічні дози серії та референс-препарату не повинні перевищувати 1 мм ($p > 0,95$).

2. *Термостабільність*: зразок вакцини витримують у термостаті при $37 \pm 0,5$ °C протягом 28 днів. Кількість живих мікробних клітин після термостатування має бути не меншою, ніж 20 % від кількості живих мікробних клітин в еталонному препараті – в зразку, що зберігався при температурі 2–8 °C.

3. *Специфічна активність* – кількість життєздатних бактерій. Визначення проводять шляхом розведення препарату у співвідношеннях 1 : 40000, 1 : 80000, 1 : 160000. Зазначені розведення висівають на скошене поживне середовище Левенштейна-Йенсена по 0,1 мл і культивують при температурі 38 ± 1 °C протягом 4-х тижнів. Потім здійснюють підрахунок живих мікобактерій за відомими формулами.

Доцільність використання вакцини BCG. Використання вакцини BCG є найефективнішим у ранньому дитячому віці, оскільки знижує ризик важкої форми туберкульозу у дітей. Застосування вакцини у підлітків та дорослого населення з метою запобігання легеневого туберкульозу є малоефективним, оскільки не створює довгострокового імунітету. Щороку від туберкульозу у світі гине до 2 млн людей. Ефективність класичної вакцини BCG постійно обговорюється фахівцями, тому що лише у 5 % смертельних випадків вдається уникнути за допомогою вакцинації. Це зму-

шує фахівців вести дослідження щодо створення високоефективних вакцин для профілактики туберкульозу. Дослідження проводяться за кількома напрямками. Провідні виробники вакцин фірма *Sanofi Aventis* (Франція) та Державний інститут вакцин у Данії об'єдналися в 2008 році для створення вакцини, в якій антигени будуть представлені рекомбінантними білковими субодиницями бактерій BCG. Нещодавні наукові відкриття, такі як повне картування генетичної послідовності кількох видів мікобактерій, включаючи лабораторні штами, збільшують імовірність створення нових ефективних протитуберкульозних вакцин. Сьогодні у світових дослідницьких лабораторіях розробляється близько 200 вакцин типу BCG, що знаходяться на різних стадіях лабораторних випробувань, серед них: цілісноклітинні (атенуйовані та векторні), субодиничні, пептидні, ДНК-вакцини.

Атенуйовані вакцини отримують переважно зі штамів *M. tuberculosis*, які в результаті мутації стають більш безпечними та імуногенними порівняно зі штамами мікобактерій і навіть вакциною BCG.

Рекомбінантні вакцини BCG ґрунтуються на зміні певних ділянок геному бактерій. Наприклад, одна з вакцин є живим рекомбінантним штамом BCG, що утворює велику кількість білка з молекулярною масою 30 кДа, проходить клінічні випробування. У Німеччині дослідниками Інституту інфекційної біології ім. М. Планка створено нову рекомбінантну вакцину з використанням генно-інженерної технології. Ними отримано генно-інженерний штам BCG, здатний виробляти білок лістеріолізін, що виділяється лістеріями (*Listeria monocytogenes*). Лістеріолізін сприяє утворенню отворів у фагосомальній мембрані та проникає у фагосому, де знаходиться *M. tuberculosis*. Крім того, з BCG був видалений ген уреазі, який в нормі нейтралізує кислотність фагосоми, тим самим для лістеріолізину були створені оптимальні умови навколишнього середовища.

З метою вивчення факторів вірулентності *M. tuberculosis* порівнювали ознаки вірулентності штаму мікобактерій H37Rv та авірулентності штаму *M. tuberculosis* – *M. bovis*. Виявлено однаковий набір більшості мембранних білків, але були виявлені відмінності у білках ESAT-6, які виявляються лише у штамів H37Rv. Слід зазначити, що антиген ESAT-6 утворює гетеродимерний комплекс із білком CFP-10. Таким чином, припускають, що система ESAT-6-CFP-10 асоційована з вірулентністю *M.*

tuberculosis і перешкоджає злиттю фагосом та лізосом усередині макрофагів господаря, тим самим запобігаючи руйнуванню клітини мікобактерій.

За допомогою порівняльного геномного аналізу цих штамів виявили відсутність певних регіонів відмінності (RD) в геномі BCG, тому відсутність патогенності пов'язують із втратою відповідних генів. Додатково для розробки діагностичних і вакцинних препаратів запропоновано 22 диференціально експресованих білки, таких як ацетил-CoA-ацетил-трансферази (Rv0243) і деякі Esat-6-подібні білки (Rv1198, Rv1793).

У культуральному фільтраті *M. tuberculosis* виявляється ранній секреторний антиген ESAT-6 з молекулярною масою 6 кДа. Цей білок кодується RD1 *M. tuberculosis*, втраченою в процесі тривалого культивування у вакцинному штамі BCG. Результати доклінічних досліджень протективних властивостей антигена ESAT-6 у вигляді пептидних та ДНК вакцин, а також у складі бактеріальних векторів на основі BCG та *S. typhimurium* показали, що внаслідок недостатньої імуногенності білка ESAT-6 формування захисного ефекту імунізації визначається способом його введення та доставки в організм.

Субодиничні вакцини складаються з очищеного білка та ад'ювантів. Крім антигена ESAT-6 у субодиничних вакцинах запропоновано використовувати й інші очищені білки 85B та 85A. Обнадійливі результати отримані при створенні грипозних векторів, які експресують антиген ESAT-6. Отримання атенуйованих рекомбінантних штамів вірусу грипу А, що експресує ранній секреторний мікобактеріальний антиген ESAT-6, продемонструвало кращий захисний ефект порівняно з класичною BCG вакциною в модельних експериментах із зараження мишей туберкульозною інфекцією (2-кратна інтраназальна імунізація). До переваг грипозних векторів при отриманні протитуберкульозних вакцин можна віднести:

- 1) відсутність ДНК стадії в реплікативному циклі вірусу, що виключає хромосомну інтеграцію вірусного геному;
- 2) формування вираженої клітинної та гуморальної відповіді на системному рівні та у вхідних воротах інфекції;
- 3) існування багатьох антигенних підтипів вірусу грипу, що дозволяє проводити повторні імунізації для досягнення максимального профілактичного або лікувального ефекту;
- 4) доведена безпечність живих грипозних вакцин.

Багатообіцяючими є результати спільних досліджень двох світових лідерів у виробництві вакцин *Crucell* і *Aeras*, які створили вакцину для профілактики туберкульозу на основі технології *AdVac®*, що пройшла кілька етапів клінічних випробувань. Як вектор використовують аденовірус типу 5 або 35, в який включений генетичний матеріал мікобактерій туберкульозу. Встановлено, що імунна реакція CD8⁺ Т-клітин значно вища, ніж при випробуванні інших вакцин проти туберкульозу.

Новим напрямом, який виник і останні роки, є використання *аерозольних вакцин*. Вакцини отримують шляхом обробки живих вакцин у спреї-сушці (англ. – *spray-drying*) короткочасною дією високої температури. При цьому використовують ряд компонентів, які захищають мікобактерії, наприклад, гліцерин, різні солі, амінокислоти. Виживає близько 50 % бактерій. Аерозольні вакцини продемонстрували на тваринах більшу ефективність, ніж традиційні вакцини. Крім того, ряд дослідників вважає аерозольний шлях введення для мікобактерій більш природнім. Морських свинок прищеплювали аерозольною та ін'єкційною вакцинами, а потім заражали мікобактеріями туберкульозу. При використанні аерозольної вакцини, отриманої методом спреї-сушки, виявлено менше 1 % уражених легень та селезінки, тоді як при дослідженні тварин, імунізованих ін'єкційним шляхом, було виявлено 5 % ураження легеневої тканини та 10 % ураження селезінки мікобактеріями.

Одним із варіантів підвищення імуногенності вакцини BCG є *введення у вакцину імуностимуляторів*. Так, введення тваринам вакцини BCG разом із полікатіонними поліпептидами, наприклад, з полі-L-аргініном (що містять 60 аргінінових залишків – PR60), приводило до підвищення імуногенності вакцини та більшого протективного ефекту у мишей. Аналогічний ефект викликало спільне введення мишам вакцини BCG і PPD-RT-49, який є похідним туберкуліну, виділеного з культуральної рідини мікобактерій, які ростуть на середовищі Сотона.

Запропоновано вакцини проти туберкульозу у формі штучних мікобактеріальних частинок, які утворюють є комплексом величиною 10–25 нм. У центрі «ядра» полінуклеотидного комплексу знаходиться двоспіральна РНК дріжджів штаму *Saccharomyces cerevisiae* M437 Y116, зв'язана з активованим полісахаридом та білками мікобактерій, виділеними з культури BCG. Мишей імунізували цим комплексом внутрішньом'язово триразово з інтервалом 2 тижні. Групу порівняння імунізували традиційною

вакциною за цією ж схемою. Порівняно з вакциною BCG комплекс приводив до збільшення синтезу антитіл проти антигенів мікобактерій.

Вченими запропоновано вакцину на основі глікопептиду, виділеного з мікобактерій туберкульозу (BCG) за допомогою детергенту тритону X-100, кон'югованого з ад'ювантом – поліоксидонієм. Вивчення даного препарату продемонструвало відсутність алергізивної, анафілактичної, канцерогенної та тератогенної дії. Протективні властивості вакцини вивчали шляхом введення препарату у кількості 100 мкг антигена та 1 мг поліоксидонію. Через 3 тижні тварин заражали вірулентним штамом *M. tuberculosis* H37Rv у дозі $2-5 \times 10^5$ бактерій. Препарат продемонстрував високі протективні властивості.

Таким чином, вакцина BCG, яка використовується сьогодні для профілактики туберкульозу, проявляє алергійні властивості, залишкову вірулентність і, найважливіше, недостатню ефективність для боротьби із захворюваністю на туберкульоз. Як видно з наведених даних, ведуться численні дослідження щодо отримання препаратів з мікобактерій, які мають протективні властивості. Запропоновані субодиничні вакцини містили білкові, глікопротеїдні, полісахаридні антигени. Використовували ДНК-вакцини та модифіковані вакцини BCG, у яких як «ендогенні» ад'юванти, що підсилюють ефективність вакцинації, були використані гени, які кодують молекули цитокінів, рекомбінантні вакцини. Як ад'юванти використовували сапоніни, масляні композиції, ліпосоми та ліпідні фракції мікобактерій.

Підсумовуючи, зупинимося на кількох *вакцинах-кандидатах* для боротьби з мікобактеріальною інфекцією. Ад'юванти в протитуберкульозних вакцинах в даний час знаходяться на стадії клінічної розробки.

1. Вакцина M72/AS01E – ад'ювантна рекомбінантна вакцина, яка містить два антигени *M. tuberculosis* – 32A та 39A. Це субодинична вакцина-кандидат, що містить рекомбінантний злитий білок зазначених двох антигенів. До складу вакцини входить ад'ювантна система AS01 (використовується у комерційній вакцині проти оперізуючого лишая *Shingrix®*). Цей ад'ювант був описаний як промотор відповіді Th1.

2. Вакцини на основі катіонної ліпосомальної платформи CAF01. Цей ад'ювант є промотором відповідей Th1 та Th17 і здатен індукувати відповіді довгострокової пам'яті.

3. Вакцина на основі ад'юванта GLA (синтетична версія монофосфориліпіду A) з активністю агоніста TLR4. Ад'ювант GLA, приготовлений у вигляді емульсії сквалена типу «масло у воді» – GLA-SE – використовували в комбінації з антигеном ID93 у доклінічних та клінічних випробуваннях. ID93 являє собою злитий білок, що складається з п'яти антигенів *M. tuberculosis*, чотири з яких пов'язані з вірулентністю, а один (Rv1813) – з латентністю. Така вакцина може бути орієнтована на латентну форму інфекції. Проведено випробування на тваринах, заражених *M. tuberculosis*, попередньо імунізованих вакциною ID93-GLA-SE. Дослідження проводили шляхом порівняння групи імунізованих тварин з одночасним прийомом антибіотиків та групою, яка одержувала тільки антибіотики. Результати показали збільшення виживання, покращений контроль бактеріального навантаження та зниження легеневої патології у групі вакцинованих тварин, які приймали антибіотики. Просто прийом антибіотиків значного ефекту при лікуванні не показував. Автори пропонують цей метод як терапевтичний. Ад'ювант було описано як промотор відповіді Th1.

4. Вакцина IC31 являє собою ад'ювантну вакцину, що складається з протимікробного пептиду KKK та олігодезоксинуклеотиду ODN1a. Багатий на лейцин пептид KKK і ODN1a мають синергетичний ефект щодо ад'ювантної активності. Цей ад'ювант має активність агоніста Toll-подібних рецепторів TLR9, що залежить від обох компонентів. Механізм дії пов'язаний із здатністю TLR9 активуватися бактеріальною ДНК, а саме неметильованим CpGODN, що має місце у випадку ODN1a. При природній інфекції *M. tuberculosis* ці частини бактеріальної ДНК зв'язуються з рецепторами TLR9 та сприяють активації макрофагів та вивільненню прозапальних цитокінів. Ад'ювант було описано як промотор відповіді Th1.

5. H4:IC31 є вакциною кандидатом, яку вводять внутрішньом'язово. При цьому ад'ювант та антиген утримуються разом за рахунок електростатичних взаємодій завдяки позитивному заряду IC31 та загальному негативному заряду H4. Антиген H4 являє собою злитий білок між антигенами: 85B і Tb10.4 із *M. tuberculosis*. Концентрація антигена в 9 разів менша, ніж ад'ювантів. Дослідження вакцини проводили в країнах з низькою (Швеція, Фінляндія) та значною (Південна Африка) кількістю хворих на туберкульоз. Отримані результати при використанні вакцини H4:IC31 не призвели до обнадійливих результатів, що потребує подальшого вивчення даної вакцини.

Наведені дані дають обґрунтовану впевненість у створенні протитуберкульозної вакцини вже найближчими роками, оскільки сьогодні проводяться клінічні випробування 10 вакцин-кандидатів.

4.1.6. Вакцини для профілактики *Hib*-інфекції

Ряд грамнегативних та грампозитивних бактерій утворюють капсульну структуру, що містить полісахариди. Здатність бактерій до утворення капсул значною мірою визначає взаємодію між бактеріальними клітинами та організмом господаря при розвитку інфекційного процесу. *Капсульні антигени* відіграють важливу роль у вірулентності та імуногенності бактерій. Є залежність між наявністю у бактерій капсули та їх токсичністю. Встановлено, що гемолітична активність також притаманна переважно капсульним формам бактерій. Капсульні антигени здатні пригнічувати фагоцитоз бактерій та створювати умови для розмноження збудників інфекції в організмі господаря.

Капсульні полісахариди несуть у собі основну серологічну антигенність бактеріальних видів та успішно взаємодіють з антитілами до цих бактерій, тому такі полісахариди є *ефективними вакцинними антигенами*. Як приклад використання полісахаридних вакцин можна навести препарат, що містить очищені капсульні полісахариди *Streptococcus pneumoniae* – *Pneumovax 23 (PPV 23)* виробництва *Sanofi Pasteur*. Вакцина є полівалентною та містить полісахариди 23 серотипів бактерій. PPV 23 ефективна проти 90 % нечутливих до пеніциліну пневмококів та 96 % пневмококів, які викликають захворювання. У деяких випадках для конкретного патогенного організму є єдиний серотип полісахариду, наприклад *Haemophilus influenzae* типу В (*Hib*) проти інвазивного менінгіту *H. influenzae* типу В. У такому випадку можна створити моновалентну вакцину. Однак у більшості випадків існують численні серотипи капсульних полісахаридів (близько 90 для *Str. pneumoniae*), і такі вакцини повинні бути мультивалентними, щоб мати досить високий рівень загальної ефективності. Ці вакцини першого покоління були просто очищеними полісахаридами і мали низькі протективні властивості.

Гемофільна інфекція (збудник – *Haemophilus influenzae* типу В (*Hib*)) є основною причиною гнійного менінгіту у дітей до двох років життя, який часто призводить до серйозних неврологічних ускладнень та леталь-

них наслідків. Крім менінгіту, Ніб викликає перикардити, ендокардити, перитоніти та інші гнійно-септичні захворювання. Зараження відбувається повітряно-краплинним шляхом. За даними ВООЗ, щорічно від цих інфекцій помирає близько 500 000 дітей у всіх країнах світу.

Перша ліцензована Ніб вакцина містила полірибозилрибітолфосфат (PRP), полісахарид капсули мікроорганізму. Однак полісахаридна вакцина була недостатньо імуногенна для дітей віком до 2 років, тому вона була дозволена для використання тільки для дітей віком від 18 місяців. Дослідження, проведене у Фінляндії в 1977 р. підтвердило значне зниження Ніб-захворювань та ефективність PRP-Ніб-вакцини у 90 % випадків. Водночас дослідження вакцини в США показало її менш надійну ефективність. В результаті цих досліджень та нагальної потреби мати вакцину для малолітніх дітей почалися розробки зі створення кон'югованих вакцин. Такі кон'юговані вакцини, в яких зв'язаний з білком Ніб-полісахарид, мають ряд переваг: індукують високі титри антитіл, більш імуногенні для малолітніх дітей, демонструють високу імунну відповідь при ревакцинації. У 1989 році до використання для дітей віком до 18 місяців було дозволено чотири кон'юговані вакцини:

- ✓ PRP-D – містила полісахарид, кон'югований з дифтерійним анатоксином;
- ✓ НбОС – містила полісахарид, кон'югований з нетоксичним мутантним дифтерійним токсином, відомим як CRV 197;
- ✓ PRP-OMR – містила полісахарид, кон'югований з білком зовнішньої мембрани *Neisseria meningitidis*;
- ✓ PRP-T – містила полісахарид, кон'югований зі правцевим анатоксином.

Доза кожної вакцини становить 0,5 мл. У табл. 4.5 наведено склад вакцин, і, як можна побачити, вони містять як різні кількості полісахариду і кон'югованого білка, так і їх співвідношення.

Таблиця 4.5 – Склад кон'югованих Ніб-вакцин

Назва вакцини	Кількість полісахариду в 1 дозі, мкг	Назва протеїну	Кількість протеїну в 1 дозі, мкг	Співвідношення полісахарид/протеїн
PRP-D	25	Анатоксин дифтерійний	18	1,38

Закінчення табл. 4.5

Назва вакцини	Кількість полісахариду в 1 дозі, мкг	Назва протеїну	Кількість протеїну в 1 дозі, мкг	Співвідношення полісахарид/протеїн
НЬОС	10	Анатоксин дифтерійний	25	0,4
PRP-OMR	7,5	<i>Neisseria meningitides</i>	125	0,06
PRP-T	10	Анатоксин правцевий	20	0,5

Дослідження імуногенних властивостей цих чотирьох вакцин у процесі трьох імунізацій продемонструвало суттєві відмінності у продукції антитіл, наведені у табл. 4.6.

Таблиця 4.6 – Імунна відповідь на кон'юговані вакцини

Назва вакцини	Кількість щеплених дітей	Титр антитіл, мкг/мл			Сероконверсія після 3 щеплень
		1 введення	2 введення	3 введення	
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 %

Технологія отримання вакцини проти *Hib* зводиться до наступних стадій:

1. Підготовка штаму *Hib* бактерій, приготування поживних середовищ. Штами *Haemophilus influenzae* є аеробними нерухомими грамнегативними паличками (розміром 0,5×1,0 мкм), що розташовуються в мазках окремо або парами, без ознак поліморфізму, неспороутворюючі, капсули можуть утворювати або не утворювати залежно від виду. На щільних середовищах утворюють опуклі, круглі, напівпрозорі колонії з рівними краями, діаметром близько 0,5–0,8 мм для 24-годинної культури та 1,0–1,5 мм для 48-годинної. Оптимум культивування – рН 7,2–7,4 і температура 37±0,5 °С. Вирощують на модифікованому середовищі Mueller–Hinton з додаванням геміну (або інших порфіринів) та нікотинамід-аденіндинуклеотиду (NAD). Гемін є залізовмісним порфірином з хлором, який

може утворюватися з гемової групи, такої як гем В, виявлений в гемоглобіні крові людини. NAD – складна органічна сполука, кофермент, наявний у всіх живих клітинах, бере участі у всіх метаболічних процесах. Капсуловмісні бактерії є гетерогенними за полісахаридним компонентом і представлені шістьма типами: a, b, c, d, e, f.

Для вирощування *Hib* бактерій, наприклад, штаму 20752, використовують *напівсинтетичні рідкі поживні середовища*, що містять (г/л): NaCl – 5,8; K₂SO₄ – 1; MgCl₂ – 0,2; CaCl₂ – 0,022; KH₂PO₄ – 2,7; K₂HPO₄ – 3,5; глюкоза – 5; тіамін – 0,004; пантотенат кальцію – 0,004; KCl – 0,09; NH₄Cl – 1,25; MgSO₄·7H₂O – 0,6. Можливо використовувати у складі середовища екстракт пекарських дріжджів з білковими компонентами не більше 30 кДа у кількості 10 г/л. Обов'язковими компонентами середовища є: гемін – 0,005–0,01 г/л (C₄H₃₂O₄N₄FeCl) та NAD – 0,002–0,004 г/л (виконує функцію переносника атомів водню та бере участь в утворенні АТФ в аеробному метаболізмі). Особливу роль у поживному середовищі відіграє *гемін*, що пов'язано з тим, що *Hib* не здатна синтезувати гем, який необхідний бактерії для синтезу цитохромів, а надходження гема опосередковано забезпечує як патогенність бактерій, так і повноцінність антигенного складу. У гемофільних бактерій існує кілька комплексів для вилучення гему з навколишніх білків. У комплекс входить білок, закріплений на зовнішній мембрані (57 кДа) та два мембранні білки (32 і 29 кДа). Як джерело амінокислот та нуклеотидів застосовують ферментативні гідролізати тканин або крові, проте більшість дослідників заперечує застосування тваринних продуктів. Оскільки глютамінова кислота, аргінін і аспаргінова кислота вкрай важливі для росту бактерій, запропоновано додавати їх до складу поживного середовища (причому біосинтез клітиною капсульного полісахариду визначає більшою мірою їх співвідношення, а не кількість). рН середовища встановлюють на рівні 7,0–7,4. Оптимальним варіантом стерилізації поживного середовища є стерилізуюча фільтрація через мембрани з розміром пор 0,22 мкм. Допускається стерилізація солей при тиску 1 атм протягом 30 хв.

2. *Культивування штаму*. Культивування бактерій проводять у реакторі при температурі 35–37 °С при постійному перемішуванні (200 об/хв) не більше 16–17 год. Ряд авторів пропонують у процесі культивування поступово збільшувати швидкість перемішування з 200 об/хв до 700 об/хв. У логарифмічній фазі культивування бажано підтримувати постійну величи-

ни рН – 6,8–7,2, коригуючи її розчином хлоридної кислоти, що обумовлено збільшенням рН через 5–7 год після початку культивування. Необхідно оптимізувати накопичення біомаси, оскільки при збільшенні кількості бактеріальних клітин зменшується кількість синтезованого капсульного полісахариду. Можливе використання до 5 % CO₂. Необхідно уважно контролювати наявність лізису бактерій, що призводить до забруднення культурального середовища. Припиняти культивування краще шляхом охолодженням біореактора до температури не вище 15 °С. Вихід полісахариду знаходиться в межах від 30 до 50 мг на 1 л поживного середовища. Ряд авторів пропонують здійснювати подачу кисню зі швидкістю 5 л/хв, причому вихід полісахариду може досягати 300 мг/л поживного середовища. Інтерес представляють дані щодо можливості використання у складі середовища соєвого пептону, отриманого шляхом ферментативного гідролізу екстракту дріжджів папаїном, та збільшеної кількості геміну (30 мг/л) та нікотинамідаденіннуклеотиду (15 мг/л). У цьому випадку вихід полісахариду може становити близько 980 мг/л.

3. *Виділення та очищення полісахариду.* Одним із методів виділення полісахариду є додавання в реактор формаліну до кінцевої концентрації 1 % та витримування суміші при 37 °С протягом 16–24 год при перемішуванні. Пропонується також додавати формалін до кінцевої концентрації 0,1–0,3 % та витримувати при 2–8 °С протягом 12–16 год. За цей час відокремлюється зв'язаний із клітинами капсульний полісахарид. Потім суміш центрифугують при 5000 об/хв і 2–6 °С протягом 30 хв, відокремлюють бактеріальні клітини від середовища, що містить полісахарид. Вкрай важливим цьому етапі є отримання супернатанту без ознак лізису бактеріальних клітин. В іншому випадку очищення полісахариду ускладнюється. За кількістю мікробних клітин спостерігають вимірюючи оптичну густину при 590 нм. Зниження оптичної щільності в процесі культивування свідчить про початок лізису клітин бактерій. Специфічний антиген Hib – PRP – у культурі визначають методом латекс-аглютинації за допомогою комерційного діагностикуму *Pastorex Meningitis* (Bio-Rad, США). Молекулярна маса полісахариду становить 700–800 кДа.

Отриманий супернатант, що містить капсульний полісахарид, піддають діалізації на мембрані з порогом 100 кДа з фосфатним буфером. Концентрують розчин у 10–20 разів при температурі 2–8 °С. Виділення полісахаридів проводять спиртовим осадженням з використанням детер-

гентів при температурі 4–8 °С. Отриманий концентрований розчин капсульних полісахаридів обробляють 2–3 об'ємами етанолу. Утворений в результаті осад неочищених полісахаридів відокремлюють центрифугуванням при 4–8 °С, осад розчиняють у воді для ін'єкцій і очищають діалізацією. До отриманого розчину додають етанол, утворений осад відокремлюють центрифугуванням. Осад полісахаридів обробляють повторно етанолом до кінцевої концентрації спирту 60–74 %. У процесі очищення використовують катіонний детергент гексадецилтриметиламонію бромід (Цетавіон) у концентрації до 1,0 % та аніонний детергент дезоксихолат натрію у концентрації до 1,0 %.

Деполімеризацію полісахариду можна проводити кількома методами: ультразвуковою обробкою, кислотним або лужним гідролізом. Максимальний вихід можна отримати при лужному гідролізі в 0,4 М бікарбонат-карбонатному буфері (рН 10,5) при кімнатній температурі або при 2–8 °С (краще). Розчин полісахариду охолоджується, наприклад, до температури 4 °С, змішується з рівним об'ємом 0,4 М розчину бікарбонат-карбонатного буфера, охолодженого до 4 °С, суміш витримується при вказаній температурі та інтенсивному перемішуванні (400 об/хв) протягом 90 хв.

4. Контроль виділеного полісахариду:

- ✓ ідентифікація полісахариду імунологічними методами, з використанням специфічних антитіл та ¹H або ¹³C ЯМР-спектроскопії;
- ✓ молекулярно-масовий розподіл шляхом гель-фільтрації, молекулярна маса близько 300 кДа;
- ✓ визначення складу полісахариду – вміст рибози не менше ніж 32 % від сухої ваги;
- ✓ вміст полісахариду методом визначення пентози, використовуючи D-рибозу як стандарт, або альтернативним методом – аніонно-обмінна хроматографія з амперометричною детекцією (HPLC-RAD);
- ✓ вміст фосфору – теоретично фосфору має бути близько 8,4 %, у специфікаціях вказують від 6,8 до 9,0 % у перерахунку на суху речовину;
- ✓ вміст білка (метод Лоурі) – не більше 1,0 % у перерахунку на суху речовину;

- ✓ вміст нуклеїнових кислот (УФ-спектроскопія)– не більше 1,0 % у перерахунку на суху речовину;
- ✓ ендотоксини – не більше ніж 10 МО на 1 мкг полісахариду, або, як альтернатива, пірогенність – 1 мкг полісахариду на 1 кг маси тварини.

5. Контроль білкового компонента:

- ✓ фракційний склад методом електрофорезу у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом;
- ✓ визначення токсичності;
- ✓ амінокислотний аналіз;
- ✓ амінокислотна послідовність;
- ✓ пептидне картування;
- ✓ мас-спектроскопія;
- ✓ круговий дихроїзм;
- ✓ флуоресцентна спектроскопія.

До ступеня очищення білків висувають такі вимоги:

1) анатоксини дифтерійний та правцевий повинні містити не менше 1500 LF на 1 мг білкового азоту. Необхідно також проводити контроль амінокислот (таких, як лізин), які часто додаються в процесі детоксикації для запобігання реверсії;

2) CRM 197 – нетоксичний мутант дифтерійного токсину, ізольований із культури *Corynebacterium diphtheriae* C7/B197, має містити понад 90 % білка (визначення методом ВЕРХ);

3) білок з *Neisseria meningitidis* після очищення повинен містити не більше 8,0 % полісахаридів у перерахунку на суху речовину, бути апірогенним в дозі 0,25 мкг на 1 кг маси тварини.

6. Одержання кон'югату полісахариду з білком:

6.1. Модифікація молекули полісахариду. До охолодженого до 4 °С полісахариду в 0,005М фосфатному буфері з рН 7,2 у концентрації 5 мг/мл додають 1М NaOH до рН 10,5. До цього розчину додають 0,21мМ розчин бромціану (CNBr), розчиненого в N,N-диметилформаміді. Розчин витримують при рН 10,5 протягом 6 хв, а потім доводять рН до 7,2, використовуючи 1М HCl. До розчину додають 2,1 ммоль розчин діамінобутану в дистильованій воді та інкубують протягом 45 хв при кімнатній температурі і рН 7,2. Після інкубації суміш діалізують проти дистильованої води. Діалі-

зат концентрують та очищають від реагентів ультрафільтрацією. Концентрат висушують у вакуумі, отримуючи модифікований полісахарид.

6.2. *Одержання преципітату модифікованого полісахариду.* 1 частину модифікованого полісахариду розчиняють у 0,1М етилморфоліновому буфері з рН 8,5 і змішують з 2,7 частинами 0,26мМ N-гідроксисукцинімідним ефіром S-ацетилтіогліколевої кислоти, розчиненої в N,N-диметилацетаміді (SATA). Для цієї реакції можна використати глутаровий альдегід. Наприклад, спейсер, що містить олігосахарид Hіb, був безпосередньо кон'югований з похідним анатоксину правця за допомогою глутарового альдегіду. Після 1 год інкубації при кімнатній температурі реакцію зупиняють додаванням оцтової кислоти. Отриманий преципітат SATA-модифікованого полісахариду висушують у вакуумі. Сухий преципітат возчиняють у воді, а потім очищають ультрафільтрацією.

6.3. *Отримання комплексу бромацетил правцевого анатоксину.* 1 частину 0,04М розчинку N-сукцинімідил бромацетату, розчиненого в N,N-диметилацетаміді, змішують з 1,7 частини розчину правцевого анатоксину в 0,1М фосфатному буфері з рН 8,0. Після 1,5 год проведення реакції при кімнатній температурі суміш піддають ультрафільтрації, концентрат розводять в 0,1М фосфатному буфері, що містить 5 ммоль ЕДТА з рН 7,5.

6.4. *Кон'югування полісахариду та правцевого анатоксину.* Розчин бромацетилату правцевого анатоксину додають до SATA-модифікованого полісахариду. Залежно від необхідного співвідношення «полісахарид : білок» додають розраховану кількість компонентів. Наприклад, при співвідношенні «полісахарид : білок» 0,25 : 1 на 1 частину преципітату полісахариду додають 1,7 частин бромацетилату анатоксину в 0,1М фосфатного буфера з рН 7,5, що містить 5 мМ ЕДТА, інкубують із 2М розчином гідроксиламіну, також розчиненого в 0,1М фосфатному буфері з рН 7,5, що містить 5 мМ ЕДТА. Через 43 год інкубації при кімнатній температурі блокують залишки бромацетильних груп додаванням 2-аміноетанолу в 0,1М фосфатному буфері з рН 7,5, що містить 5 мМ ЕДТА. Потім суміш витримують протягом 6 год.

6.5. *Очищення кон'югату полісахарид-білкового комплексу.* Отриманий розчин піддають ультрафільтрації, врівноважують фосфатним буфером і приступають до фракціонування кон'югату гель-проникаючою хроматографією – ВЕРХ. Очищення можна проводити на *Sepharose CL-4B* з елююванням 0,1М фосфатним буфером (рН 7,0) з ЕДТА (0,005М). Фрак-

ції, які містять кон'югований полісахарид-білковий комплекс, об'єднують і використовують для отримання Hib-вакцини.

Слід зазначити, що кожна із зазначених реакцій протікає тільки в суворо визначених умовах, зокрема при заданих величинах рН, іонної сили, концентрації кожного з реагентів, температури, часу.

7. Контроль кон'югованого комплексу «полісахарид/білок»:

- ✓ визначення залишкових реагентів, які використовуються у процесі синтезу;
- ✓ залишкові реакційні функціональні групи;
- ✓ визначення кількості PRP;
- ✓ визначення кількості кон'югату і полісахариду, який не зв'язався;
- ✓ визначення кількості білка у кон'югаті;
- ✓ визначення співвідношення «полісахарид/білок»;
- ✓ визначення молекулярно-масового розподілу;
- ✓ контроль стерильності;
- ✓ контроль специфічної токсичності білків у кон'югаті, наприклад, токсичної дії правцевого або дифтерійного анатоксинів.

8. *Отримання готової Hib-вакцини.* Очищений полісахарид-білковий комплекс стандартизують відповідно до специфікації вакцини, додають кріопротектор (наприклад, сахарозу або лактозу), розливають у флакони, заморожують і піддають ліофілізації. Висушений препарат герметизують і контролюють.

9. Контроль готового препарату:

- ✓ справжність – визначається імунологічними тестами з використанням специфічних антитіл до очищеного полісахариду;
- ✓ контроль стерильності;
- ✓ визначення вмісту PRP (10–25 мкг/доза);
- ✓ визначення вільного PRP (не більше 20 %);
- ✓ визначення залишкової вологи (трохи більше 3,0 %);
- ✓ контроль пірогенності (1 мкг/кг) або вмісту ендотоксинів (не більше 10 МО на 1 мкг полісахариду);
- ✓ рН (від 6,5 до 7,2);
- ✓ визначення токсичності;
- ✓ визначення імуногенності на тваринах (сероконверсія не менше 50 %).

Принципова схема отримання вакцини проти Ніб наведена на рис. 4.9.

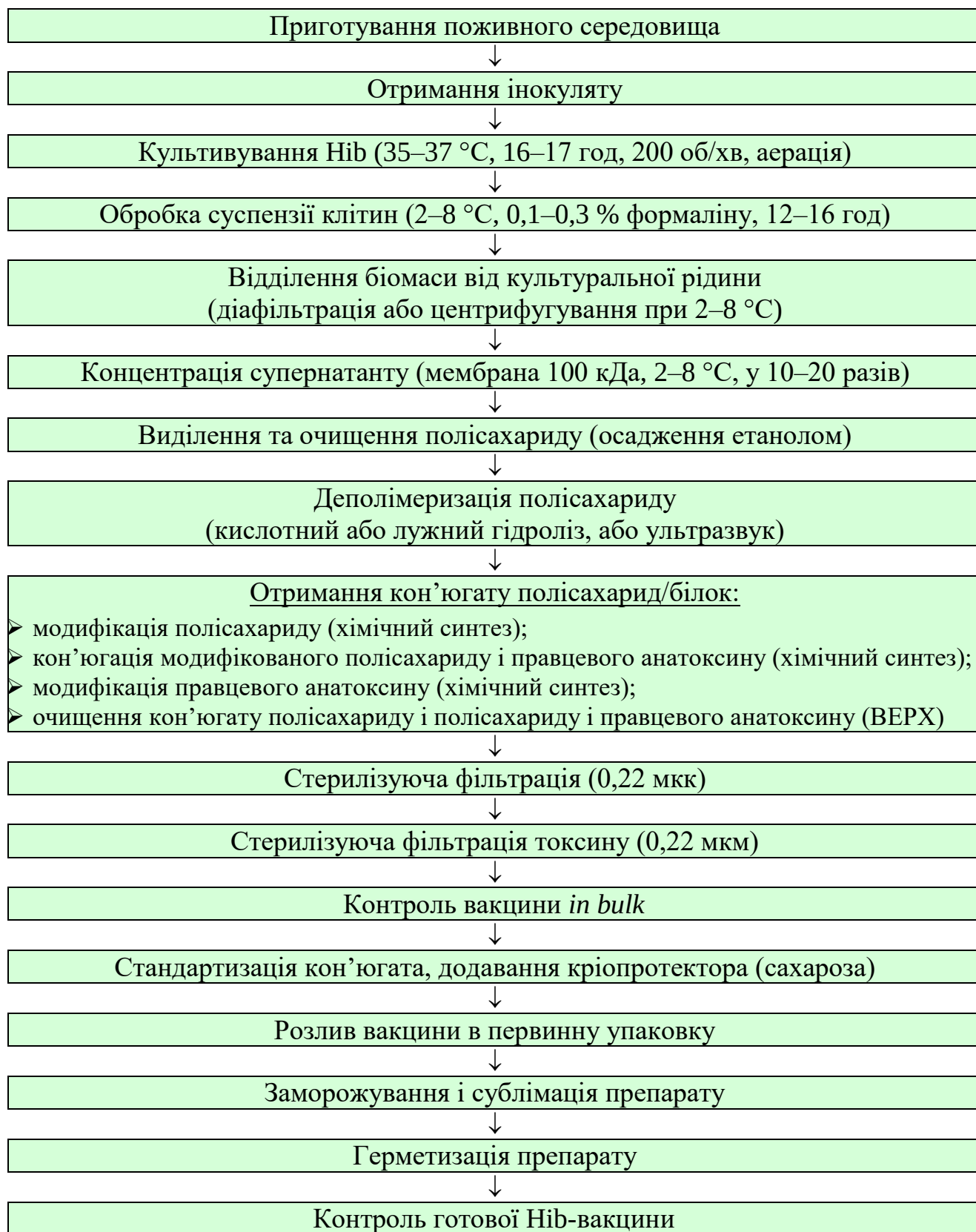


Рисунок 4.9 – Схема отримання Ніб-вакцини

У табл. 4.7 наведено дані щодо контролю кон'югованої ліофілізованої Ніб-вакцини різних виробників.

Таблиця 4.7 – Характеристика Ніб-вакцин

Назва показника (норма)	Характеристика продукту	
	Bharat Biotech, Індія	Sanofi Pasteur, Франція
Опис	Ліофільно-висушена маса білого кольору	Ліофільно-висушена маса білого кольору
Розчинність	Легко розчиняється в сольовому розчині, прозорий, без видимих частинок	Легко розчиняється в сольовому розчині, прозорий, без видимих частинок
Ідентифікація PRP	Позитивна реакція з агглютуючою сироваткою	Позитивна реакція з агглютуючою сироваткою
Правцевий антиген	—	Позитивна
pH (6,5–7,2)	6,9	6,91
Вміст води (< 3 %)	2,9	1,36
Вміст PRP (≥ 9 мкг/дозу)	10,4	9,64
Вміст вільного PRP (≤ 20 %)	2,1	5,3
Аномальна токсичність	Відповідає	Відповідає
Стерильність	Стерильний	Стерильний
Пірогенність	Відповідає	Відповідає
Специфічна активність	50 % тварин в тесті сероконверсії	—
Вміст фосфору	—	0,73 мкг/дозу
Осмолярність	—	39,59 мкг/дозу

Ніб-вакцина рекомендована для активної імунізації дітей віком від 2 місяців для профілактики небезпечних захворювань, що викликаються *Neisseria meningitidis* типу В: пневмонії, епіглотиту, менінгіту, артрити, остеомієліту та ін. При цьому менінгіт становить 52 % від усіх форм цієї інфекції. Серед ускладнень у людей, які переохворіли на цю інфекцію, може бути глухота і розумова відсталість. Застосування Ніб-вакцини дозво-

ляє в десятки разів знизити захворюваність. Однак слід враховувати, що вакцина не захищає від захворювань, збудником яких є інші типи *H. influenzae*. Препарат досить добре переноситься дітьми, загальні симптоми, зареєстровані протягом перших 48 годин після проведення вакцинації, були легкими та проходили самі собою. Аналіз економічної ефективності вакцинації проти Ніб показує, що вартість лікування одного випадку Ніб-менінгіту становить 1296 доларів, а вартість подальшого лікування – 15820 доларів. Водночас, ціна однієї дози вакцини становить близько 5 доларів, ефективність захисту 95–99 %. ВООЗ ставить перед Європейським Союзом завдання знизити рівень захворюваності на цю інфекцію в Європі до 1 випадку на 100 000 осіб. Більш ніж 20-річний досвід застосування Ніб-вакцини в десятках країн світу показав її безпечність та високу ефективність для запобігання інфекції.

У підсумку слід зазначити, що перші вакцини проти інфекції *H. influenza* типу В були розроблені емпіричними методами, шляхом проб і помилок. Останнім часом запропоновано інші інструменти розробки процесів, у тому числі математичне моделювання, а також нові регуляторні ініціативи, що вимагають більш високого рівня розуміння як самого продукту, так і процесу отримання вакцини за допомогою біотехнології. Процес отримання Ніб-вакцини, включаючи відповідні методи контролю препарату на різних стадіях процесу, розроблений і запропонований для виробництва нових вакцин проти Ніб. Стратегія, якої дотримувалися в процесі розробки кон'югованої Ніб-вакцини, була цілеспрямованим комплексним підходом, заснованим на раніше існуючих знаннях і досвіді роботи з продуктами даної групою вакцин. Математичне моделювання використовувалося для розробки прогностичної моделі для вихідного процесу Ніб («базова модель»), а також «оптимізованої» моделі, в якій пропонувалося внести низку змін до процесу, які могли привести до оптимального контролю якості готового препарату та контролю на критичних стадіях виробництва.

В даний час в США FDA ліцензувала три моновалентні кон'юговані вакцини: *ActHIB®* (PRP-T (правцевий анатоксин)), *Hiberix™* (PRP-T (правцевий анатоксин)), *PedvaxHIB®* (PRP-OMR (білок менінгококу)). Використання цих вакцин рекомендовано для імунізації немовлят у віці від 6 тижнів.

4.2. Протівірусні вакцини

Відмінною рисою вірусів є відсутність оболонки та нездатність до незалежного метаболізму. Віруси нездатні до реплікації поза клітиною господаря. Зазвичай інфекція супроводжується пошкодженням тканин, викликаним як самим вірусом, так і імунною відповіддю на нього. Віруси життєздатні лише в організмі господаря і зазвичай швидко адаптуються, знижуючи свою вірулентність. Але віруси, які добре адаптуються в організмі тварини, можуть бути високовірулентними для людини, наприклад, вірус сказу.

Розмноження вірусів у клітині-господарі можна описати так:

- ✓ адсорбція вірусу на поверхні клітин з допомогою з'єднання вірусу з рецепторами клітини;
- ✓ вірус проникає у клітину шляхом злиття з мембраною;
- ✓ вірусу звільнення від білкової оболонки – нуклеїнова кислота транспортується до ядерної оболонки клітини господаря та проникає у ядро;
- ✓ у ядрі відбувається транскрипція специфічних послідовностей нуклеїнової кислоти вірусу (ДНК чи РНК) з утворенням мРНК;
- ✓ трансляція мРНК;
- ✓ реплікація вірусної ДНК або РНК та транскрипція дочірньої та батьківської нуклеїнової кислоти;
- ✓ утворення структурних та інших вірусних білків;
- ✓ самозбірка вірусних білків навколо геному вірусу;
- ✓ вихід віріонів із клітини.

4.2.1. Механізми протівірусного імунітету

Віруси проникають у клітину після їх взаємодії зі специфічними рецепторами на її поверхні (наприклад, CR-2 рецептор комплементу для вірусу Епштейна–Барра, ацетилхоліновий рецептор нейронів для вірусу сказу, CD-4-молекула на Т-клітинах для вірусу імунodefіциту людини).

Відомо, що *цитотоксичні Т-лімфоцити* «навчені» розпізнавати молекули *головного комплексу гістосумісності* (МНС, англ. – *major histocompatibility complex*) класу I та реагувати на взаємодію вірусного антигена та молекули МНС-I. Оскільки практично будь-який тип клітин може

бути інфікований вірусом, молекули МНС-I, на відміну від молекул МНС класу II, експресовані на більшості клітин. Докладно МНС розглянутий у розділі 2.3.

Для виживання та розмноження вірус проникає в клітини людини або тварини і заражає господаря. Після проникнення вірусу всередину клітини, імунна система господаря не може швидко «виявити» вірус і тому не зрозуміло, що клітина-господар інфікована. Щоб подолати це, клітини використовують систему, яка дозволяє їм передати інформацію іншим клітинам. З цією метою використовуються такі молекули, як МНС-I, що дозволяють відображати фрагменти білків (пептидів) усередині клітини. При зараженні клітини вірусом пептиди включатимуть фрагменти білків, які виробляються вірусом. Спеціальна клітина імунної системи – Т-клітини – циркулює у пошуках ознак наявності агента інфекції. Один тип Т-клітин називається цитотоксичними Т-клітинами, тому що вони вбивають клітини, інфіковані вірусами. Цитотоксичні Т-клітини мають на своїй поверхні спеціалізовані білки, які допомагають їм розпізнати інфіковані вірусом клітини. Ці білки називаються Т-клітинними рецепторами (TCR, англ. – *T-cell receptor*). Кожна цитотоксична Т-клітина має TCR, який може специфічно розпізнати певний антигенний пептид, зв'язаний з молекулою МНС. Якщо рецептор Т-клітини виявляє пептид вірусу, він «попереджає» свою Т-клітину про інфекцію. Т-клітина вивільняє цитотоксичні фактори, щоб убити інфіковану клітину і таким чином запобігає виживанню вірусу, який заразив клітину.

Віруси швидко адаптуються та розробили способи як уникнути виявлення Т-клітинами. Деякі віруси перешкоджають проникненню МНС на поверхні клітини для відображення вірусних пептидів. Якщо це відбувається, Т-клітина не знає, що всередині інфікованої клітини є вірус. Однак існує й інша імунна клітина, що спеціалізується на знищенні клітин зі зміненою кількістю МНС-I на своїй поверхні – *НК-клітина, яка є природною клітиною-кілером* (англ. – *natural killer*). Коли НК-клітина знаходить клітину, в якій молекул МНС менше, ніж у нормі вона виділяє токсичні речовини, подібні до цитотоксичних Т-клітин, які вбивають інфіковану вірусом клітину.

У цитотоксичних клітинах є заздалегідь синтезовані *медіатори*. Цитотоксичні фактори зберігаються всередині спеціальних компартментів, які називають гранулами, що містять цитотоксичні зернисті білки (перфо-

рин, гранзим, гранулізин), як у цитотоксичних Т-клітинах, так у НК-клітинах доти, доки контакт з інфікованою клітиною не викличе їх. Одним з таких медіаторів є *перфорин*, білок який може створювати пори в клітинних мембранах. Молекули перфोरину виділяються Т-лімфоцитами і НК-лімфоцитами, проникають в клітину-мішень через цитоплазматичну мембрану, з'єднуючись одна з одною та утворюючи пори до 20 нм. Ці пори дозволяють проникати іншим факторам у клітину-мішень, щоб полегшити руйнування клітини. Ферменти *гранзими* (серинові протеази, які індукують апоптоз) також зберігаються у гранулах та вивільняються з них. Гранзими проникають у клітини-мішені через пори, зроблені перфорином. Опинившись усередині клітин-мішеней, вони індукують процес, відомий як запрограмована смерть, або апоптоз, внаслідок чого клітина-мішень гине. Іншим цитотоксичним фактором, що вивільняється, є *гранулізин*, який безпосередньо атакує зовнішню мембрану клітини-мішені, руйнуючи її шляхом лізису.

Цитотоксичні клітини також знову синтезують та вивільняють інші білки, які називаються *цитокінами*, після контакту з інфікованими клітинами. Цитокіни, такі як інтерферон- γ та фактор некрозу пухлин, передають сигнал від Т-клітини до інфікованих або інших сусідніх клітин для посилення механізму знищення інтерфероном. Заражені вірусом клітини продукують і виділяють невеликі білки, які називають *інтерферонами*, які відіграють роль в імунному захисті від вірусів. Інтерферони запобігають реплікації вірусу, безпосередньо порушуючи їх здатність до реплікації всередині інфікованих клітин. Вони також діють як сигнальні молекули, які дозволяють інфікованим клітинам попереджати прилеглі до них клітини про присутність вірусу – цей сигнал змушує сусідні клітини збільшувати кількість молекул МНС-I на своїй поверхні, щоб Т-клітини, які досліджують цю область, могли детектувати та усувати вірусну інфекцію як описано вище.

Таким чином, на відміну від антигенів бактерій, *всі вірусні антигени мають білкову природу* (глікопротеїни, нуклеопроतेїни, фосфопротеїни). Протективні властивості мають білки, що забезпечують злиття вірусу з клітиною, а також білки, розташовані в більш глибоких шарах вірусу. Напруженість противірусного імунітету залежить від рівня циркулюючих антитіл та утворення цитотоксичних лімфоцитів. Цитотоксичні лімфоцити спричиняють лізис інфікованих вірусом клітин після їх активації комплек-

сом вірусного антигена з продуктами МНС-I. Чужорідний пептид зв'язується МНС та розпізнається Т-клітинними рецепторами. Перший доказ того, що з МНС залучено до подання антигена Т-клітин, продемонстровано феноменом рестрикції (обмеження) МНС. Виявилося, що Т-лімфоцит, специфічний до антигена та МНС, розпізнає одночасно обидві молекули. Пізніше було встановлено, що цитотоксична Т-клітина реагує на ядерні антигени вірусу, які не виявляються на поверхні вірусу.

Антитіла, що утворюються при вірусних інфекціях, діють безпосередньо на вірус або клітини, інфіковані вірусом. У зв'язку з цим можна назвати дві *основні форми участі антитіл у розвитку противірусного імунітету*:

Перша форма – це *нейтралізація вірусу антитілами*. Нейтралізація перешкоджає рецепції вірусу на клітині та його проникненню в клітину. Ефект нейтралізації посилюється у присутності комплементу, а також антиідіотипних антитіл, які з'являються на пізніх стадіях інфекції та зв'язують імуноглобулінові епітопи комплексу, що складається з вірусних частинок та антитіл. Комплекс, що складається з вірусних частинок та антитіл, зв'язується з поверхнею макрофага за рахунок його Fc-рецепторів. Присутність комплексу у фагоцитарній вакуолі зазвичай веде до загибелі збудника. Вірус-нейтралізуючі антитіла діють безпосередньо на вірус лише тоді, коли вірус, зруйнувавши одну клітину, переходить на іншу. Деякі віруси, наприклад, герпесу або цитомегаловірус, переходять з клітини в клітину цитоплазматичним містком і уникають «нападу» циркулюючих антитіл. У цьому випадку, як і у випадку інтегрованої форми вірусної інфекції, коли вірусний геном інтегрується в ДНК чутливих клітин, основну роль у становленні імунітету відіграють клітинні механізми, пов'язані передусім із дією специфічних цитотоксичних Т-лімфоцитів, Т-ефекторів гіперчутливості повільного типу та макрофагів.

Друга форма – це *імунний лізис інфікованих клітин*. Проходить за двома напрямками:

- ❖ комплемент залежна цитотоксичність – виникає при взаємодії антитіл з антигенами, експресованими на поверхні інфікованої клітини, з подальшою активацією системи комплементу. Система комплементу – група білків сироватки крові, що складається з протеаз та їхніх активаторів, є важливою частиною гуморального імунітету хребетних тварин. Система комплементу активується, якщо в організм потрап-

ляють бактерії, віруси, деякі токсини або утворюються модифіковані клітини, при цьому клітини мішені руйнуються, а віруси та токсини знешкоджуються. Комплемент складається з 9 компонентів, які визначаються від C'1 до C'9;

- ❖ взаємодія інфікованої клітини з антитілами класу G (IgG) виявляється недостатньою для загибелі клітин-мішеней.

Цитотоксичність виникає, якщо клітини-мішені додатково контактують із клітинами, які несуть рецептори до Fc-фрагментів IgG. Такими клітинами є поліморфно-ядерні лейкоцити і макрофаги, які не мають специфічності по відношенню до вірусного антигена. Основну масу противірусних антитіл становлять IgG. Специфічні Т-кілери з'являються на ранніх стадіях, нерідко передуючи утворенню антитіл. Для цитотоксичної дії Т-лімфоцитів на інфіковані клітини необхідний безпосередній контакт клітин, після чого відбувається зміна мембранної проникності клітини-мішені, її осмотичне набухання, розрив мембрани та вихід вмісту цитоплазми у навколишнє середовище.

Говорячи про противірусні антитіла, можна виділити кілька механізмів їх дії:

1. Антитіла здатні *нейтралізувати вірус*, що призводить до нездатності вірусу заражати здорові клітини.

2. Багато антитіл можуть працювати разом, викликаючи злипання вірусних частинок у процесі так званої *аглютинації*. Агглютиновані віруси є більш легкою мішенню для імунних клітин, ніж окремі вірусні частки.

3. Антитіла здатні використовувати ще один механізм знищення вірусу – це *фагоцитоз*. Антитіла зв'язуються з Fc-рецепторами на поверхні фагоцитуючих клітин і запускають механізм фагоцитозу, за допомогою якого клітина поглинає і знищує вірус.

4. Антитіла також можуть *активувати систему комплементу*, яка опсонізує та сприяє фагоцитозу вірусу. Комплемент може пошкоджувати оболонку (подвійний фосфоліпідний шар) присутню у деяких видів вірусу.

Ми розглянули принципові питання розвитку вірусу в клітинах господаря та противірусного імунітету та переходимо до опису вірусних вакцин. Як було показано раніше, *вірусні вакцини містять віруси – живі (атенуйовані) або інактивовані*.

Живі вірусні вакцини можуть стимулювати захист людини на все життя з мінімальною реактогенністю при використанні однієї або двох доз. Такі вакцини складаються з вірусів, які реплікуються в організмі господаря так само, як і природний вірус, тому *вакцина може стимулювати імунну реакцію, аналогічну до викликаної природною інфекцією*. Жива вакцина представлена атенуйованим вірусом, що виключає можливість захворювання імунізованої цією вакциною людини. Основним вимогам до даної вакцини є ступінь атенуації: жива вакцина повинна бути атенуйована в такій мірі, щоб патогенність була відсутня і вакцина була достатньо інфекційною для створення захисного імунітету. Живі вакцини зазвичай викликають як гуморальний імунітет (поява специфічних противірусних антитіл), так і клітинний (наприклад, цитотоксичні Т-лімфоцити).

Атенуйовані штами вірусів отримують шляхом інактивації гена, що відповідає за утворення фактора вірулентності, або за рахунок мутацій у генах, які неспецифічно знижують вірулентність. Застосування класичної стратегії для вірусів стало можливим у 50-ті роки ХХ століття, коли з'явилася можливість *вирощування вірусів у культурах клітин*. Технологія даного процесу зводиться до наступного: з інфікованого матеріалу людини виділяють дикий циркулюючий вірус і починають проводити пасажі вірусу на різних лабораторних культурах клітин, після проведення великої кількості пасажів вірусу домагаються ослаблення його патогенності. До таких вакцин можна віднести *вакцини проти вірусів кори, епідемічного паротиту, краснухи та поліомієліту*.

Інактивовані вірусні вакцини використовуються протягом десятиліть і зазвичай добре переносяться. Оскільки віруси при вирощуванні *in vitro*, як правило, виходять у культуральне середовище, то вірусні частинки збирають, відокремлюючи їх від культурального середовища. Великий розмір частинок вірусів у порівнянні з іншими макромолекулами середовища дозволяє легко їх відокремити використовуючи прості технології очищення на основі розподілу частинок за розмірами. До таких вакцин належать *віруси поліомієліту, грипу, сказу та японського енцефаліту*. У ряді випадків при інфікуванні клітин вірусом використовують лізис клітин з подальшим очищенням вірусних частинок. Як приклад можна навести вакцину проти гепатиту А – інактивація вірусу найчастіше проводиться додаванням формаліну. Інактивовані вірусні вакцини мають високу імуногенність. Для більшості інактивованих вакцин виявилось неможливим по-

вністю відтворити конформацію епітопів, наприклад, рекомбінантних поліпептидів, які мають високу протективну активність. Таким чином, класичні інактивовані вірусні вакцини, які характеризуються доведеною нешкідливістю і достатньою ефективністю, і сьогодні залишаються затребуваними у вакцинології.

Першим застосуванням *технології рекомбінантних ДНК при виробництві вакцин* було створення вакцини проти гепатиту В. Ген S, який кодує поверхневий білок – HBsAg, експресували в пекарських дріжджах *S. cerevisiae*, що приводило до утворення вірусоподібних частинок HBsAg розміром 22 нм всередині клітин. Отримувана з дріжджів вакцина використовується сьогодні у всьому світі у великих кількостях. Крім того, HBsAg експресували в трансгенних рослинах: листях тютюну та бульбах картоплі. Виділений і очищений з трансгенних рослин HBsAg проявляв імуногенність. Найчастіше великі частинки є більш імуногенними, ніж окремі поліпептиди. Крім того, як і у випадку з вірусоподібною частинкою HBsAg, частинки зазвичай стимулюють вироблення антитіл на конформаційні епітопи, тоді як ізольовані поверхневі поліпептиди можуть не стимулювати вироблення таких антитіл. Прикладом отримання вакцини, що містить вірусоподібні частинки, може бути вакцина *Gardasil®*, що являє собою вірусоподібні частинки високого ступеня очищення головного рекомбінантного капсидного поліпептиду (капсиду L1) білка вірусу папіломи людини (англ. – *Human PapillomaVirus*, HPV) чотирьох типів – 6, 11 16, 18. Як і ряд інших вакцин *Gardasil®* містить сполуки алюмінію (сульфат гідроксифосфату алюмінію) як ад'ювант. Використання цієї вакцини стимулює вироблення антитіл, що зв'язуються з віріонами. Вакцина *Gardasil®* виробництва *MerckSharp&DohmeB.V.* (США) успішно застосовується для попередження захворювань, спричинених вірусом папіломи: рак шийки матки та піхви, генітальних кондилом, передракових станів та ін. Рекомбінантні вірусоподібні частинки ротавірусів та парвовірусів також експресувалися у вигляді потенційних вакцин.

Самостійним питанням отримання вірусних вакцин є підбір культури клітин для вирощування вірусу. *Перещеплювані лінії клітин* є перспективним субстратом для виробництва профілактичних вірусних вакцин. Можливість використання системи посівних, добре атестованих, перевірених на відсутність спонтанних мутацій вірусних клітин, застосування реакторного культивування на мікроносіях у псевдосуспензії роблять цей

субстрат досить перспективним. Так, при отриманні вакцини на культурі клітин у 50 л реакторі можна отримати 100 000 доз вакцини, тоді як для отримання такої кількості доз на ембріонах курей необхідно 10 000 ембріонів. Окрім цього, така технологія гарантує безпечність від вірусів птахів – ретровірусів. Ця технологія менш трудомістка, більш економічна і меншою мірою схильна до контамінації. Існує ряд перещеплюваних клітинних ліній, рекомендованих для виробництва вакцин: MDCK (клітини нирок собаки), Vero (клітини нирки африканської зеленої мавпи), HEP-2 (епітеліоїдні клітини людини, дериват лінії HeLa), BHR-21 (клітини нирок сирійського хом'ячка), MDBK (клітини нирок великої рогатої худоби), MRC-5 (диплоїдні клітини людини) та ін.

4.2.2. Характеристика вірусів, проти яких спрямована дія вакцин

Для кращого розуміння принципів конструювання протівірусних вакцин, ми наводимо коротку характеристику вірусів людини, найбільш значущих для створення протівірусного імунітету.

Родина *Picornaviridae* – невеликі РНК-віруси розміром 20–30 нм. Капсид складається з 60 білкових субодиниць. Молекулярна маса – 8–9 МДа. РНК віріона має інфекційні властивості і є інформаційною для синтезу білків. Для всіх членів родини характерним є ікосаедричний капсид (рис. 4.10), який складається з 4 білків: VP1, 2, 3 і 4, в процесингу яких приймає участь кодована вірусом цистеїнова протеаза.

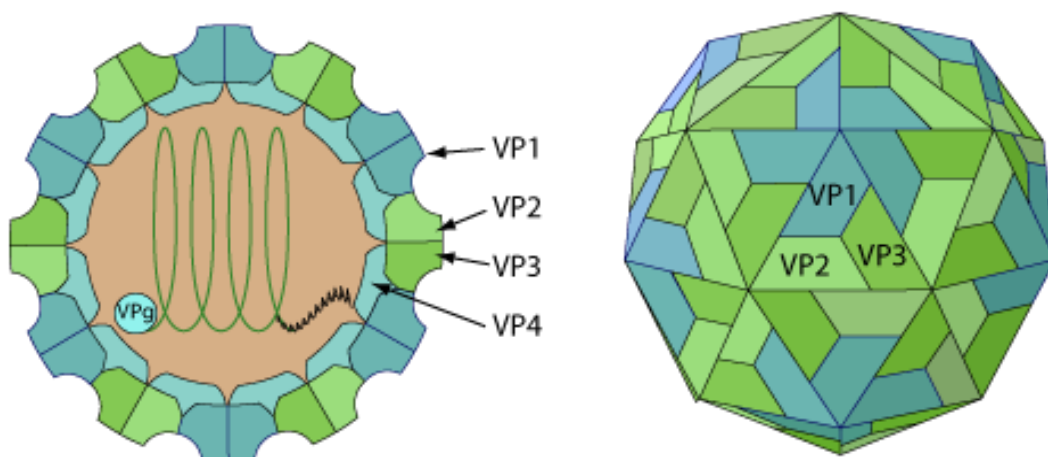


Рисунок 4.10 – Схема вірусної частинки родини *Picornaviridae*

На підставі щільності частинок, нуклеотидного складу РНК та стабільності вірусів при різних величинах рН виділяють 4 роди пікорнавірусів: *Enterovirus*, *Rhinovirus*, *Cardiovirus*, *Aphthovirus*.

Рід Enterovirus (ентеровіруси). Типовий представник – поліовірус людини 1. Плавуча густина в хлористому цезії становить 1,32–1,35 г/см³, константа седиментації – 150–165 S. Віруси стабільні при рН 3,0–10,0; інактивуються за температури 45–55 °С. Мають тенденцію розмножуватися в культурі клітин, які походять від природного господаря або близьких йому видів. Імунна система здатна розрізняти їх лише на стадії проникнення (через кишечник) та після лізису клітин. Ентеровіруси чутливі до антитіл. У більшості випадків ентероінфекція у людини обмежується шлунково-кишковим трактом та часто протікає без клінічних симптомів. До цього роду належать віруси поліомієліту 1, 2 і 3-го типу, що тягне за собою параліч внаслідок ураження передніх рогів спинного мозку.

Рід Rhinovirus (риновіруси). Типовий представник – риновірус людини (вірус звичайної застуди). Віруси нестабільні при рН нижче 5,0, плавуча густина в хлористому цезії – 1,38–1,41 г/см³. Викликають захворювання верхніх дихальних шляхів. Численні антигенно різні типи риновірусів роблять імунітет неефективним, а вакцинацію проблематичною.

Родина Togaviridae – сферичні віріони діаметром 40–70 нм з ізометричним капсидом, покритим щільно прилеглою ліпопротеїновою оболонкою, що містить ліпіди клітини-господаря та вірусоспецифічні білки. Оболонка має поверхневі вип'ячування (рис. 4.11). Віруси цієї родини термостабільні, стійкі у зоні рН 6,0–8,0. Геном представлений одноланцюговою лінійною РНК з молекулярною масою близько 4 МДа, яка може функціонувати як інформаційна РНК. До родини входять роди *Alphavirus*, *Flavivirus*, *Rubivirus*, *Pestivirus*.

Рід Rubivirus (рубівірус). Типовий представник – вірус краснухи («німецький кір») – розмір 60 нм, форма сферична, оболонка має поодинокі вип'ячування довжиною 6 нм з потовщеним кінцем, плавуча щільність у хлористому цезії 1,19 г/см³, коефіцієнт седиментації – 350±50 S. У складі віріонів виявлено фермент нейрамінідазу. Вірус має гемаглютинуючі властивості. Головну небезпеку становить здатність вірусу вражати плід у перші 4 місяці вагітності. Інфекція характеризується висипом, генералізованою лімфаденопатією. Рідко ускладненнями може бути енцефаліт та тромбоцитопенія. Живі ослаблені вакцини дають виражений імунітет.

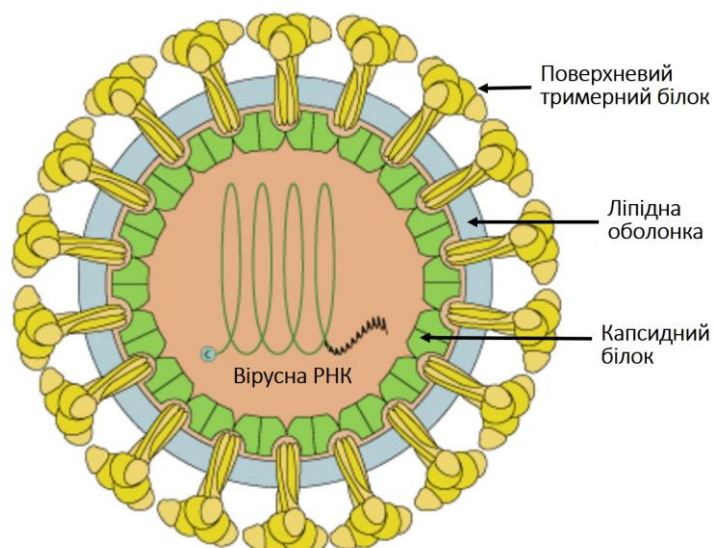


Рисунок 4.11 – Схема вірусної частинки родини *Togaviridae*

Родина *Paramyxoviridae* – сферичні віріони діаметром 150 нм і більше, покриті оболонкою, з характерними поверхневими виступами довжиною близько 8 нм (рис. 4.12). Геном – лінійна одноланцюгова РНК, не сегментований, має молекулярну масу 5–8 МДа. Реплікуються у цитоплазмі.

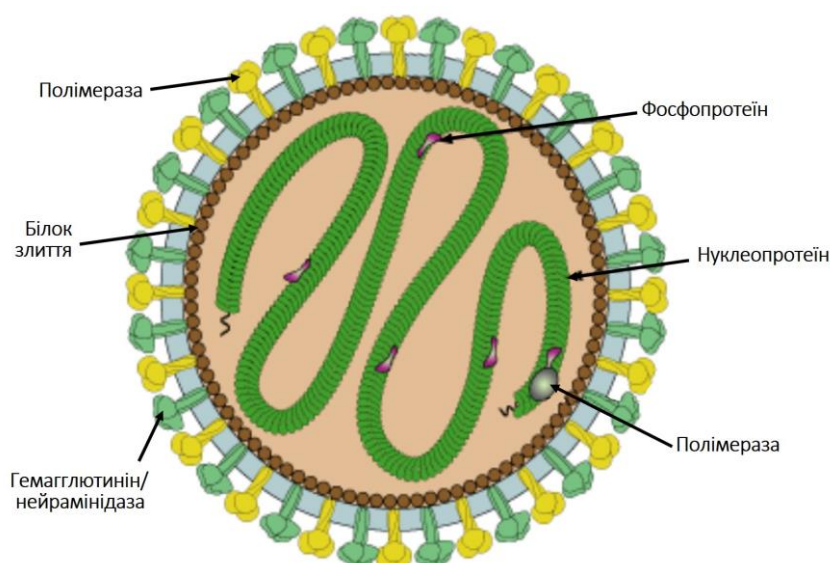


Рисунок 4.12 – Схема вірусної частинки родини *Paramyxoviridae*

Рід Paramyxovirus (параміксовіруси). Типовий представник – вірус епідемічного паротиту: молекулярна маса віріонів 500–700 МДа, коефіцієнт седиментації – 1000 S, плавуча щільність у хлористому цезії – 1,19 г/см³. Всі відомі штами вірусу належать до одного антигенного типу, що сприяє створенню вакцини з тривалим збереженням імунітету. Віріони містять гемагглютинін та нейрамінідазу. Вірус епідемічного паротиту вра-

жає яєчка і може спричинити аутоімунні захворювання. Жива вакцина проти епідемічного паротиту призводить до вираженого імунітету.

До міксовірусів також належать віруси грипу. Вірус грипу є класичним прикладом приєднання специфічним рецептором (гемагглютинін) та антигенного різноманіття. Адаптивний імунітет до грипу достатньо неефективний.

Рід Morbillivirus (морбілівіруси). Типовий представник – вірус кору. Віріони включають гемагглютинін, але не містять нейрамінідази. Усі члени роду мають загальний антиген, не стабільні при рН нижче 4,5. Реплікуються у цитоплазмі з утворенням цитоплазматичних та внутрішньоядерних включень. Віруси характеризуються широким тропізмом до лімфоретикулярної тканини та епітелію аліментарного та респіраторного трактів. Розмножуючись, вірус проникає у регіонарні лімфатичні вузли та кров. На зовнішній поверхні вірусу знаходиться Н-білок, за допомогою якого вірус кору прикріплюється до поверхні клітини, і Т-білок, що сприяє проникненню вірусу в клітину за рахунок злиття вірусної та клітинної мембран. Віруси викликають захворювання з характерним висипанням, респіраторними та кишковими симптомами. Вірус кору, інфікуючи лімфоцити, неспецифічно пригнічує імунну клітинну відповідь. Живі ослаблені вакцини дають виражений захисний ефект.

Родина Herpesviridae – віріони розміром 120–150 нм, вкриті ліпидовмісною оболонкою. Капсид утворений 162 капсомерами і має розміри 100–110 нм. (рис. 4.13) Генوم представлений лінійною дволанцюговою ДНК, яка має молекулярну масу 80–160 МДа. Розмноження вірусу починається в ядрі клітини та завершується збіркою глікопротеїноліпідної оболонки при проходженні нуклеокапсиду через ядерну мембрану в ендоплазматичний ретикулум.

Віруси родини *Herpesviridae* мають велике значення у інфекційній патології людини. Віруси герпесу 1-го та 2-го типів, вірус герпес зостер (оперізуєчий лишай) викликають у людини різні за проявом інфекції: від поверхневих уражень епітелію до захворювань типу лімфоматозу. Вірус герпесу людини 2-го типу вражає переважно геніталії та може передаватися статевим шляхом. Вірус Епштейна-Барра є збудником інфекційного мононуклеозу та може викликати розвиток пухлини (лімфома Беркїтта). Цитомегаловіруси людини викликають вади розвитку та є збудником опортуністичної інфекції при імуносупресії.

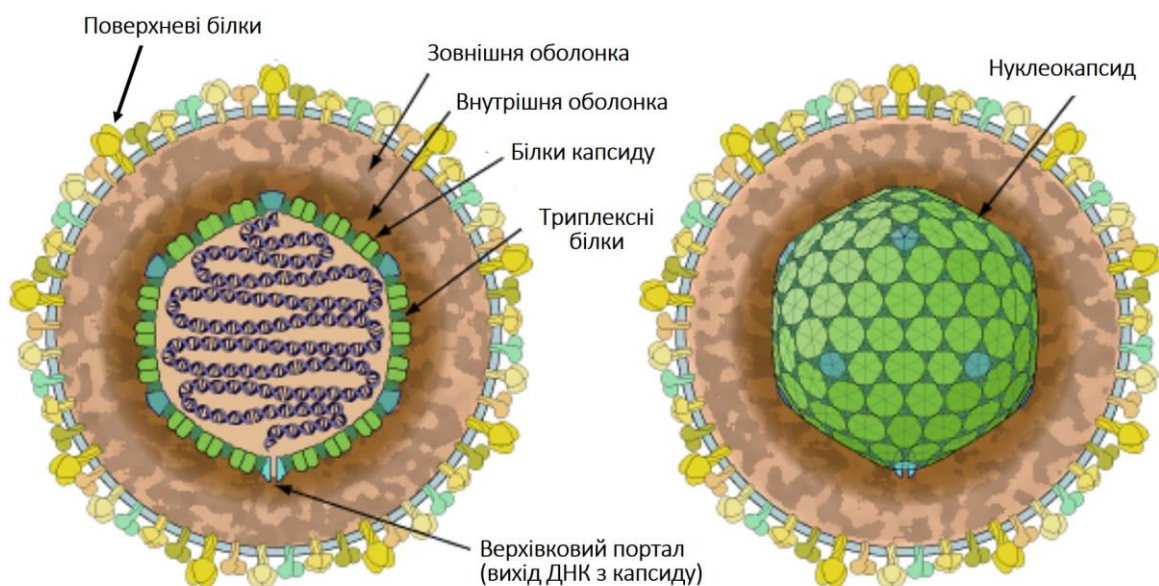


Рисунок 4.13 – Схема вірусної частинки родини *Herpesviridae*

Родина *Rhabdoviridae*, під *Lyssavirus*. Типовий представник – вірус вуличного сказу: великий РНК вірус, представлений кулеподібними віріонами із розмірами 70×170 нм. Генوم представлений молекулою одноланцюгової РНК з молекулярною масою від 3,5 до 4,5 МДа. Нуклеокапсид згорнутий по спіралі у порожнисту трубку із зовнішнім діаметром близько 50 нм (рис. 4.14). Поширюючись периферичними нервами, вражає центральну нервову систему. Зазвичай інфекція передається внаслідок укусу тварини або ослинення пошкодженої шкіри (собаки, лисиці, кішки, кажани та ін.). Для збереження життя потрібна негайна пасивна імунізація за рахунок введення антирабічної сироватки або специфічного антирабічного імуноглобуліну.

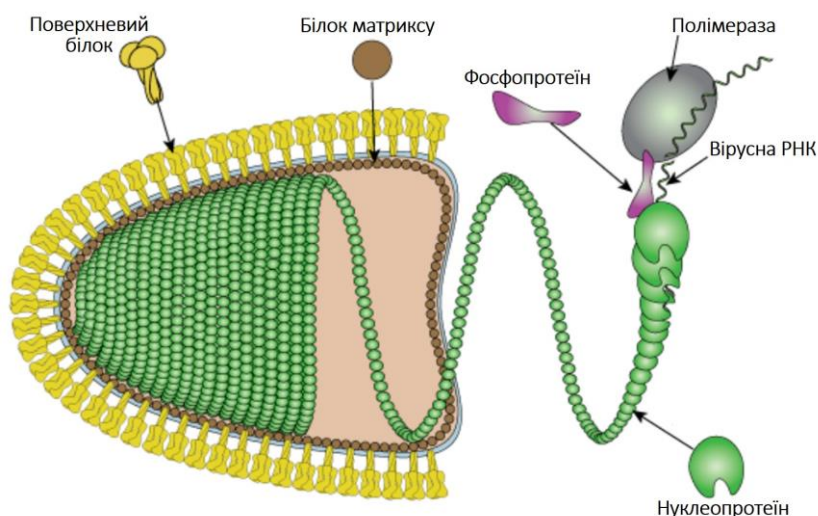


Рисунок 4.14 – Схема вірусної частинки родини *Rhabdoviridae*

Віруси гепатиту. Принаймні 3 типи вірусів можуть викликати гепатит: А (інфекційний гепатит; РНК-вірус родини *Picornaviridae*), В (сироватковий гепатит; ДНК-вірус родини *Hepadnaviridae*) і С (РНК-вірус родини *Flaviviridae*.). Хронічна інфекція, викликана вірусом гепатиту В, є причиною розвитку цирозу печінки, а також первинного раку печінки завдяки вбудовуванню ДНК вірусу в геном клітин та їхній подальшій злоякісній трансформації. Вірус гепатиту В містить три антигени: HBsAg, HBcAg, HBeAg. Вакцинація проти гепатиту В досить ефективна, і антитіла, які з'являються, нейтралізують вірус. Вірус гепатиту А стабільний до високих температур та зберігає активність при 60 °C протягом 12 год. Вірус гепатиту А (РНК-вмісний) передається від хворого або вірусоносія водним, харчовим або побутовим способом та викликає ураження печінки (хвороба Боткіна).

4.2.3. Вакцини для профілактики кору, краснухи та епідемічного паротиту

Інфекція кору, яка поширюється повітряно-крапельним шляхом, відома з давніх-давен. До появи ефективних вакцин фактично більшість дітей інфікувалися цим вірусом у ранньому віці. Для кору характерні висипання, кашель і висока температура, у ряді випадків кір може закінчуватися летально. Кір (англ. – *measles*) – дуже неприємне захворювання з двох причин: по-перше, вірус кору пригнічує імунітет, що призводить до різних опортуністичних інфекцій, і, по-друге, природна інфекція кору також включає в себе ризик виникнення достатньо рідкісних, але серйозних довгострокових ускладнень, у тому числі енцефаліту. Дослідження останніх років дозволили припустити, що вірус кору з'явився в VI столітті до н.е., що робить його найстарішим геномом РНК вірусу людини. Сьогодні, майже через 2600 років, люди залишаються єдиним природним господарем, який підтримує передачу вірусу кору.

Краснуха (англ. – *rubella*), відома також як корова краснуха або «німецький кір», в нормі є нетяжким захворюванням немовлят і дітей, що проходить без лікування, характеризується лихоманкою, висипом та артралгією або артритом тимчасового характеру. Інфекція краснухи у вагітних жінок легко передається плоду і може спричинити виснаження плода та тяжкі вроджені вади. Головну небезпеку становить здатність вірусу

вразати плід у перші 4 місяці вагітності. Цей вроджений синдром краснухи є основним фактором, що сприяє розробці та застосуванню вакцин проти краснухи.

Вірус епідемічного паротиту спричиняє паротит (англ. – *mumps*), наслідками якого є менінгіт та орхіт, рідше – важкі форми менінгіту та глухота. До появи вакцин паротит був основною причиною глухоти. Як це буває з багатьма «дитячими» вірусними захворюваннями, та сама інфекція у дорослих, які не перехворіли раніше, може протікати серйозніше і призвести до стерильності у чоловіків або маститу у жінок. Паротит є частою причиною міокардиту у дітей.

У всіх країнах світу кір, краснуха та епідемічний паротит займають значне місце у структурі інфекційної патології людини та залишаються реальною загрозою життю та здоров'ю людей. *Єдиним радикальним заходом у боротьбі з цими інфекціями є активна імунізація населення за допомогою живих вакцин.*

Активна імунізація проти кору має понад 250-річну історію. Починаючи з XVII століття, робилися спроби захистити дітей від кору, прищеплюючи їм вірулентний матеріал від хворого на кір. Вперше ця спроба була зроблена доктором Френсісом Хомом (Dr. Fr. Home) у 1759 році, який показав, що нанесення крові, отриманої з насічок шкіри хворого на кір, на скарифікаційні ділянки шкіри сприйнятливої дитини може спричинити легку форму кору. Розробка технології одержання вакцин проти кору йшла за двома напрямками: одержання інактивованих вакцин та створення авірулентних штамів для отримання живих вакцин.

У 1961 році В. Д. Соловйовим та Л. С. Лозовським запропонована цілісноклітинна інактивована вакцина проти кору. Щеплені цією вакциною діти хворіли у легшій формі, але вакцина загалом не попереджала кір у дітей.

У 1962 році Дж. Уореном запропоновано інактивовану очищену вакцину проти кору. Для виготовлення цієї вакцини використовували штам Едмонстон, вірусовмісну рідину інактивували формаліном, потім концентрували на гідроксиді або фосфаті алюмінію в 5–10 разів. Вакцина захищала від захворювання та знижувала реактогенність живої вакцини, якщо дітей вакцмнували за 1 місяць до введення живої вакцини. Однак через 3–4 роки було встановлено втрату антитіл проти вірусу кору у вакцинованих.

У 1964 році Е. Норбі запропонував інактивовану розщеплену вакцину на основі гемагглютинінів, виділених зі штаму Едмонстон шляхом обробки вірусомісного матеріалу твіном-80 і диетиловим ефіром, з подальшим очищенням, діалізом і концентрацією. Така вакцина мала антигенну активність у 3–4 рази вищу, ніж вакцина, інактивована формаліном та адсорбована на алюмінію фосфаті. Використання цієї вакцини показало, що через рік у вакцинованих осіб спостерігалось різке зниження титрів захисних антитіл.

В результаті досліджень було встановлено, що діти, щеплені інактивованими вакцинами, втрачали імунітет через короткі проміжки часу. Крім того, було з'ясовано, що у дітей, щеплених цими вакцинами, виявляються незвичайні реакції при природному зараженні на кір або введенні живих вакцин: висипання, еритема, інфільтрат у місці введення. Були випадки атипового кору з висипаннями та пневмонією, високою температурою, плевральними ексудатами. Припускали, що причиною цього може бути реакція, викликана взаємодією сироваткових антитіл проти вірусу кору з антигеном вірусу, що протікає по типу феномена Артюса. Тому було ухвалено рішення про припинення використання інактивованих вакцин.

Штами кору для живих вакцин. Методи отримання вакцинних штамів для приготування живих вакцин проти вірусних інфекцій зводяться до адаптації вірусів до нового господаря, тобто до нових незвичайних умов репродукції. Метод адаптації вірусу кору до різних тварин з метою отримання атенуйованих штамів не дав бажаних результатів: штами були високореактогенними або втрачали імуногенні властивості. Найбільш придатним для одержання вакцинних штамів вірусу кору виявився метод серійних пасажів у різних клітинних культурах. Штам Едмонстон був виділений в 1954 році в Бостоні (США) Томасом Піблсом від хворого на кір хлопчика, а потім розмножений в культурі клітин курячих ембріонів. Для розробки вакцини вірус був атенуйований за допомогою багаторазових пасажів у клітинах ембріонів курей до більш атенуйованого штаму Ендерс, який використовується в США з подальшим атенуюванням до штаму Шварц, що використовується у багатьох країнах світу. Пізніше було отримано ряд вакцинних штамів кору, що використовуються різними виробниками. Наприклад, штам Л-16 (Ленінград-16) був отриманий із вірусу, виділеного у 1960 році в Ленінграді від хворої на кір дитини, шляхом

пасирування у первинній культурі тканини нирок новонароджених морських свинок (21 пасаж), після чого він був додатково атенуований у культурі клітин фібробластів ембріона японських перепелів (3 пасажі). Згодом із вакцинного штаму Л-16 були отримані різні варіанти штаму шляхом адаптації до інших первинних клітинних культур: клітин нирок собаки, зелених мавп, диплоїдних клітин людини, клітин ембріонів японських перепелів.

В різних країнах найчастіше зустрічається штам Едмонстон (пройшов 6 пасажів на курячих ембріонах, 24 пасажі на нирках людини, 28 пасажів на амніоні людини), який став родоначальником ряду живих вакцин проти кору: Едмонстон А та Едмонстон В (пройшли додаткові 12 і 13 пасажів на курячих ембріонах), Шварц (85 пасажів на курячих ембріонах), Бекенгем (79 пасажів на курячих ембріонах), Мілованович (94 пасажі на курячих ембріонах), Едмонстон-Загреб (15 пасажів на нирках собаки та 19 на диплоїдних клітинах людини), Мортен (40 пасажів на курячих ембріонах). Температура культивування цих штамів також різна – від 30 до 37 °С. Аналіз послідовності залишків нуклеїнових кислот у генах основного вірусного антигена штаму Едмонстон та його похідних (Бекенгем, Шварц, Едмонстон-Загреб, Белград, Моратен, Ендерс) вказує на вкрай незначні відмінності між штамми, незважаючи на різні методи пасажування вірусу, які використовували для одержання цих штамів. Чотири інші вакцини, незалежно розроблені в Японії (САМ-70), Китаї (Чанчуть-47, Шанхай-191) та Росії (Л-16), мають великі відмінності, що можна було очікувати, враховуючи географічне розмаїття вихідних ізолятів.

Перша вакцина для профілактики кору була ліцензована в 1963 році.

Вакцинний штам повинен показувати відсутність нейропатогенності на мавпах і бути імуногенним та нешкідливим для людини. Ліофілізований вірус зберігається при -20 °С, а неліофілізований – при температурі не вище -60 °С.

Кожен робочий та посівний вірус перевіряється за *тестом на нейровірулентність*. Десять мавп, перевірених на відсутність антитіл до вірусу кору, заражаються відповідним вірусом. Тваринам вводять по 0,5 мл вірусної суспензії в зону таламуса. На 17–21 день мавп обстежують на наявність симптомів паралічу та інших неврологічних проявів. Потім на 21 день у мавп беруть кров на визначення антитіл до вірусу кору, проводять

анестезію та забій тварин з наступною аутопсією, здійснюють гістопатологічні дослідження для вивчення змін у центральній нервовій системі.

Штами краснухи для живих вакцин. Вірус краснухи був вперше ізолюваний вченими в 1962 році у США та атенуйований у клітинах африканської зеленої мавпи (AGMK) у 1966 році. Штам отримав назву HPV-77. Для виробництва вакцин широко використовуються 3 штами вірусу краснухи:

- HPV-77, отриманий від типової краснухи підлітка;
- Cendehill, виділений із сечі хворої на краснуху дитини;
- RA-27/3, отриманий з тканин-експлантатів плоду при медичному аборті внаслідок зараження матері вірусом краснухи.

Ці віруси були атенуйовані шляхом серійних пасажів у культурах клітин, і в даний час для їх розмноження використовуються клітини качиних ембріонів (штам HPV-77-DE5), клітини нирок кролика (штам Cendehill) і диплоїдні клітини людини (штам RA-27/3).

Штам RA-27/3 продукується у клітинах WI-38. Він був однією з перших атенуйованих людських вакцин, що виробляється у клітинах людини. Численні порівняльні клінічні випробування показали, що загалом RA-27/3 перевищував вакцини на основі штамів *Cendehill* та HPV-77 за показниками реактогенності та імуногенності при низьких дозах. RA-27/3 також має перевагу порівняно з вакциною HPV-77-DE5 через простоту виготовлення. Робота зі штамом RA-27/3 також краща з точки зору технологічності. Таким чином, RA-27/3 використовується у більшості країн, за винятком Японії, де використовуються японські штами: *Takahashi*, *Matsura*, TO-336, що вирощуються на фібробластах кролика або в клітинах первинної культури ембріонів фібробластів японської перепілки. В Японії надавали перевагу розробці місцевих ізолятів, а не американським або європейським штамам, оскільки існувала думка, що віруси краснухи, які циркулюють у Японії, менш тератогенні.

Сьогодні фахівці мають інформацію про повну послідовність штаму RA-27/3 та порівняльну послідовність генів E1 японських та західних вакцин, а також ізолятів дикого типу. Краснуха відносно гомогенна на нуклеотидному рівні, з варіаціями від штаму до штаму приблизно 2 %. Атенуація досягалася пасажуванням в клітинах людини (RA-27/3), клітинах нирок кролика (*Cendehill*), AGMK і клітинах качинового ембріона (HPV-77 DE5) та в різних поєднаннях AGMK, клітинах нирок корів, свиней, куря-

чих ембріонів. На думку вчених, сучасні технології секвенування, схеми створення інфекційних клонів і сайт-специфічний мутагенез принципово можуть використовуватися для створення вакцинних штамів, які логічно повинні втілювати мінімальний генотип, необхідний для атенуації, починаючи з ізоляту дикого. Однак у цьому випадку важко було б обґрунтувати необхідність кінцевого тестування на людях, тому ми маємо задовольнитись тим, що ми маємо.

Вакцинний штам краснухи повинен показувати відсутність нейрпатогенності на мавпах та бути імуногенним та нешкідливим для людини. Вірус ліофілізований зберігається за температури мінус 20 °С, а неліофілізований – не вище мінус 60 °С.

Тест на нейровірулентність. Кожен робочий та посівний вірус перевіряється за цим тестом. Десять мавп, перевірених на відсутність антитіл до вірусу краснухи, заражаються відповідним вірусом. Тварини вводять по 0,5 мл вірусної суспензії в зону таламуса. На 17–21-й день мавпи мають бути обстежені на наявність симптомів паралічу та інших неврологічних проявів. Потім на 21 день у мавп беруть кров на визначення антитіл до вірусу краснухи, проводять анестезію та забій тварин з наступною аутопсією; здійснюють гістопатологічні дослідження для вивчення змін у центральній нервовій системі.

Перша вакцина проти краснухи була ліцензована у 1969 році.

Вакцинний штам повинен показувати відсутність нейрпатогенності на мавпах і бути імуногенним та нешкідливим для людини. Кожен робочий та посівний вірус перевіряється за тестом на нейровірулентність, аналогічно як описано для вірусу кору. Ліофілізований вірус зберігається при -20 °С, а неліофілізований – при температурі не вище -60 °С.

Штами епідемічного паротиту для живих вакцин. Для виробництва вакцин широко використовується ряд штамів вірусу епідемічного паротиту:

➤ *Jeryl Lynn*, отриманий на клітинах курячих ембріонів (1967 р.): культуру для цього штаму було відібрано у 1963 році з горла 5-річної дівчинки, вірус пасажували 12, 17 і 27 разів на курячих ембріонах. Вірус після 17 пасажів виявляв необхідну імуногенність та відсутність патогенності. Важливим для розуміння питань атенуації вірусів є той факт, що 12 пасажів призводили до інфікування паротитом, а вірус, що пройшов 27 пасажів, не мав потрібної імуногенності;

➤ *Ленінград-3*, отриманий на клітинах первинної культури фібробластів ембріонів японської перепілки (1974 р.), мав високу імуногенність і ефективність;

➤ *L-Zagreb*, отриманий на первинній культурі курячих ембріонів (1976);

➤ *Rubini*, ізольований із сечі хлопчика, який хворів на паротит, пасажували на диплоїдних клітинах людини (1985 р.). За даними ряду дослідників, вакцини, до складу яких входить штам *Rubini*, мають недостатню ефективність, що може бути пов'язане з його надмірною атенуацією.

Ці віруси були атенуєвані шляхом серійних пасажів у культурах клітин.

Крім того, в Японії активно використовуються 5 незалежних штамів: *Urabe*, *Hoshino*, *Torii*, *Miyahara*, *NK-M46*, що вирощуються в клітинах первинної культури фібробластів ембріонів японської перепілки або на клітинах курячих ембріонів. Наприкінці 1980-х та на початку 1990-х років звіти про застосування в Канаді та Великобританії штаму *Urabe* інформували про пов'язаний з вакциною асептичний менінгіт. Це, зрештою, призвело до відкликання з ринку вакцин, що містять штам *Urabe*, в Європі та Канаді, хоча ці вакцини залишаються у продажу в інших частинах світу.

Вакцинний штам повинен показувати відсутність нейропатогенності на мавпах і бути імуногенним та нешкідливим для людини. Кожен робочий та посівний вірус перевіряється за тестом на нейровірулентність, аналогічно як описано для вірусу кору. Ліофілізований вірус зберігається при -20°C , а неліофілізований – при температурі не вище -60°C .

Штами, які використовуються для виробництва вакцин, повинні бути ідентифіковані на підставі документа, в якому містяться відомості про їх походження, характеристики в момент виділення, а також докладні дані про результати всіх тестів, які регулярно проводяться для підтвердження властивих цим штамам характеристик.

Культури клітин для виробництва живих вірусних вакцин. Культура клітин для кожної з вакцин має бути дозволена національним органом контролю. Для виробництва вірусних вакцин використовують різні клітинні культури:

❖ ембріонів птахів, одержаних з яєць, вільних від специфічних патогенів та з благополучних господарств. Ці господарства повинні проходити постійний контроль на наявність інфекційних агентів, характерних

для птахів (мікобактерій, вірусу хвороби Ньюкасла, пташиних вірусів – енцефаломієліту, інфекційного лоринготрахеїту, аденовірусу, лейкозу, грипу, мікоплазм, сальмонел та ін.). На них отримують вакцини проти кору та епідемічного паротиту;

❖ людських диплоїдних клітин – проходить контроль на наявність ретровірусів, нуклеїнових кислот вірусів гепатиту В та С, вірусу імунодефіциту людини, клітини мають бути вільні від туморогенних агентів, обов'язковим є контроль хромосомної характеристики, контроль на тваринах різних видів: мишах, морських свинках, кроликах. На них отримують вакцини проти кору, краснухи та епідемічного паротиту;

❖ нирок собак 6-тижневого віку – проходить контроль на наявність вірусів сказу та гепатиту, лістеріозу, лептоспірозу, сальмонельозу, бруцельозу, туберкульозу, мікоплазмозу, токсоплазмозу та інших інфекційних агентів. На них одержують вакцину проти кору.

❖ нирок кроликів – проходить контроль на наявність кокцидозу, міксоматозу, мікобактерій, лептоспірозу, токсоплазмозу та інших інфекційних агентів. На них одержують вакцину проти краснухи.

Відповідно до вимог ВООЗ, до культури клітин висувають такі вимоги: клітини повинні походити з нормальних тканин, причому перевага надається тканинам плоду через меншу ймовірність їх контамінації; під час культивування клітини не повинні значно відхилятися від нормального каріотипу та в процесі росту не повинні виявляти жодних морфологічних аномалій; клітини повинні бути вільні від контамінантів, які контролюються.

Так, наприклад, для одержання паротитної вакцини культивування штаму епідемічного паротиту Л-3 проводять у первинній культурі фібробластів ембріонів японських перепелів. У цій же культурі проводиться культивування штаму вірусу кору Л-16 для отримання вакцини проти кору.

При отриманні комбінованих вакцин проти краснухи, кору та епідемічного паротиту (для вакцини MMR) використовується культура клітин курячих ембріонів для вирощування вірусу кору (штам *Schwarz*) та вірусу епідемічного паротиту (штам RIT 4385 – похідне від штаму *Jeryl Lynn*), для вирощування вірусу краснухи *Wistar RA-27/3* використовується культура диплоїдних клітин людини WI-38.

При отриманні вакцини *Priorix* використовується культура тканини курячого ембріона для вирощування вірусу кору (штам *Schwarz*) та епіде-

мічного паротиту (штам RIT 4385), для вирощування вірусу краснухи (штам *Wistar RA-27/3*) використовується культура диплоїдних клітин людини MRC-5.

Для отримання вакцини проти кору запропоновано використовувати культуру клітин диплоїдного штаму Л-68, отриману з легень 11-денного ембріона людини. Культура відрізняється стабільними морфологічними та каріологічними властивостями, не містить мікоплазм, сторонніх вірусів, мікобактерій, нетуморогенна і, що дуже важливо, сприйнятлива до вірусу кору. Контроль за туморогенністю є обов'язковим і вкрай необхідним, тому що в процесі багаторазового культивування деякі з клітин можуть ставати раковими. Наприклад, при перевірці клітин *Vero* на туморогенність у безволосих мишей та на клітинній культурі м'язової тканини людини виявлено значний туморогенний потенціал зі збільшенням кількості пасажів. Починаючи з 232 пасажу клітини викликали утворення вузлів у всіх досліджуваних мишей. Встановлено норму 100 пкг гетерогенної ДНК на дозу вакцини. Повна безпечність вимагає абсолютної відсутності ДНК у препаратах вакцин, що, у свою чергу, диктує постійне вдосконалення технологічних процесів фільтрації та очищення у процесі отримання вакцинних препаратів.

Поживні середовища. Поживні середовища для приготування вірусних вакцин включають чотири складові: воду, неорганічні солі, сироваткові білки та низькомолекулярні синтетичні речовини.

Вода. При отриманні води для вакцин (води для ін'єкцій) можуть бути реалізовані методи обробки води: деіонізація, зворотний осмос, мікрофільтрація, адсорбція органічних домішок, фільтрація на вуглецевому фільтрі, ультрафіолетова обробка (окислення). Контроль одержаної води здійснюють відповідно до вимог національних фармакопей.

Неорганічні солі створюють необхідний осмотичний тиск (наприклад, хлорид натрію) та буферну ємність середовища. Були запропоновані сольові розчини Хенкса та Ерла. Найчастіше ці розчини випускаються у вигляді 10-кратних концентратів без бікарбонату натрію. Ці розчини придатні після розведення водою для ін'єкцій, термічної стерилізації з подальшим додаванням стерильних розчинів глюкози та бікарбонату натрію. Фосфати і бікарбонат натрію в середовищі підтримують рН 7,2–7,5, що вкрай необхідно, враховуючи можливість підкислення поживного середовища культурами клітин у процесі росту. Важливим є певний вміст CO₂ у

повітрі (зазвичай близько 5 %) для підтримки разом із бікарбонатом оптимальної величини рН.

Низькомолекулярні синтетичні речовини – це необхідні амінокислоти, глюкоза та інші цукри, вітаміни тощо. Значний внесок у розробку вірусологічних поживних середовищ зробив Гаррі Ігл (Harry Eagle), який дослідив потреби культивованих клітин у солях, амінокислотах, вуглеводах і на підставі отриманої інформації конструював поживні середовища – середовища Ігла.

Сироватка є компонентом під час виробництва вірусних вакцин, що забезпечує віруси факторами посту. Сироватка має бути стерильною (вільною від бактерій, грибів та мікоплазм). Обов'язковим є контроль на наявність вірусів лейкозу великої рогатої худоби та відсутність енцефалопатії. Крім того, сироватка повинна бути вільна від інгібіторів культивованих вірусів (кору, краснухи та епідемічного паротиту). Заборонено використовувати сироватку людини. Для виробництва вірусних вакцин найчастіше використовують фетальну телячу сироватку, яку отримують з крові плода великої рогатої худоби через закриту (стерильну) систему збору на бойні. Фетальна теляча сироватка є найчастіше використовуваною сироватковою добавкою для клітинних культур еукаріот *in vitro*, що пов'язано з низьким рівнем антитіл і наявністю в ній багатьох необхідних факторів росту. Саме щодо використання цієї сироватки існують численні заперечення. Встановлено, що фетальна теляча сироватка може бути контамінована вірусними агентами. Найвідомішим є пестивірус, так званий вірус бичачої діареї. Тому кожна партія сироватки має пройти контроль на відсутність цього вірусу. Було виявлено, що 13 % вакцин проти стрептокока, поліовірусу та вакцини MMR були позитивними на РНК-пестивірус. Також встановлено, що сироваткові антитіла проти вірусу бичачої діареї були виявлені у 30 % людей, які раніше не мали контакту з інфікованими тваринами. Необхідно також зазначити, що на сьогодні немає свідчень про можливе зараження цим вірусом. Водночас ряд вчених, вказуючи на мінімальний розмір вірусу, вважає, що не можна бути на 100 % впевненим у його видаленні фільтрацією.

У табл. 4.8 наведені середовища, які використовуються найчастіше.

Таблиця 4.8 – Поживні середовища та розчини для культур клітин

Назва середовища	Особливості складу та використання середовища
Середовище 199	Багатокомпонентне середовище, щироко використовуваче для отримання вакцин проти поліомієліту, кору, епідемічного паротиту. До складу середовища входять амінокислоти (L-аланін, L-аргінін, L-цистеїн, L-глутамін, L-цистеїн, L-глутамінова кислота, L-гліцин, L-лізин, L-триптофан та ін.); вітаміни (біотин, холін-хлорид, фолієва кислота, кальцій пантетонат, рибофлавін та ін.); неорганічні солі ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$, MgSO_4 , KCl , NaCl , NaHCO_3 та ін.); твін 80, урацил, феноловий червоний та ін. При культивуванні клітин додають сироваткові компоненти від 2 до 10 %
Базове середовище Ігла, ВМЕ	Середовище містить зменшену кількість амінокислот та вітамінів, не містить гліцин та серин, призначене для культивування різних типів клітин
Мінімальне середовище Ігла, MEM	Порівняно з ВМЕ збільшено вміст аргініну у 5 разів, гістидину у 4 рази, інших амінокислот, крім глутаміну, у 2 рази. Не містить біотин. Використовується для культивування більшості перещеплюваних ліній з підвищеними вимогами до поживного середовища, дозволяє підтримувати культури тривалий час без додаткового підживлення. Використовується для культивування клітин під час виробництва вірусних вакцин, наприклад, проти краснухи
Мінімальне середовище Ігла в модифікації Дюльбеко, DMEM	Порівняно з ВМЕ збільшено вміст аргініну у 5 разів, глутаміну – у 2 рази, інших вітамінів та амінокислот – у 4 рази, не містить гліцин і серин
Середовище RPMI 1640	Синтетичне середовище при збагаченні сироваткою є прийнятним для культивування культур клітин
Середовище Лейбо-віца L 15	Глюкоза замінена галактозою. У систему буфера не додано бікарбонат натрію
Мінімальне середовище Ігла для суспензійних культур, MEMS	Порівняно з MEM, вміст MgSO_4 збільшено в 10 разів, відсутній CaCl_2 , збільшений вміст NaH_2PO_4

Закінчення табл. 4.8

Назва середовища	Особливості складу та використання середовища
Розчин Версена	Прозорий розчин без опалесценції та осаду, стерильний, рН 7,3–7,7; включає 0,2 г/л ЕДТА, 0,2 г/л KH_2PO_4 , 0,2 г/л KCl , 2,89 г/л $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 8 г/л NaCl , вода деіонізована. Використовується відділення клітин від субстрату та одна від одної

Проводиться контроль трипсину на відсутність вірусної контамінації, він не повинен містити мікоплазм, бактерій та грибів.

Вирощування клітинних культур під час виробництва вірусних вакцинних препаратів. В даний час при виробництві промислових вірусних вакцин використовують різні способи репродукції вірусів. Хронологічно їх використовували так:

1. *Стаціонарний спосіб* (формування моношару клітинних культур на скляних матрацах ємністю 1,0–2,0 л, заповнених поживним середовищем на 10–15 % та поміщених у термостат при відповідній температурі).

2. *Ролерний спосіб* (формування моношару клітинних культур відбувається по всій циліндричній поверхні пляшок, заповнених поживним середовищем на 10 % від об'єму та розміщених на спеціальні стелажі з можливістю обертання бутлів зі швидкістю 10–12 об/хв).

Устаткування для виробництва ролерним способом випускається рядом фірм. Одним з лідерів є *New Brunswick Scientific* (США), з моделями шейкерних платформ *Innova*. Так, модель 5050/5051 є універсальною платформою з нержавіючої сталі, з регульованими полицями (3–4), з діапазоном температури 4–60 °С, швидкістю обертання 5–400 об/хв, об'ємом середовища 1–20 л, з регулюванням парціального тиску кисню.

Близьким до ролерного є метод *вирощування клітинних культур у моношарі* в апаратах, що складаються з великої кількості скляних трубок (довжиною 2000 мм, внутрішнім діаметром 19 мм, зовнішнім діаметром 22 мм, з корисною площею 34 м²), поміщених в циліндр (довжина 2040 мм, діаметр 530 мм). Поживне середовище вноситься в апарат окремо або разом із клітинною суспензією, при цьому клітини ростуть як на внутрішній, так на зовнішній поверхні скла. рН середовища підтримується в межах 7,2–7,4 за допомогою подачі газової суміші з повітря і вуглекислого газу. У такому апараті об'єм середовища становить 100 л, а об'єм вірус-

вмісної рілини – 60 л, що забезпечує високий вихід продукту та зниження собівартості продукції.

3. *Суспензійний спосіб* (клітини перещеплюваних ліній культивуються у зваженому стані, не прикріплюючись до стінок культуральної ємності). Суспензійні культури готують із моношарових клітинних культур, які змивають зі скла розчином Версена у присутності 0,25 %-вого розчину трипсину. Клітини відокремлюють центрифугуванням, суспендують у свіжому середовищі та поміщають суспензію у культуральні ємності або біореактори, де вирощують при постійному та досить інтенсивному перемішуванні – 300–350 об/хв.

Фірма *CD Medical* (США) розробила систему для вирощування культури клітин тварин з використанням порожнистих волокон, в яких клітини, які ростуть, відокремлені напівпроникною мембраною порожнистих волокон від поживного середовища. Через капіляри надходить поживне середовище, а у протилежному напрямку виділяються продукти метаболізму. Порівняно з флаконами на апаратах даної конструкції можна підвищити густину культури в 50 разів.

Фірма *Akzo GMBH* (Німеччина) розробила аналогічний біореактор з використанням мембранних мікрокапілярів. Клітини, які ростуть, адгезовані на твердому субстраті, що знаходиться в екстракапілярному просторі, а поверхня капілярів залишається вільною для масопереносу. Носієм є тканинний матеріал, в якому порожнисті волокна є субстратом для адгезії клітин. Продукти метаболізму клітин дифундують через стінки капілярів, а продукти з високою молекулярною масою залишаються у поживному середовищі і можуть бути видалені вимиванням під тиском лактози, холіну, метанолу, пероксидів та інших продуктів культивування.

4. *Спосіб із використанням мікроносіїв* передбачає використання дрібних твердих частинок (мікроносіїв), на яких клітини ростуть у формі моношару. Використання мікроносіїв дає клітинам, які мають адгезивні властивості, всі переваги великомасштабних суспензійних культур. Використання мікроносіїв призводить до високої щільності клітин на одиницю об'єму та збільшує площу поверхні. Ми зупинимося на кількох видах таких мікроносіїв, розроблених *Pharmacia Biotech* (Швеція):

❖ *Cytodex 1 і 2* – мікроносії, що являє собою мікропористі прозорі намістинки з поперечно зшитого декстрану. На їх сферичній поверхні знаходяться позитивно заряджені групи. Діаметр носія – близько 200 мкм,

густина – 1,04 г/мл. Густина мікроносіїв повинна бути близька до густини поживного середовища, що забезпечує краще суспедування. Структура носія дозволяє забезпечити харчування клітин з усіх боків та полегшує спостереження за процесом культивування, зараженням культури вірусом та збиранням клітин. *Cytodex* попередньо поміщають для набухання у фосфатний буфер з рН 7,5–8,0 при обережному перемішуванні (30–50 об/хв), а потім стерилізують при 121 °С протягом 20 хв. Використовується для виробництва вірусних вакцин та рекомбінантних білків як у біореакторах, так і у традиційних стаціонарних моношарах та ролерних культурах клітин.

❖ *Cytodex 3* – мікроносіїв, що являє собою намистинки з желатиновим покриттям.

❖ *Cytopore 1 і 2* – мікроносіїв, що являє собою частинки гідрофільної обмінної целюлози (DEAE) з діаметром 230 мкм, густиною 1,03 г/мл, діаметром пор 30 мкм. Стерилізація відбувається при 121 °С протягом 20 хв. Використовується для одержання культури клітин різного виду під час виробництва гібридів, рекомбінантних білків, а також при вирощуванні деяких видів бактерій.

❖ *Cytoline 1 та 2* – мікроносіїв, матрикс якого отриманий з поліетилену та кремнезему. *Cytoline 1* має густину 1,3 г/мл, *Cytoline 2* – 1,03 г/мл, розмір пор варіює від 10 до 400 мкм, величина частинок – від 2 до 2,5 мм. Використовуються для вирощування культур різних клітин, гібридів та бактерій у біореакторах.

Добре зарекомендували себе й інші мікроносії: DEAE-декстран *Superbeads* (США), *Microdex* (Канада), *Dormacell* (Німеччина), поліакриламід-*Biocarries* (США), полістирол-*Cytopheres* (США), *Biosilon* (Данія), скло з пластиковим покриттям – *Bioglas* (США), *Vetreglas* (США), DEAE-целюлоза DE 52/53 (США), Pro-F102 L, P plus-102 L на основі полістиролу (*Hyclone*, США).

До мікроносіїв висувають ряд вимог: вони мають бути нетоксичні як для клітин, так і для вірусів; матриця під час культивування має бути стабільною при зіткненні частинок одна з одною; мікроносії мають витримувати термічну обробку; в ідеалі повинні повторно використовуватися. Найважливішою вимогою до мікроносіїв є високий ступінь прикріплення клітин до поверхні мікроносія та відсутність «зісковзування» клітин з час-

тинок. Стабільність прикріплення дозволяє отримати з біореактора більше 1 вірусомісного змиву.

Враховуючи, що в цьому розділі розглядаються вірусні вакцини, зупинимося лише на мікроносіях *Cytodex®*. При такому способі культивування клітин у біореакторі на мікроносії кількість клітин збільшується у 10–15 разів протягом 5 діб. Суспензія культури та мікроносій піддають центрифугуванню, середовище видаляють, до культури клітин додають 0,25 %-вий розчин трипсину, суспензію перемішують при 37 °С з метою відділення культури клітин від мікроносія. При використанні мікроносіїв легко здійснювати моніторинг та контроль різних параметрів: рН, концентрації поживних речовин, вміст кисню, вуглекислого газу тощо. Відділяти продукти від мікроносіїв також досить просто.

До біореакторів для вирощування культури клітин та вірусів висувають такі вимоги:

- ✓ реактор має бути забезпечений системами автоматичного контролю та регулювання основних параметрів культивування з використанням мікропроцесорних систем, перетворювачем сигналів від вимірювальних електродів, газоаналізаторами для вимірювання O₂, CO₂, рН, температури, рCO₂, рO₂;
- ✓ опціями, які дозволяють здійснювати подачу суспензії клітин, суспензії мікроносіїв та вірусів;
- ✓ системою для відбору проб у процесі культивування;
- ✓ фільтрами з порами 0,2 мкм для подачі поживного середовища, розчинів бікарбонату натрію, цукрів та ін.;
- ✓ фільтрами для подачі пари, повітря, азоту, вуглекислого газу та ін.;
- ✓ системою охолодження реактора та підтримання оптимальної температури культивування;
- ✓ сенсорами розчиненого кисню;
- ✓ системою перемішування з регулюванням кількості обертів;
- ✓ датчиком для визначення рівня піноутворення та система піногашення;
- ✓ системами санітарної обробки та стерилізації реактора (SIP – *sterilization in place*);
- ✓ біохімічним аналізатором для визначення компонентів у процесі культивування клітин: глюкози, глютаміну, сахарози, лактози, галактози, холіну, метанолу, перекису водню та ін.;

- ✓ конструктивні особливості повинні гарантувати асептичне виробництво протягом усього часу культивування;
- ✓ при виробництві вакцин важливим є визначення рівня поживних речовин та накопичення токсичних метаболітів.

Біореактори об'ємом від 20 до 1000 л випускаються рядом фірм. Останнім часом для культивування клітин були створені та більші зразки біореакторів з максимальним об'ємом 8000 л.

Завершальною технологічною стадією виробництва живих вірусних вакцин є процес ліофілізації, який докладно розглянуто у попередніх розділах.

Технологія одержання живих вірусних вакцин. Одержання культури клітин проводять у біореакторах, зазвичай використовуючи три генерації клітин. Для виробництва вакцин використовують культуру клітин, найбільш придатну для кожного вірусу – кору, епідемічного паротиту та краснухи.

Під час виготовлення вірусних вакцин застосовують систему посівних серій вірусу. Посівний вірус має повністю відповідати вимогам до виробничого штаму.

У випадку вирощування культури клітин у біореакторі культивування відбувається на мікроносіях (2,0–6,0 г/л) при температурі, оптимальній для кожного виду клітин (зазвичай 35–37 °C), величині рН 7,2–7,4, у присутності глюкози на відповідному поживному середовищі, наприклад, середовищі 199. Коли величина рН починає знижуватися, її коригують додаванням стерильного розчину бікарбонату натрію. Вирощування проводиться протягом 2–7 діб залежно від виду культури клітин та вимог виробника вакцини. При вирощуванні клітин проводиться рециркуляція середовища зі швидкістю 1–5 л/хв. Потім клітини промивають буферним розчином з рН 7,2–7,4, наприклад, фосфатним буфером, і обробляють 0,05–0,25 % розчином трипсину в 0,53 мМ ЕДТА протягом 10–30 хв. Потім проводять ще кілька пасажів культури клітин, кількість яких залежить від використовуваної культури, виду вакцини та технологічної схеми виробника. Умови проведення наступних пасажів є аналогічними. Можливе додаткове додавання мікроносіїв. Сумарна тривалість культивування клітинних культур може становити 2–3 тижні.

Всі пасажі культури клітин супроводжуються тестуванням до та після початку культивування за такими показниками: стерильність, концентрація клітин, мікроскопія клітин, рН.

Культивування вірусу проводять у біореакторі при додаванні до клітин останнього пасажу штамів вірусу і мікроносіїв. У день інокуляції посівною серією вірусу кожену клітинну культуру досліджують на дегенерацію, спричинену інфекційним агентом. Якщо при цьому дослідженні спостерігається присутність будь-якого стороннього агента, всі клітини даних культур заборонено використовувати для виробництва вакцини. Культивування проводять протягом 3–4 діб при 33,5–35,0 °C. При вирощуванні вірусу контролюють рН та стерильність. Після завершення вирощування проводиться визначення стерильності, сторонніх агентів, титру вірусів.

Відділення вірусу від дебрису клітин здійснюють шляхом стерилізуючої фільтрації через каскад мембран з розміром пор 1,2; 0,8; 0,45 та 0,22 мкм. Якщо для росту клітинних культур використовується сироватка тварин, то перед збиранням вірусу необхідно замінити середовище на культуральну рідину, яка не містить сироватку. Перед заміною середовища на культуральну рідину клітинний моношар слід промити або культуральним середовищем, або буферним фосфатним розчином з рН 7,2–7,4. Концентрація альбуміну сироватки тварин у кінцевому препараті не повинна перевищувати 50 нг на одну дозу вакцини. У деяких країнах проводяться контрольні випробування на наявність залишкової кількості сироватки тварин у готовому препараті.

За необхідності отриманий фільтрат вірусу піддають ультрафільтрації з метою очищення та концентрації. Ультрафільтрацію проводять на мембранах з порогом відсікання 100 або 300 кДа, при цьому забезпечується не тільки концентрація вірусу, а й очищення від баластних речовин, включаючи видалення сироваткових компонентів. Збір вірусомісної рідини повинен проводитися за допомогою методу, схваленого національним органом контролю. Можуть здійснюватися багаторазові збори вірусу і при цьому разові збори до об'єднання в загальний пул зберігаються при температурі 4 °C.

При виробництві вірусних вакцин може використовуватися зручний та надійний метод для ізоляції та очищення клітин вірусів – центрифугування клітинних суспензій у градієнті щільності, з використанням для цього ряду спеціальних компонентів, наприклад, Percoll® (частинки коло-

їдного кремнезему діаметром 15–30 нм, вкриті полівінілпіролідом) або сахарози в концентрації 10–60 %. При цьому можна розділяти клітини у седиментаційному градієнті за густиною або за розмірами на центрифугі типу *Beckman Coulter* (Німеччина) з кутовим ротором 50,2 Ті при 45–50 тис.об/хв (нормальне зональне центрифугування). Вірус зазвичай збирають із зон 35–40 % сахарози і концентрують на центрифугі, наприклад, типу *Beckman* з ротором SW-28 при 25 тис. об/хв. Усі стадії центрифугування проводять при температурі 4 °С.

До отриманого концентрату вірусу додають кріопротектори, визначені для кожної вірусної вакцини, розливають дозовано в первинну упаковку і піддають заморожуванню з подальшою ліофілізацією.

Отримання вірусних вакцин можливе не лише з використанням біореакторів, а й у скляних ємностях типу матраців об'ємом 1–5 л. Розглянемо цей варіант на прикладі отримання вакцини проти кору.

Для приготування клітинних культур використовують ембріони японських перепелів 9–10-денного віку. Напередодні або в день трипсинізації тканини яйця переглядають за допомогою овоскопу в затемненому приміщенні та відбирають придатні для виробництва вакцини проти кору (на підставі відсутності зовнішніх пошкоджень, наявності рухливості ембріона та добре розвиненої судинної системи). Трипсинізацію тканини проводять за загальноприйнятою методикою.

Об'єм клітинної суспензії доводять до необхідного стандарту, використовуючи ростове середовище 199. Суспензію розливають у ємності для вирощування з розрахунку близько 800 000 клітин/мл і вносять посівний вірус у дозі не менше 100 000 CCID₅₀ (середня інфекційна доза клітинної культури, від англ. – *cell culture infectious dose 50 %*) на ємність (наприклад, матрац). Матраци інкубують у ролерних умовах при 22–25 об/год та 35±0,5 °С. Через 2–5 діб клітинний шар ретельно відмивають середовищем 199, щоб вміст сироватки тварин не перевищував 50 нг альбуміну на дозу вакцини, і вносять підтримуюче середовище. На 7–8 добу після зараження вірусом і потім кожні 2–3 доби вірусовмісну рідину зливають у флакони (індивідуальні вірусні збори). У матраци додають свіже середовище в кількості, що дорівнює об'єму знятої вірусовмісної рідини. Збір вірусовмісної рідини і заміну її свіжим середовищем проводять 3–5 разів доти, поки на поверхні скла зберігається 50 % клітин.

Усі стерильні індивідуальні вірусні збори з біологічною активністю вірусу не нижче $10^{3,5}$ CCID₅₀ освітлюють або фільтруванням через систему фільтрів з різним розміром пор або центрифугуванням з подальшою фільтрацією. Надосадну рідину з флаконів об'єднують у бутль. До рідкого напівфабрикату додають стабілізатор (5 % сорбіту та 5 % желатину) та беруть пробу для контролю. Вміст антибіотиків не повинен перевищувати 25 мкг на одну дозу. У вакцинах, залежно від виробника, містяться неоміцину сульфат або гентаміцину сульфат у зазначеній концентрації. Рідкий напівфабрикат зберігають до розливу при 4 °C не більше 25 діб, а при мінус 40 °C – не більше року. Препарат у охолодженому стані розливають у ампули, флакони або шприци по 0,1–0,5 мл. Заморожування ампул відбувається при температурі мінус 40–50 °C. Після ліофілізації проводиться герметизація ампул у вакуумі.

Контроль готової вакцини. Готова вакцина повинна бути стерильною, вільною від мікоплазм, мікобактерій туберкульозу, сторонніх вірусів, повинна бути специфічно нешкідливою, містити в одній дозі не менше 1000 CCID₅₀, залишкова вологість не повинна перевищувати 2 %, при масовому застосуванні викликати сероконверсію у не менше 90 % щеплених дітей, і не більше 4 % сильних реакцій. Вакцини проти епідемічного паротиту та краснухи отримують за такою ж схемою, використовуючи відповідний штам вірусу та культуру клітин. На рис. 4.15 наведено схему отримання живих вірусних вакцин (кір, краснуха, епідемічний паротит).

Одним з методів визначення вмісту вірусів у живих вакцинах є *метод бляшкоутворюючих одиниць* (PFU, англ. – *plaque forming units*). Принцип методу: в культуру клітин, наприклад, клітин Vero, додають вірусний препарат і інкубують протягом певного часу (близько 3 год) в атмосфері 5 %-вого вуглекислого газу при температурі, оптимальній для досліджуваного вірусу. Потім додають 1 мл середовища з 0,8 % карбоксиметилцелюлози та інкубують планшети 7–10 діб. Клітини промивають буфером, фарбують 0,5 %-вим розчином кристалічного фіолетового в 20 %-вому етанолі протягом 20 хв при кімнатній температурі. Планшети промивають водою та підсушують. Фарбування моношару дозволяє оцінити інфекційність вірусу: живі клітини накопичують барвник, загиблі – втрачають цю здатність. Тому ділянки клітинного шару, пошкоджені вірусом, виглядають світлими плямами на фоні забарвлених клітин. Залежність між числом утворених бляшок і числом інфекційних вірусних частинок суворо

лінійна, отже, одна бляшка відповідає одній інфекційній одиниці. Кінцевий результат титрування виражається кількістю PFU.

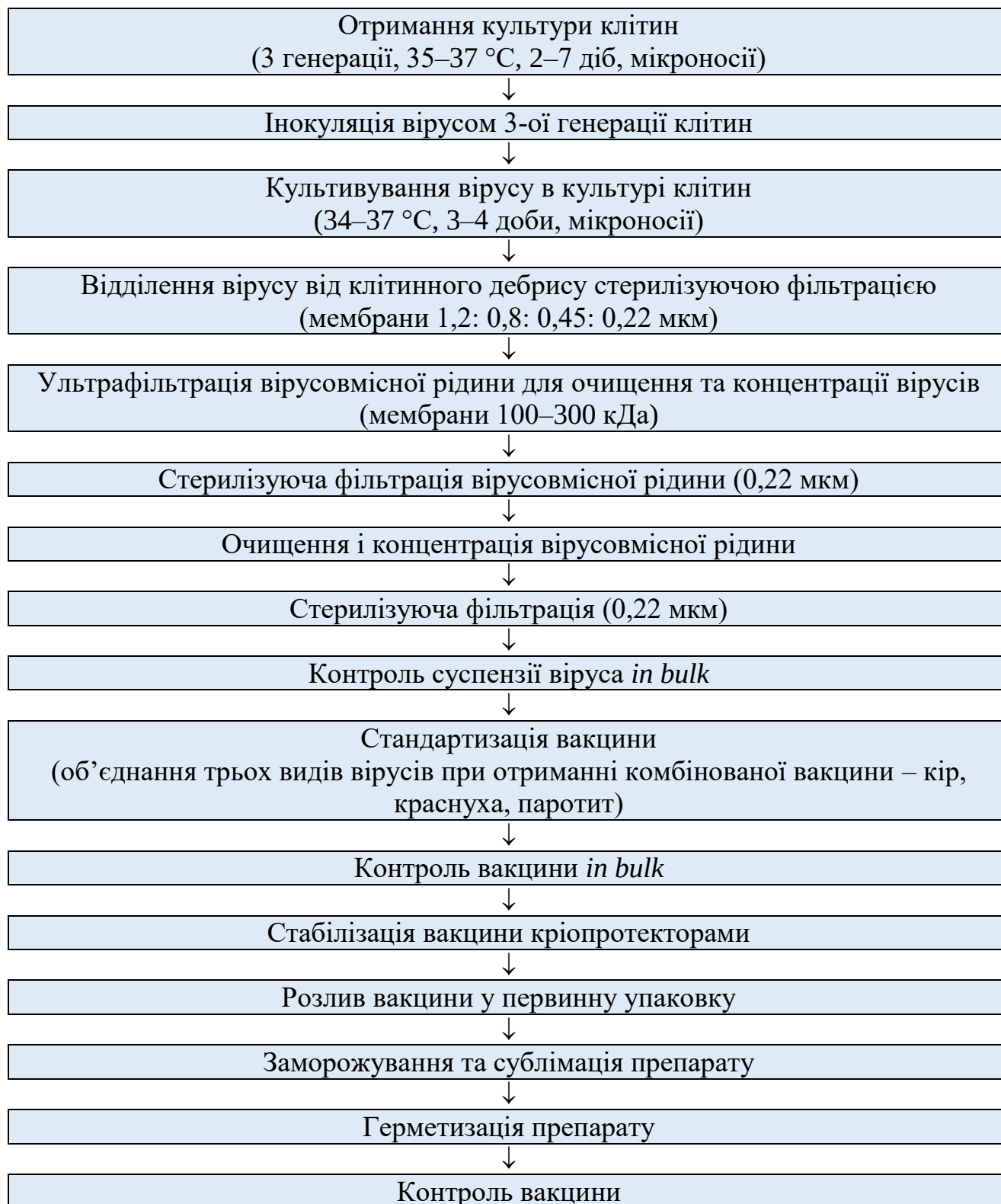


Рисунок 4.15 – Схема отримання живих вірусних вакцин (кір, краснуха, епідемічний паротит)

Актуальним є визначення у живих вакцинах залишкової кількості бичачого сироваткового альбуміну. При культивуванні клітин до складу поживних середовищ додають сироваткові компоненти, основна кількість яких видаляється в процесі одержання вакцини. У вакцинах проти кору, краснухи та паротиту, відповідно до рекомендацій ВООЗ, вміст бичачого сироваткового альбуміну не повинен перевищувати 50 нг в одній дозі препарату. Для визначення альбуміну запропоновано кілька методів: імуноферментний аналіз, ракетний імуноелектрофорез, одиночна радіальна імунодифузія. Вибір методу здійснюється виробником вакцини та має бути підтверджений валідаційними дослідженнями (специфічність, лінійність, межа виявлення тощо).

Параметри контролю вакцин проти кору, краснухи та епідемічного паротиту наведено у табл. 4.9.

Таблиця 4.9 – Вимоги до контролю якості вакцин проти кору, краснухи та паротиту

Показник	Тип вакцини			
	Кір	Краснуха	Паротит	Комбінована
Ідентифікація	Нейтралізація вірусу специфічним антитілом у культурі клітин			
Стерильність	Відсутність бактерій, грибів та мікоплазм			
Вміст кожного з вірусів в 1 дозі (CCID50)	Не менше 1×10^3	Не менше 1×10^3	Не менше $1 \times 10^{3,7}$	Не менше вказаних у моновакцині
Термостабільність	Зниження титру не більше, ніж $1 \log_{10}$		Зниження титру не більше, ніж $1 \log_{10}$ для кожного вірусу	
Специфічна нешкідливість на мишах і морських свинках	Нешкідлива			
Залишкова вологість	Не більше 2,0 %			
Залишковий сироватковий альбумін	Не більше 50 нг на дозу			
Вміст неоміцину сульфату	25 мг на дозу			
Розчинність	Не більше 3 хв			

Сьогодні в Україні використовуються такі вакцини:

«*Пріорикс*» – комбінована вакцина для профілактики кору, краснухи та епідемічного паротиту (*GlaxoSmithKline Biologicals S.A.*, Бельгія). Ця ліофілізована вакцина являє собою препарат з живих атенуєваних вірусів кору (штам *Schwarz*), епідемічного паротиту (штам RIT 4385, який є похідним штаму *Jeryl Lynn*) та краснухи (штам *Wistar RA27/3*), отриманих шляхом розмноження вірусів у культурі тканини курячого ембріона (віруси паротиту та кору) або в диплоїдних клітинах людини MRC-5 (вірус краснухи).

«*Тримовакс*» – комбінована вакцина для профілактики кору, краснухи та епідемічного паротиту (*Sanofi Pasteur S.A.*, Франція).

Усі вакцини є ліофілізованими препаратами. У комплект препарату входить розчинник – вода для ін'єкцій. До препаратів входять допоміжні речовини, склад яких визначає виробник, забезпечуючи нешкідливість, ефективність та стабільність вакцини як у процесі виготовлення (включаючи ліофілізацію), так і протягом усього терміну придатності живих вакцин. Найчастіше у препарати вводять: амінокислоти, лактозу, сахарозу сорбіт, манітол, натрію хлорид, гідролізований желатин.

Захворюваність на кір серед щеплених живою вакциною проти кору і кількість дітей з первинними та вторинними імунодефіцитними станами, що зростає в останні роки, свідчить про необхідність створення нових ефективних вакцинних препаратів, позбавлених недоліків живих вірусних вакцин. Однак, незважаючи на інтенсивні дослідження, що проводяться у провідних лабораторіях світу, вивчення та обґрунтування складу імуногенного комплексу як основи інактивованої вакцини проти кору не мали позитивних результатів, і така вакцина на сьогоднішній день не створена. Основною проблемою під час створення інактивованої вакцини є слабка антигенна активність поверхневих антигенів кору. Цікавими є дані, отримані при включенні поверхневих антигенів та структурних білків вірусу кору в бішарову мембрану, отриману з холестерину та фосфатидилетаноламіну. Застосування таких ліпосом, навантажених різними антигенами, в суміші з ад'ювантом Qwіl А дозволило в десятки разів збільшити імунну відповідь порівняно з вихідним антигеном.

Безперечний інтерес становлять розробки аерозольних вірусних вакцин. У 2002 році в США була створена корпорація *Aktiv-Dry*, завданням якої є розробка нового покоління вірусних вакцин у вигляді сухих порош-

ків, які можна використовувати аерозольно, виключивши ін'єкційний шлях введення. У роботі беруть участь фахівці із США, Канади, Франції та Індії. Переваги такого способу очевидні. Розробки було розпочато на моделі вакцини проти кору. Як протектори у вакцину вводили трегалозу або сахарозу (або обидва цукри), антиоксиданти, поверхнево активні речовини і компоненти буферних розчинів. Вакцину вводили інгаляторно та аерозольно. При інгаляції сухого порошку отримана імунна відповідь меншого рівня, ніж при введенні аерозольно. Аерозольний шлях введення продемонстрував результати, аналогічні до ін'єкційного введення. На мавпах було показано ідентичність імуногенності і нешкідливості під час використання ін'єкційного і аерозольного шляхів введення. Вакцина проти кору була використана як модель і може бути адаптована для інших дитячих вірусних вакцин.

Зупинимось ще на одному питанні вакцинації атенуйованими вірусними вакцинами. Як і раніше, існує потреба в альтернативній системі доставки вакцин, яка могла б спростити логістику та забезпечити аналогічні властивості (імуногенність та нешкідливість), характерні відомим сьогоднішнім препаратам. На сьогоднішній день перспективною альтернативою для вакцинації є *підшкірне введення вакцин* за допомогою невеликих пластирів, які містять *мікрровиступи (мікроголки)* або як їх називають «*мікрочіпи*», що містять вакцину. При нанесенні на шкіру пластр за допомогою мікроголки вносить в шкіру вакцину.

Такий метод має ряд переваг: забезпечується термостабільність, яка звільняє вакцини від суворих вимог безперервного холодового ланцюга; усунення підшкірних ін'єкцій за допомогою шприца; можливість доставки препарату у важкодоступні регіони та місця зі спекотним кліматом. Зміна логістики при використанні пластирів із вакцинами робить цей метод інноваційним. Вакцини на основі пластирів з мікроголками, які містять вакцини, проходять доклінічні та клінічні випробування. Так, сьогодні в доклінічній розробці знаходиться ряд вакцинних препаратів проти вірусів папіломи людини, поліомієліту, сказу, ротавірусу, гепатиту В, вірусу SARS-CoV-2, краснухи, а також правцевого анатоксину, сибірки, дифтерії, BCG та ін. Відомий пластр (*Micron Biomedical MR0*), який містить вакцину проти кору, зараз знаходиться на 1/2 стадії клінічних випробувань.

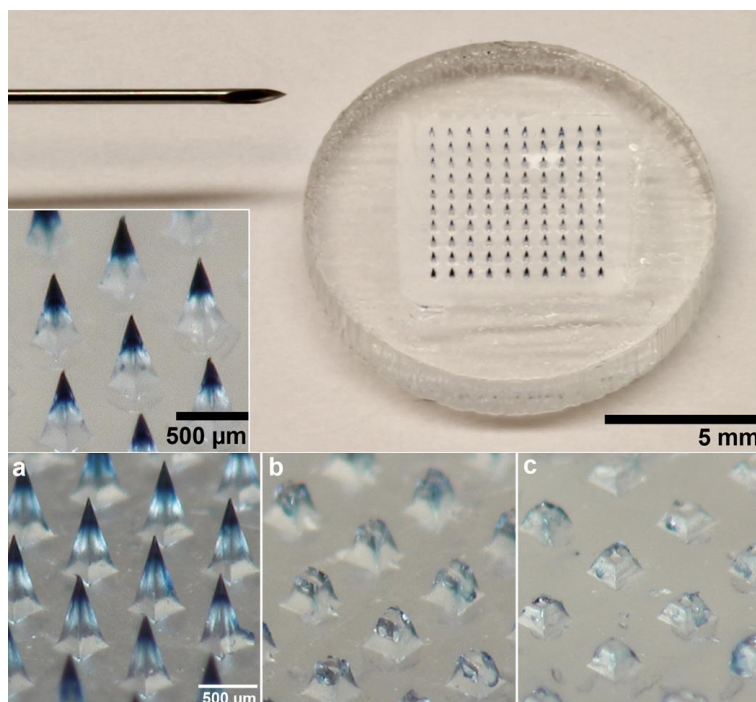


Рисунок 4.16 – Пластир з мікроголками для щеплення від кору: (вгорі) – пластир з мікроголками показаний поруч із голкою для підшкірних ін’єкцій, пластир містить 100 твердих мікроголок, виготовлених із водорозчинних допоміжних речовин, які інкапсулюють вакцину проти кору для доставки на шкіру: (внизу) – розчинення мікроголок після введення в шкіру свині (а) перед використанням, (b) через 1 хвилину та (c) через 10 хвилин після введення. Для кращої візуалізації в мікроголки інкапсулювали барвник (трипановий синій) замість вакцини

Однією з умов використання вакцин для мікроголок є висока концентрація антигена (живого вірусу) у вакцині. При отриманні пластирів із мікрочіпами використовували живу вакцину проти кору, отриману зі штаму Едмонстон-Загреб. Вирощування вірусу проводили на клітинах *Vero*. Зазвичай, стандартними субстратами для вирощування вірусу кору є клітини MRC-5 або первинні фідробласти ембріонів курей. Проте клітини *Vero* продукують вищі титри вірусу кору, що дозволяє приготувати розчини для пластиру з високою концентрацією вірусу, необхідною для приготування мікроголок. Схема виготовлення пластиру з мікроголками, що містять живу вакцину проти кору, зводиться до наступних етапів:

1. Готували форми з поліметилсиликсану, які складаються з масиву 10×10 пірамідальних мікроголок розміром $300 \times 300 \times 600$ мкм, що займають площу $0,29 \text{ cm}^2$.

2. Приблизно 20 мкл вакцини проти кору з титром $5,0 \times 10^6$ CCID50/мл змішували у співвідношенні 1:1 з розчином, що складається з 15 % (мас./об.) сахарози, 300 мМ треоніну і 2 % (мас.об.) карбоксиметилцелюлози.

3. Отриманий на стадії 2 розчин наносили у форму з мікроголками, заповнюючи порожнини форми, та давали висохнути. Вакцину на поверхні форми видаляли за допомогою стрічки (вакцина повинна бути тільки в мікроголках).

4. Готували розчин матриці мікроголок, що складається з 8 г сахарози та 8 г поліаміду. Мікроголки та матрицю використовували для формування пластиру.

5. Пластир, що містить матрицю та заповнені вакциною мікроголки, ліофілізували протягом 24 годин і зберігали при 22 °C у запаяному пакеті з осушувачем у захищеному від світла місці.

6. Титр вакцини проти кору визначали з відновлених мікроголок за допомогою аналізу кінцевої точки розведення, а CCID50 розраховували методом Ріда та Менча (розрахунок титру вірусу в PFU).

7. Контроль вакцини: вимірювали силу, необхідну для введення в шкіру вакцини; концентрацію розчинених речовин у шкірі, кінетику розчинення мікроголок у шкірі, ефективність доставки вакцини у шкіру (для цих досліджень використовували шкіру свині). Вивчено стабільність вакцини при різних температурах зберігання: 4, 25 і 40 °C. Зберігання при температурі 4–8 °C демонструє не більше 90 % зниження вмісту живого вірусу.

8. Вивчали імунну відповідь на вакцину проти кору на макаках-резусах. Було утворено дві групи мавп: першій вводили вакцину за допомогою пластиру з мікроголками, другій – живу вакцину за допомогою шприца. Титр антитіл був виявлений на 21 день після вакцинації та збільшився на 28 день (приблизно до 4700 мМО/мл). Результати не відрізнялися у двох груп: у всіх тварин відбулася сероконверсія на однаковому рівні і всі тварини мали титр понад 120 мМО/мл, що вважається достатнім захисним титром для людини. Титри нейтралізуючих антитіл зберігалися не менше 133 днів після вакцинації. В результаті проведених досліджень показано, що обидва способи введення є еквівалентними. Крім того, виявлено відсутність небажаних побічних реакцій обох вакцин.

Деякі питання клінічної ефективності вакцин проти кору, краснухи та ендемічного паротиту. Наприкінці 1960-х і в 1970-ті роки вважалося, що живі вакцини кору, паротиту та краснухи є імуногенами одноразового введення, здатними викликати імунітет, який зберігається протягом усього життя. Дослідження напруженості імунітету показали, що антитіла зберігалися тривалий термін. За відсутності природного стимулювання рівні антитіл з часом схильні знижуватися. До того ж є невелика кількість людей, які з певних причин не здатні до сероконверсії після введення однієї дози вакцини. А також не всі діти, які мають вакцинуватися на другому році життя, проходять вакцинацію. Це призвело до рекомендації про введення другої дози вакцин проти кору, краснухи та епідемічного паротиту в багатьох країнах світу протягом 1980-х років, і перевірка даних щодо цих трьох захворювань вказує на позитивний вплив цього рішення.

Хоча запровадження другої дози вакцини є прийнятою стратегією, залишається питання: коли найкраще вводити другу дозу? У США одна група фахівців рекомендувала вводити другу дозу перед вступом до школи (4–5 років), а інша група – у віці 10–12 років. Обидві ці думки підтримуються сильними та обґрунтованими аргументами. Більш раннє введення краще в сенсі зручності (4–5-річних дітей легше залучити до проведення щеплень) та нижчої частоти реакції. Частота скарг на наслідки вакцинації у пацієнтів старшого віку вище приблизно на 50 %, переважно це скарги на біль у суглобах, який, швидше за все, пов'язаний із компонентом краснухи. Це повністю відповідає відомому профілю реактогенності вакцини проти краснухи та набагато важчих наслідків такого захворювання як краснуха, перенесеного не в ранньому дитячому віці. Введення другої дози перед вступом до школи також знижує накопичення осіб, сприйнятливих до захворювання, і цей аргумент призвів до того, що, наприклад, Австралія перейшла від політики пізньої повторної вакцинації до введення перед вступом до школи. Більш пізня вакцинація краще з тієї точки зору, що вона дозволяє посилити імунітет або надати його раніше не вакцинованим особам шляхом введення цих вакцин, зокрема проти краснухи, у міру наближення людей до дітородного віку, та знизити ймовірність уродженого синдрому краснухи. Також було показано, що цей метод добре працює із серологічної точки зору. Третій підхід, який обговорювався у Великій Британії, полягає в тому, що друга доза вакцини не повинна автоматично

вводиться всім дітям, а повинна вводиться тільки тим, хто має ідентифіковану серонегативність або не був вакцинований раніше. Вивчивши напруженість імунітету у дітей, які вступають до школи (6–7 років), було виявлено, що лише 10 % (4,6 % серонегативних та 5,4 % з мінімальними титрами) потребували ревакцинації. Це ставить під сумнів доцільність ревакцинації проти кору. Водночас запропоновано перенести ревакцинацію на більш ранні терміни (2–3 роки). Загалом, загальна думка схиляється у бік більш раннього введення другої дози внаслідок зручності цього підходу, а також зростаючого розуміння того, що зниження імунітету є меншою проблемою, ніж рідкісні випадки неправильного спрацьовування першої дози вакцини та поширені випадки відсутності вакцинації. У США рекомендовано знизити вік первинної імунізації з 18 місяців до 12–15 місяців, щоб пристосувати її до іншого режиму вакцинації. Необхідно зазначити, що в Україні первинна імунізація проводиться у дітей віком 12 місяців (див. рис. 4.1). Відставивши убік питання часу, найважливішим параметром, як і для будь-якої вакцини, є охоплення населення. Серологічні дослідження та спалахи кору на початку 90-х років та у 2003–2005 роках показують, що енергійне впровадження політики вакцинації з метою забезпечення охоплення та вироблення популяційного імунітету є ключовим у контролі захворювання.

Вакцини проти трьох вірусних інфекцій мають принаймні дві загальні властивості, які зумовлюють появу застережень та протипоказань в інструкції із застосування. По-перше, компоненти вакцини проти кору і паротиту виробляються в певній системі яєць з ембріоном, який розвивається. Наприклад, віруси кору і паротиту вирощуються в культурі клітин, відібраних з яєць з ембріоном, який розвивається, тоді як інші можуть вирощуватися безпосередньо в яйцях. Численні дослідження показали, що можна безпечно проводити вакцинацію осіб з алергією на яйця, хоча в окремих випадках може виникнути реакція. На підставі цих даних різні групи, які розробляють принципи вакцинації, рекомендували більше не вважати алергію на яйця протипоказанням до вакцинації проти кору, краснухи та епідемічного паротиту, хоча, як і для будь-якої вакцини, повинні бути засоби лікування будь-якої анафілактичної реакції. Другим протипоказанням, поширеним для живих вірусних вакцин, є вакцинація осіб із ослабленим імунітетом. Особливе занепокоєння викликають ВІЛ-позитивні особи. Після огляду наявних даних та оцінки співвідношення параметрів

ризика та переваг у випадку важкого кору у ВІЛ-позитивних осіб, зараз рекомендується щеплення вакциною MMR ВІЛ-позитивних осіб, у яких хвороба протікає безсимптомно, у звичайному порядку, а також розглядати цей варіант для хворих з наявністю симптомів ВІЛ. Третім пунктом, що вимагає розгляду, є вакцинація дітей з легкими захворюваннями (нежить, кашель тощо). Раніше рекомендували відкласти вакцинацію до одужання дитини. Останнім часом, на підставі зібраних даних, ВООЗ змінила ці рекомендації та дозволяє проводити вакцинацію дітей з неважкими захворюваннями. В інструкції із застосування вірусних вакцин, що використовуються сьогодні в Україні, до протипоказань належать гострі інфекційні захворювання, прогресуючі захворювання (гострі або хронічні), вроджені або набуті імунodefіцити, підтверджені алергічні реакції на білок курячих яєць.

Ми зупинимося ще на одному питанні, яке широко дискутується сьогодні: *чи існує взаємозв'язок між вакцинацією вірусними вакцинами проти кору, краснухи, епідемічного паротиту і аутизмом?* Обговорення безпечності та ризику побічних ефектів ведеться з 1998 року, коли в лютому в журналі *Lancet* з'явилася стаття доктора Ендрю Вейкфілда зі співавторами, які припустили наявність зв'язку між вакцинацією та аутизмом, спричиненою збоєм імунної системи дитини при введенні трьох вакцинних вірусів. Ними було вивчено кишкову патологію у 12 дітей після введення вакцин. У 11 дітей була виявлена гіперплазія, яка супроводжувалася аутизмом у 9 дітей, психічними розладами у 1 дитини та у 2 дітей енцефалопатичними ускладненнями. Вже в березні 1998 року міжнародна група експертів дійшла висновку про відсутність даних щодо зв'язку між вакцинацією, кишковими розладами та аутизмом. У квітні цього ж року фінські вчені на 3 млн вакцинованих виявили лише 31 дитину з ознаками діареї чи блювання. Жодного випадку аутизму у 31 особи не виявлено.

Великий внесок у питання про аутизм при вакцинації зробили епідеміологи Японії. У 1993 році в Японії було повністю скасовано вакцинацію проти кору, краснухи та епідемічного паротиту, яка була відновлена лише через 10 років. Аналіз дітей з діагнозом аутизм показав, що в 1988 році (вакцинація проводилася) на 10 000 дітей виявлено 48 осіб з діагнозом аутизм, а 1996 року (вакцинація не проводилася) на 10 000 дітей виявлено 117 осіб з діагнозом аутизм, свідчить про відсутність причетності вакцинації до появи аутизму у дітей.

У 2003 році ВООЗ доручила незалежним дослідникам провести огляд літературних даних про зв'язок аутизму та комбінованої вакцини кір–краснуха–паротит. Дослідники вивчали дані про вплив природних та вакцинних штамів кору на розвиток запальних процесів у травному тракті та, як окреме питання, зв'язок запалення кишечника та аутизму. Достовірних даних, що підтверджують цей зв'язок, не виявлено.

У 2006 році було опубліковано міжнародну доповідь про вакцину MMR, в якій воєдино було зібрано інформацію з більшості країн світу, і висновок було зроблено однозначним: хвороба Крона та аутизм не є побічною дією вакцинації. У цьому році доктору Вейкфілду було висунуто звинувачення у серйозних професійних помилках і безвідповідальності, оскільки його публікації призвели до зниження охоплення дітей під час вакцинації. Останнє призвело до того, що в Лондоні в 2003 році було 4204 випадків захворювання на кір, а в 2005 році – вже 56 390 хворих.

Про відсутність зв'язку між вакцинацією та аутизмом говорять фахівці Бостонського медичного університету, які обстежили 305 дітей, хворих на аутизм. Збільшення хворих на аутизм вони пов'язують з поліпшенням діагностики цього захворювання. Крім того, дослідники що не можуть виключити вплив факторів навколишнього середовища.

За висновками Американської академії педіатрії та Федерального суду США, на сьогоднішній день немає достовірних наукових доказів, що будь-яка моновакцина або комбінована вакцина можуть викликати аутизм.

Таким чином, існуючі вакцини проти трьох вірусних інфекцій: кору, краснухи та епідемічного паротиту – з кожним роком охоплюють дедалі більший відсоток дитячого населення.

4.2.4. Вакцини для профілактики поліомієліту

У світі мільйони дітей і дорослих страждають на параліч внаслідок перенесеного поліомієліту. У 1988 році Всесвітня асамблея охорони здоров'я поставила перед ВООЗ завдання ліквідації поліомієліту на планеті з повним припиненням циркуляції дикого вірусу поліомієліту. За останні роки кількість випадків поліомієліту скоротилася більш ніж у 10 разів. Існують території, вільні від циркуляції дикого вірусу, який є основним джерелом поліомієліту і який завозиться з регіонів, неблагополучних за

поліомієлітом. Розроблена ВООЗ програма по ліквідації поліомієліту передбачає створення системи реєстрації гострих та в'ялих паралічів, контролю за циркуляцією вірусу поліомієліту та сертифікацію територій на відсутність поліомієліту. Відповідно до планів ВООЗ, датою глобальної ерадикації поліомієліту було встановлено 2005 рік. У країнах регіонів, які звільнилися від поліомієліту, періодично реєструються заносні випадки поліомієліту, спричинені «дикими» поліовірусами (Канада, Грузія, Болгарія та ін.).

Поліомієліт викликається вірусом з роду ентеровірусів, який має три серотипи: 1, 2 і 3. Найменша генетична стабільність властива вірусу 3-го типу. Поліовіруси стійкі до кислого середовища та зберігають життєздатність при температурі 0–8 °С протягом багатьох місяців. З вірусу виділено два самостійні антигени – D і C, хоча антигенна структура вірусу є більш складною. Людина є єдиним «резервуаром» для поліовірусу, який поширюється фекально-оральним або орально-оральним способом. Можливий аспіраційний механізм зараження з повітряно-крапельним та повітряно-пиловим шляхом передачі. Дикий вірус фіксується на епітеліальних клітинах глотки та кишечника, проникає у клітини та розмножується в них. Вірус надходить у шийні та мезентеріальні лімфатичні вузли, а звідти через лімфатичний грудний протік – у кров. Протягом 1–1,5 місяців вірус поліомієліту виділяється з фекаліями та виділеннями носоглотки. У центральну нервову систему вірус проникає вздовж нервових волокон та руйнує рухові нейрони, що призводить до розвитку в'ялих паралічів.

Першою вакциною проти поліомієліту був препарат, інактивований за допомогою формаліну, запропонований Джоном Солком в 1955 р. Для вирощування вірусу поліомієліту Дж. Солк використовував клітини HeLa. Ця вакцина була достатньо ефективною, але незабаром з'ясувалося, що для досягнення оптимального зниження поширення поліомієліту необхідна імуногенніша вакцина. У 1950-х роках було здійснено кілька спроб створення живої атенуйованої вакцини. Одна з них була описана Геральдом Коксом і полягала в пасажуванні поліовірусу в мозку хом'яків-сосунків і подальшої адаптації в жовтковому мішку курячого яйця з ембріоном, який розвивається.

Стратегією, яка дозволила досягти успіху, було пасажування вірусу в культурі клітин тканин приматів та селекція варіантів вірусу з ослабле-

ними нейротропними властивостями, яка була вперше отримана Альбертом Себіном, Гіларі Копровським та Джозефом Мелником.

В даний час для профілактики поліомієліту застосовується два типи вакцин: *жива поліомієлітна вакцина для орального застосування* (ОПВ) і *інактивована поліомієлітна вакцина* (ІПВ). Розглянемо основні технологічні засади отримання зазначених препаратів.

Титр вірусу (кількість інфекційних одиниць на 1 мл препарату) визначається за допомогою методів граничних розведень підрахунку локальних ушкоджень (бляшкоутворюючих одиниць, PFU). Принцип методу описаний в розділі 4.2.3. – контроль готової вакцини). Можливе визначення активності вірусу шляхом зараження чутливих для цього вірусу тварин чи клітинних культур, при цьому розвивається інфекційний процес, який проявляється в смерті у тварин або в руйнуванні культури клітин. Використовують такі критерії оцінки:

- ✓ ІД50 (50 %-ва інфікуюча доза) – доза вірусу, здатна заразити 50 % тварин;
- ✓ ЛД50 – летальна доза для 50 % тварин;
- ✓ ЕІД50 – доза, що інфікує 50 % ембріонів;
- ✓ ЦПД50 – доза, що викликає цитопатичний ефект у 50 % заражених культур.

Жива поліомієлітна вакцина для орального застосування – тривалентний препарат, виготовлений з атенуйованих штамів *Sabin* вірусу поліомієліту 1, 2, 3 типів, отриманих на первинній культурі клітин нирок африканських зелених мавп або диплоїдній культурі клітин людини. Вакцину випускають у рідкому вигляді в об'ємі 2 мл (10 доз). В одній дозі (0,2 мл або 4 краплі) міститься інфекційні одиниці: типу 1 – не менше 1 млн; типу 2 – не менше 0,1 млн; типу 3 – не менше 0,3 млн. Вакцина повинна приживлятися на слизовій оболонці кишечника та викликати місцевий та загальний вакцинальний процес, що приводить до стійкості специфічного імунітету.

Самостійним питанням одержання живих вірусних вакцин є процес атенуації штамів. Штами, використані у вакцині *Sabin*, відбиралися на основі зниженого росту нейронів мавп: макак та шимпанзе. Останні 20 років молекулярно-біологічні методи дозволили визначити основу атенуації. Ключовою частиною інформації, що є відправною точкою, є рідкісна, але стійка реверсія вакцинних штамів і поява паралітичного поліомієліту, асо-

ційованого з вакциною. Це явище дало можливість визначити, який генетичний склад корелює з безпечністю та які зміни визначають нейровірулентність. Геном вірусу поліомієліту складає приблизно 7,5 тис.п.н. та кодує 12 білків. Геном транслюється з утворенням одного довгого поліпротеїну, який потім розрізається сайт-специфічною протеазою, яка кодується вірусом. На 5'-кінці, або лівому кінці (як зазвичай зображують геном), є довга нетрансльована послідовність розміром приблизно 750 нуклеотидів. Ця послідовність у подальшому формує вторинні структури, які взаємодіють із білками, необхідними для трансляції та реплікації. При порівнянні нуклеотидних послідовностей вакцинних штамів, їх попередників дикого типу та численних ізольованих вірусів, отриманих у випадках виникнення асоційованого поліомієліту, можна визначити мутації, спільні для вірусів, які виявляли вірулентність в організмі людини. Таким чином, підтверджено, що для реверсії до нейровірулентності необхідна єдина мутація в положеннях 480 (для типу 1), 481 (для типу 2) і 472 (для типу 3) 5'-нетрансльованої послідовності (рис. 4.17). Вакцинний штам типу 3 найчастіше із трьох існуючих повертається до вихідного стану. Вакцина зі штам типу 2 повертається до початкового стану рідше і для неї був описаний аналогічний набір мінімальних мутацій. Вірусному вакцинному штаму типу 1 властива більша стабільність, ніж типам 2 і 3, оскільки він повертається до вихідного стану і викликає асоційований поліомієліт вкрай рідко.

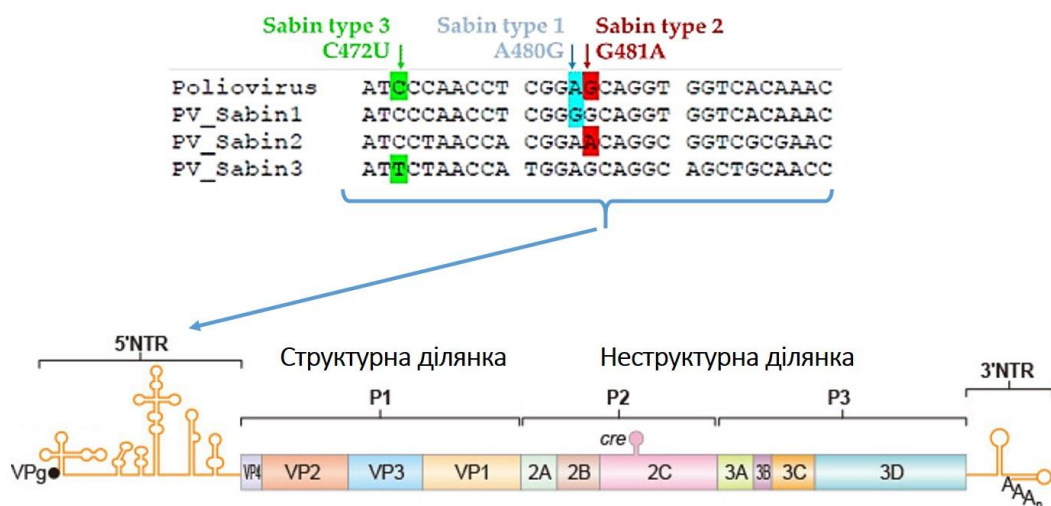


Рисунок 4.17 – Основні домени геному поліовірусу та локалізація мутацій вакцинних штамів *Sabin*, що призводять до реверсії

Технологія виробництва живої поліомієлітної вакцини. Вакцинні штами вірусу поліомієліту є повністю нешкідливими для людини ате-

нуйованими штамами трьох імунологічних типів: типу 1 – LSc 2ab, типу 2 – P 712 Ch 2 ab, типу 3 – Leon 12 a1b. Ці штами були виділені автором технології вакцини *Sabin*. *Штами контролюють за такими тестами:*

- ❖ рівень залишкової вірулентності, що оцінюється за допомогою лабораторних тестів на мавпах та генетичних маркерів – rct40;
- ❖ тест за D-антигенною ознакою;
- ❖ титр вірусу – не менше 10^7 PFU/мл;
- ❖ не містять сторонніх вірусних агентів, у тому числі SV40;
- ❖ не містять мікобактерій туберкульозу, інших бактерій, мікоплазм та грибів;
- ❖ температура зберігання вірусів – мінус 60 °C та нижче.

Контроль вірусу SV40 повинен проходити з використанням ампліфікації за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Що це за вірус та чому його визначенню приділяють особливу увагу? Вірус SV40, який може контамінувати поліомієлітну вакцину, пов'язаний із розвитком раку. Цей вірус виявлено дослідниками у різних видах пухлин, він руйнує захисний механізм організму шляхом «відключення» білка, який оберігає клітини від перетворення на ракові. Вперше вірус SV40 був виявлений у 1961 році у клітинах нирок мавп, яких використовують при приготуванні поліомієлітної вакцини. Тому з 1961 року клітини мавп, що використовуються для приготування поліомієлітних вакцин, контролюють на наявність вірусу SV40.

Отримання культури клітин мавп (Vero). Для вирощування культур клітин нирок мавп використовують спеціальні поживні середовища для вірусологічних досліджень: середовище Ігла, середовище 199 з додаванням 0,5 % ферментативного гідролізату білка. У середовища для вирощування культури клітин додають 5–10 % фетальної сироватки телят. Сироватка, яка використовується для розмноження клітин при тестуванні, повинна бути вільна від бактерій, грибів та мікоплазм. Необхідно також звертати особливу увагу на джерело отримання сироватки через можливість присутності у тварин енцефалопатичних агентів. Заборонено використовувати сироватку людини.

Трипсинізацію ниркової тканини проводять 0,25 %-вим розчином трипсину, розчиненим у 0,01 М фосфатному буфері з рН близько 7,0–7,5, але без сироватки. Культуру клітин одержують інкубуванням при температурі 37 °C. Для подальшого виробничого процесу вважають придатними

лише ті партії культур клітин, у яких не реєструвалося жодних ознак дегенерації моношару клітин чи мікробної контамінації. Загальна кількість відбракованих з неспецифічних причин культур використовуваної партії не має перевищувати 10 %. Для визначення контамінації сторонніми вірусними агентами залишають незараженими від 10 до 25 % культур клітин кожної партії. За контрольними культурами спостерігають протягом 14 днів з моменту зараження посівним вірусом основної частини виробничої партії клітин. Трипсин, отриманий від великої рогатої худоби, повинен бути вільний від грибів, бактерій, мікоплазм, вірусних агентів (у тому числі парвовірусів) та контамінації енцефалопатичними агентами.

Перед зараженням вірусом культури клітин промивають розчином Ерла або Ігла для вивільнення сироваткових білків. Для розмноження вірусу використовують таке ж середовище, що й для вирощування клітин, але без сироватки. Інокуляцію культур клітин посівним вірусом здійснюють шляхом введення в ємності з культурою клітин поживного середовища, що містить вірус поліомієліту з титром не менше 10^7 PFU/мл. Культуру клітин інкубують при температурі $34 \pm 0,5$ °C протягом 3–4 діб. Штами *Sabin* адаптовані до розмноження за вказаної температури. У разі підвищення температури при їх культивуванні може відбутися реверсія поліовірусів у бік вірулентного фенотипу, тому важливо зберігати температуру інкубування заражених культур клітин на суворо визначеному рівні.

Культури з повною дегенерацією клітин відбирають для збору вірусовмісної рідини, яку збирають в окремі ємності від кожної партії клітин. З кожної ємності відбирають зразки на контроль. На період контролю вірусу рідину зберігають при температурі мінус 20 °C.

Вірусовмісну рідину контролюють за такими показниками: стерильність; титр вірусу; визначення контамінації іншими вірусами; визначення автентичності, яке проводять шляхом серологічного контролю вірусів з відповідними антисироватками (гетерологічними та гомологічними) або відповідними моноклональними антитілами.

Титр вірусу визначають порівняно зі стандартним референтним препаратом, використовуючи тест нейровірулентності на мавпах або альтернативний метод на трансгенних мишах лінії TgPVR для типу вірусу 1 і 2 (введення мишам вакцини має протягом 14 днів призвести до паралічу та загибелі всіх мишей). Визначення нейровірулентності проводиться за визначенням паралітогенної активності вірусу не тільки при інтрацеребра-

льному зараженні мавп, але також при інтраспінальній інокуляції препарату. Однак останнім часом все ширше застосовується метод визначення нейровірулентності *in vitro* у реакції ПЛР для кількісного визначення нуклеотиду 472 і визначення генетичних маркерів rct/40- і rct/40+ для типу вірусу 3.

Первинні збори одного типу, що пройшли всі необхідні контролю, об'єднують. Після перемішування зведеної вірусовмісної рідини з ємності беруть зразки для контролю на відсутність бактерій, грибів, мікоплазми. Потім вірусовмісну рідину піддають сепаруванню для видалення клітинного дебриса.

Отриманий освітлений фільтрат вірусом рідини піддають фільтрації через глибинні фільтри, а потім пропускають через стерилізуючі мембрани з розміром пор 0,22 мкм. Зі стерильного препарату відбирають зразки на контроль і зберігають препарат при температурі мінус 20 °С до закінчення контролю.

Контроль препарату *in bulk* проводять відповідно до рекомендацій ВООЗ за такими показниками:

- ✓ рН;
- ✓ стерильність – бактерії, гриби, мікоплазми;
- ✓ контроль вірусної контамінації методом ПЛР;
- ✓ тести на справжність вірусів поліомієліту:
 - ❖ аналіз мутантів за допомогою ПЛР і розщеплення рестриктазою (MAPREC) для оральної поліовірусної вакцини (*Sabin*) типів 1, 2 або 3 (метод рекомендований ВООЗ);
 - ❖ визначення нейровірулентності на мавпах, або альтернативним методом на трансгенних мишах, чутливих до поліомієліту (TgPVR21), для поліовірусу 3 типу (метод рекомендований ВООЗ).

В геном трансгенних мишей TgPVR21 вставлений ген, що кодує білок, який є людським рецептором для вірусів, тому ці миші чутливі до поліовірусів всіх трьох типів. Інтраспінальне введення таким мишам зразків вакцин дозволяє виявити серії вакцини з відмінною від норми нейровірулентністю. Даний метод може бути альтернативним для дослідження нейровірулентності живих поліомієлітних вакцин і замінити мавп, нижчих приматів, які є єдиними тваринами, чутливими до цієї інфекції.

За даними фахівців високоефективним виявився молекулярно-біологічний метод, що ґрунтується на використанні полімеразної ланцю-

гової реакції та рестрикційного аналізу, що дозволяє кількісно оцінювати вміст менше 1 % мутантів у популяції. При проведенні аналізу посівних вірусів понад 20 моновакцин 3 типу та понад 50 первинних зборів вірусу, які використовували при отриманні моновакцин, була показана висока чутливість, відтворюваність та чітка кореляція між молекулярно-біологічними даними та результатами визначення залишкової нейровірулентності на мавпах. Цей метод має використовуватися для контролю виробництва живої поліомієлітної вакцини на всіх етапах технології.

У спробах розробити тести без використання приматів, було отримано кілька альтернатив. Одним з них є описаний вище набір трансгенних мишачих моделей, у яких людський ген поліовірусного рецептора заміщає аналогічний ген миші. Отримана мишача модель підтримує ріст поліовірусу людини, а після інтраспінальної ін'єкції нейровірулентного штаму у неї розвиваються клінічні симптоми паралічу. При цьому, лінія TgPVR21 підходить для тестування типів 2 і 3, а лінія TgPVR1 може бути використана для типу 1. Другий набір тестів, що ґрунтується на молекулярних методах, вимірює наявність та співвідношення мутацій у критичній точці 5'-нетрансльованої ділянки геному вірусу. Найбільш сучасний тест, відомий як тест MAPREC, добре корелює з випробуванням трансгенних мишей, а також із тестом нейровірулентності на мавпах. Були розроблені також аналогічні тести, що ґрунтуються на хемілюмінесценції або ефективності трансляції.

Препарат, який пройшов контроль, розливають у первинну упаковку шприцевим методом в асептичних умовах по 2 мл (10 доз). Об'єм однієї дози становить 0,2 мл або 4 краплі.

Вакцину в первинній упаковці (флакони) контролюють. Препарат проходить контроль за аналогічними методиками, описаними для контролю *in bulk*. Слід зазначити, що контроль поліомієлітних вакцин є найбільш складним та відповідальним етапом їх виготовлення. Це пов'язано з тим, що вакцина повинна зберігати вихідний рівень залишкової нейровірулентності авторських поліовірусів і не повинна містити сторонніх вірусних та інших агентів. Усі випробування вакцини повинні здійснюватися у порівнянні з референс-вакциною відповідного типу.

В одній дозі препарату (0,2 мл) міститься:

- 1 тип – 1 000 000 інфекційних одиниць;
- 2 тип – 100 000 інфекційних одиниць;

➤ 3 тип – 300 000 інфекційних одиниць.

В одній дозі вакцини також міститься стабілізатор – MgCl_2 у кількості 18 мг та антибіотик – канамацин у кількості 30 мкг.

Технологія виготовлення інактивованої поліомієлітної вакцини, тривалентної. Вакцина є тривалентним препаратом з інактивованих штамів вірусу поліомієліту типів 1 (*Mahoney*), 2 (MEF-1), 3 (*Saukett*), отриманих на культурі клітин нирок африканських зелених мавп (*Vero*) або диплоїдній культурі клітин людини. Вакцину випускають у рідкому вигляді об'ємом 1 мл (2 дози). В одній дозі (0,5 мл) міститься D-антигенних інфекційних одиниць: типу 1 – не менше 20, типу 2 – не менше 4, типу 3 – не менше 16.

Отримання культури клітин проводять у біореакторах, використовуючи три генерації клітин:

1-й пасаж проводиться на мікроносіях 3,5–4,0 г/л при температурі 37 °С у присутності глюкози та рН близько 7,2. Коли рН знижується, його коригують додаванням стерильного розчину натрію бікарбонату. Вирощування проводиться протягом 5–7 діб із рециркуляцією середовища (2 л/хв). Клітини двічі промивають 0,01 М фосфатним буфером з рН 7,3. Отриману культуру клітин 1-го пасажу піддають 15–25-хвилинній трипсинізації шляхом додавання до біореактору розчину трипсину в цитратному буфері до кінцевої концентрації 0,25 %. Процес проводять при незначному постійному перемішуванні.

2-й пасаж проводиться в аналогічних умовах, що й 1-ший пасаж, протягом 4–7 діб. Клітини двічі промивають 0,01 М фосфатним буфером з рН 7,3. Проводять постійний контроль глюкози, і при зниженні концентрації менше 5,5 мМ додають необхідну кількість глюкози. Отриману культуру клітин 2-го пасажу піддають трипсинізації за тих же умов, що і на попередній стадії. Потім до клітин додають поживне середовище та додаткову порцію мікроносія.

3-й пасаж проводиться шляхом перенесення трипсинізованих клітин у біореактор з поживним середовищем, додають мікроносій у кількості 1,5–3,0 г/л. Потім коригують рН бікарбонатом натрію при зниженні величини нижче 7,2 і вміст глюкози при зниженні вмісту в розчині менше 5,5 мМ. Культивування продовжують 3–6 днів.

Всі три пасажі культури клітин супроводжуються тестуванням до та після початку культивування за такими показниками: стерильність, концентрація клітин, мікроскопія клітин, рН, осмолярність.

Культивування вірусу проводять в біореакторі при додаванні до клітин 3-го пасажу штамів вірусу і мікроносіїв. Культивування проводять протягом 3–4 діб при $34 \pm 0,5$ °C. Кожен вірус вирощується в окремому реакторі. При вирощуванні вірусу проводять контроль рН і стерильності. Після завершення вирощування проводиться визначення стерильності, сторонніх агентів, титру вірусу та D-антигенів, які є маркерами ефективності вакцини. D-антигени визначають кількісно імуноферментним аналізом (ELISA), використовуючи поліклональні антисироватки або моноклональні антитіла проти вірусу поліомієліту.

Відділення вірусу від дебрису клітин шляхом стерилізуючої фільтрації через мембрани з розміром пор 1,2; 0,8; 0,45 і 0,22 мкм. Отриманий фільтрат вірусу піддають ультрафільтрації з метою очищення та концентрації. Критичними точками є визначення біонавантаження та D-антигенів.

Проведення хроматографії гель-фільтрацією на колонковому сорбенті в 0,04 М фосфатному буфері при рН 7,0. На цій стадії проводять визначення D-антигена, біонавантаження, білкового азоту, співвідношення екстинкції E-260/E-280.

Проведення іонно-обмінної хроматографії на колонковому сорбенті в 0,04 М фосфатному буфері при рН 7,0. На цій стадії визначають біонавантаження, білковий азот і D-антиген. Для очищення вірусних вакцин може використовуватися макропористе скло, одержуване шляхом обробки двофазного натрієво-боросилікатного скла спочатку кислим, а потім лужним розчином. При такій обробці зі скла вилучаються всі компоненти боратної фази, а багата кремнеземом фаза зберігається в пористому склі у вигляді губчастого скелету, утвореного майже чистим кремнеземом. Поверхня макропористого скла утворюється у водних розчинах, тому вона гідратована, несе групи типу Si-OH або Si-(OH)₂ і виявляє властивості слабкого катіоніту. Було встановлено, що взаємодія вірусів з поверхнею макропористого скла зумовлена низкою взаємодій (іонна, гідрофобна та ін.). Вірус зв'язується з поверхнею сорбенту вибірково, оскільки конкурує з молекулами домішок за місце на поверхні сорбенту. Взаємодію вірусу із сорбентом послаблюють трис-HCl, NaCl, сечовина. Для десорбції вірусу з

сорбенту підвищують рН елюенту, а також його іонну силу через збільшення концентрації хлористого натрію і трису.

Стандартизація суспензії вірусу здійснюється шляхом розведення середовищем 199, водою для ін'єкцій, буферними солями (карбонат і фосфати натрію) і стабілізатором (гліцин).

Отриману стандартизовану суспензію вірусу піддають стерилізуючій фільтрації через мембрани з розміром пор 0,22 мкм. На цій стадії препарат контролюють на стерильність, титр вірусу, рН (величину якого за необхідності коригують 1М NaOH), вміст D-антигена.

Інактивація одержаної суспензії вірусу проводиться у дві стадії:

1) до суспензії додають розчин формальдегіду і витримують 6–7 діб при температурі 35 °С, постійно контролюючи величину рН, і при її зрушенні в кислу сторону (менше 7,0) до суспензії додають 1М розчин NaOH;

2) суспензію піддають стерилізуючій фільтрації через мембранні фільтри з розміром пор 0,22 мкм. Після цього проводять подальшу інактивацію до 13 діб.

Із інактивованої суспензії вірусу (*in bulk*) відбирають проби для контролю на стерильність та повноту інактивації. Контроль інактивації вірусу проводять на первинній культурі клітин, найбільш чутливих до вірусу поліомієліту: використовують два зразки з об'ємом матеріалу, еквівалентним 1500 людським дозам, які додаються до культури клітин таким чином, щоб зразок припадав на 3 см². Спостереження проводять протягом 2 тижнів. Також проводяться тести клітинної ДНК (не більше 10 нг на 1 людську дозу), вмісту D-антигенних одиниць (вірусу типу 1 – не менше 300, типу 2 – не менше 60, типу 3 – не менше 240), вільного формальдегіду – не більше 0,2 г/л, білкового азоту – не більше 100 мкг/мл, бактеріальних ендотоксинів – не більше 50 МО/мл, величина рН – 6,8–7,4, бичачого сироваткового альбуміну – не більше 500 нг/мл. Ефективність вакцини визначають методом ELISA або методом *in vivo* на щурах. Десятьом щурам вводять внутрішньом'язово по 0,5 мл вакцини в підібраних розведеннях. Щури, відібрані для цього випробування, повинні бути перевірені на відсутність антитіл до вірусу поліомієліту. Через 21 день після імунізації у щурів проводиться забір крові. Сироватка, отримана з цих зразків, контролюється методом ELISA на титр нейтралізації проти трьох типів вірусу поліомієліту. На період контролю вакцина зберігається при температурі 2–8 °С.

Вакцину *in bulk* різних типів вірусу об'єднують, розводять у встановлених співвідношеннях фосфатним буфером (до складу буферного розчину входять натрій дигідрофосфат моногідрат, динатрій гідрофосфат дигідрат, натрію хлорид, калію хлорид, магнію сульфат гептагідрат, кальцію хлорид і феноловий червоний) до регламентованих кількостей антигенних одиниць D.

Схема одержання вакцини проти поліомієліту показана на рис. 4.18.



Рисунок 4.18 – Схема отримання вакцини проти поліомієліту

Препарат контролюють за вказаними тестами. *Після завершення контролю вакцину розливають в первинну упаковку* (скляні ампули або флакони). Готовий препарат контролюють відповідно до рекомендацій ВООЗ, вимог Європейської фармакопеї та нормативної документації фірми виробника. У готовому препараті визначають: вміст D-антигенів (в 1 мл вакцини повинні міститися D-антигенні одиниці: типу 1 – не менше 40, типу 2 – не менше 8, типу 3 – не менше 32), рН (6,8–7,4), білковий азот (не більше 10 мкг/мл), бактеріальні ендотоксини (не більше 10 МО/мл), стерильність, об'єм наповнення (не менше 1,1 мл). Контроль здійснюється при порівнянні з референс-препаратом – міжнародними стандартами, що є ліофільно висушеними сироватками крові людини, які містять антитіла до вірусу поліомієліту типів 1, 2 та 3. Ці стандарти необхідні для калібрування національних стандартів.

Таким чином, на сьогоднішній день світова спільнота використовує для профілактики поліомієліту два види вакцин: живу оральну та інактивовану внутрішньом'язову.

У 2002 році Технічна консультативна група ВООЗ обговорила три можливі варіанти після ерадикації поліомієліту:

- глобальне припинення імунізації ОПВ із заміною або без заміни її на ІПВ за рішенням конкретної країни;
- заміна ОПВ на ІПВ у всіх країнах;
- створення нової живої вакцини, що не має нейровірулентності та трансмісильності.

Експерти ВООЗ дійшли висновку, що найбільш реальним є перший варіант і є обґрунтовані причини для припинення щеплення живою полівакциною у зв'язку з тим, що її застосування створює ризики: повернення паралітичного поліомієліту внаслідок появи вакцино-споріднених вірусів з нейровірулентними властивостями; виникнення вакцино-асоційованих випадків паралітичного поліомієліту. Не виключається можливість використання для профілактики поліомієліту ІПВ, яка позбавлена перерахованих вище недоліків.

Ще у 1999 році ВООЗ переглянула рекомендації на користь чотирьох доз ІПВ. Хоча ІПВ дорожче, ніж ОПВ, тенденція до застосування ІПВ посилюється завдяки введенню комбінованих вакцинних препаратів, що містять антигени ІПВ, АКДПа, НіВ та гепатиту В.

Оскільки це інфекційне захворювання поборене за допомогою вакцинації, велика увага приділяється на побічних ефектах при застосуванні вакцин. Основною проблемою ОПВ є вищезазначене повернення (у поодиноких випадках) до нейровірулентності з подальшою появою асоційованого поліомієліту. Реверсія найбільш поширена для вірусу вакцини типу 3, менша – для типу 2, і вкрай рідко – для типу 1. При пероральному введенні вакцини в кишечнику дітей переважно розмножуються ревертанти, які мають нейровірулентність.

Таким чином, існує дві протилежні думки щодо використання вакцин проти поліомієліту. З одного боку, ВООЗ стверджує, що щойно буде зафіксовано останній випадок поліомієліту, вакцинацію ОПВ слід припинити. Ретельний контроль дозволить виявити пізніші випадки захворювання, які стримуватимуться шляхом інтенсивної вакцинації на навколишній території. Інша думка полягає в тому, що ОПВ слід поступово заміщати на ІПВ протягом кількох років. США, наприклад, обрали останній підхід. Міркування на користь цього підходу такі: 1) здатність поліовірусу виживати в навколишньому середовищі; 2) наявність лабораторних та виробничих запасів поліовірусу дикого типу; 3) циркуляція реверсованого вакцинного вірусу. Як згадувалося раніше, поява АКДПа, що містять ІПВ-вакцин, сприятиме здійсненню цього зсуву в практиці вакцинації. Проблемою в даному випадку є вартість ІПВ, яка вища, ніж у ОПВ, і можливість забезпечити цією вакциною країни, що розвиваються. В результаті може виявитися, що застосовуватиметься один підхід для одних країн, і інший – для інших.

Оскільки в ІПВ використовуються інактивовані вірулентні дикі штами поліовірусу. Це супроводжується високим ризиком безпеки при вакцинації дітей. У зв'язку з цим було запропоновано для отримання ІПВ використовувати атенуйовані штами *Sabin*, така вакцина отримала назву sІПВ. Вакцина пройшла кілька стадій клінічного вивчення та продемонструвала високу імуногенність та безпечність.

Роботи над створенням різних форм вакцин проти поліомієліту проводяться постійно. Однією із перспективних форм поліомієлітних вакцин є рослинні вакцини. Вакцини на рослинній основі можуть бути отримані шляхом доставки трансгену в пластиди або ядерний геном або з використанням систем вірусної експресії на основі РНК. Їстівні рослини, такі як морква, салат або томати, не містять токсичних сполук і потребують міні-

мальної обробки для приготування пероральних вакцин, наприклад, у формі таблеток. Такі форми важливі для індукції імунної відповіді слизових оболонок у місцях розмноження поліовірусів. Крім того, природна інкапсуляція та ад'ювантно-внутрішні ефекти, що властиві компонентам рослинних клітин, можуть додатково посилювати дію експресованих вірусних антигенів. Тимчасова експресія може забезпечити високий вихід білка за короткий час. Переваги експресії хлоропластів включають зменшену мінливість через позиційні ефекти, відсутність «мовчання» генів. Необхідно також враховувати можливість вирощування штучних культур у відкритому полі через материнське успадкування геному хлоропластів. Вищий рівень експресії білка може бути досягнутий завдяки великій кількості копій ДНК на хлоропласт і великій кількості органел на клітину листа. Обмеженням хлоропластів є їх бактеріальне походження, що призводить до обмежених посттрансляційних модифікацій та проблем із укладанням білків. Трансгенні рослини, а також методи транзитornoї експресії успішно використовувалися для отримання поліовірусних антигенів та вірусопобічних частинок (VPL) у рослинах.

Отримано злитий фрагмент із 15 амінокислот, отриманих з капсидних білків VP3 і VP1 (штам *Sabin type I*), з білком вірусу тютюнової мозаїки. Злитий білок експресували в транзитornoї формі в рослинах тютюну з виходом 0,2 мг на 1 г свіжого листа. Мишей імунізували внутрішньочеревно один або два рази по 200 мкг очищених частинок рекомбінантного вірусу тютюнової мозаїки, емульгованих в монофосфориλλіпіді А і диміколаті трегалози як ад'юванті. Внутрішньочеревна імунізація химерними частинками вірусу тютюнової мозаїки призводила до індукції специфічних антитіл. У 2016 році проводили експресію на основі хлоропластів в рослинах тютюну для отримання капсидного білка VP1, злитого з субодиницею холерного токсину (рівень експресії становив 2,6 мг/г сухої ваги). Імуногенність тестували на мишах за схемою, що включає підшкірне введення ІПВ з подальшим пероральним бустерним введенням ліофілізованого рослинного матеріалу з ад'ювантом, який містить сквален або сапонін, або обидва. Серопозитивність становила 70–90 %. Титри специфічних антитіл IgA та IgG значно збільшилися в порівнянні з нижчими титрами, отриманими при імунізації без рослинної тканини. Докладно технології рослинних вакцин описані у розділі 3.3.

Відтоді як Всесвітня асамблея охорони здоров'я прийняла рішення викоринити поліомієліт у всьому світі, з 1988 року кількість випадків поліовірусу в усьому світі скоротилася більш ніж на 99 %: з приблизно 350 000 випадків у 1988 році до 175 зареєстрованих випадків у 2019 році. При цьому вірус залишається епідемічним у кількох країнах.

Україна повністю забезпечена вакцинами для профілактики поліомієліту, так у жовтні 2022 року в Україну було привезено 600 000 доз ОПВ та 99 720 ІПВ, що забезпечує повне проведення імунізації згідно з Календарем щеплень.

Сьогодні в Україні використовуються декілька вакцин як комплексних, так моно препаратів, які містять поліомієлітний компонент:

- ✓ Бустрикс™ – комплексна вакцина проти дифтерії, кашлюка (ацелюлярна вакцина), правця, поліомієліту (інактивована вакцина, яка містить 3 штами вірусу поліомієліта, розмножені на культурі Vero), ін'єкційна, виробництва *GlaxoSmithKline*, Бельгія;

- ✓ Поліо Сабін™ – 2-валентна жива вакцина, що містить 2 штами вірусу поліомієліту 1 і 3, розмножені на культурі Vero, оральна, виробництва *GlaxoSmithKline*, Бельгія;

- ✓ Гексаксим® – комплексна вакцина проти дифтерії, кашлюка (ацелюлярна вакцина), правця, гепатиту В, Ні- інфекції та поліомієліту (інактивована вакцина, яка містить 3 штами вірусу поліомієліту, розмножені на культурі Vero), ін'єкційна, виробництва *Sanofi Aventis*, Франція;

- ✓ Інфанрикс Гекса™ – комплексна вакцина проти дифтерії, кашлюка (ацелюлярна вакцина), правця, гепатиту В, Ніб-інфекції та поліомієліту (інактивована вакцина, яка містить 3 штами вірусу поліомієліту, розмножені на культурі Vero), ін'єкційна, виробництва *GlaxoSmithKline*, Бельгія;

- ✓ Імовакс Поліо – 3-валентна інактивована вакцина, яка містить 3 штами вірусу поліомієліту типу 1, 2 і 3, розмножені на культурі Vero, ін'єкційна, виробництва *Sanofi Aventis*, Франція, та ін.

4.2.5. Вакцини для профілактики гепатиту В

Гепатит В – захворювання, що передається парентеральним або статевим шляхом і є дев'ятою причиною захворюваності та смертності на планеті. Інфікування вірусом гепатиту В викликає різні клінічні прояви:

блискавичну, гостру, хронічну та приховані форми гепатиту. Блискавична та гостра форми є вкрай важкими і мають високу смертність. Хронічний гепатит відповідає за поширення вірусу і потенційно може розвинути у цироз та рак печінки. У всьому світі понад 350 млн осіб є носіями вірусу гепатиту В. Приблизно у 25 % носіїв розвивається цироз печінки або карцинома, що призводить до смерті. *Вакцинопрофілактика є єдиним ефективним способом запобігання цьому захворюванню.*

Вірус гепатиту В (HBV) є членом родини гепаднавірусів. Вірусна частинка (віріон) складається із зовнішньої ліпідної оболонки та ядра – ікосаедричного нуклеокапсиду, що складається з ядерних білків і нуклеїнової кислоти. Нуклеокапсид включає вірусну ДНК і ДНК-полімеразу, яка є зворотною транскриптазою. Зовнішня оболонка містить вбудовані білки, які беруть участь у зв'язуванні вірусів та проникненні у чутливі клітини (рис. 4.19).

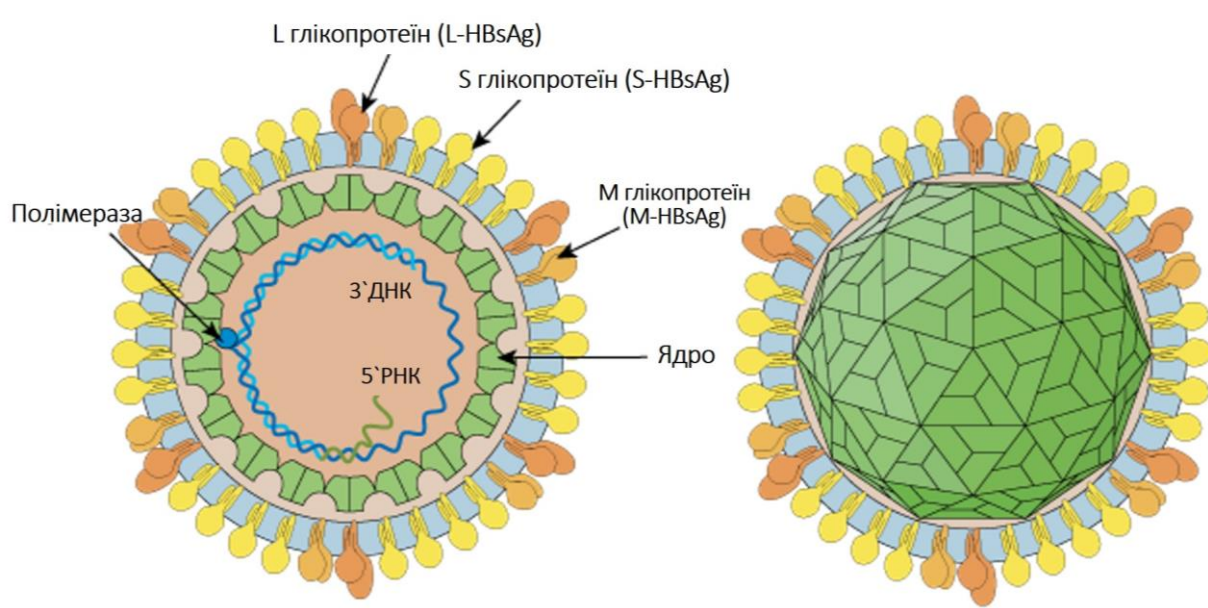


Рисунок 4.19 – Схема віріона вірусу гепатиту В

Вірус гепатиту В – один із найменших вірусів тварин в оболонці. Віріони розміром 42 нм, здатні інфікувати гепатоцити. Крім цих частинок, у сироватці інфікованих людей можна виявити ниткоподібні та сферичні тільця без ядра. Ці частинки не є інфекційними і складаються з ліпідів та білків, які утворюють частину поверхні віріону, які називаються поверхневими антигенами (HBsAg) та виробляються у надлишку протягом життєвого циклу вірусу.

Спочатку було створено вакцину для профілактики гепатиту В, яку одержували з плазми людини. Дуже цікавим є досвід, накопичений у ході створення інактивованої вакцини проти вірусу гепатиту В, який, як відомо, не культивується *in vitro* і не розмножується в організмі придатних для широкого використання тварин. Клітини печінки людей, хронічно інфікованих вірусом гепатиту, виділяють надлишок вірусного поверхневого білка, тобто поверхневого антигена гепатиту В (HBsAg) в кров у вигляді вірусоподібних частинок розміром 22 нм з захисними епітопами. Тому для виробництва вакцини було запропоновано виділяти з плазми клінічно здорових антигеноносіїв поверхневий антиген (HBsAg), очищати та концентрувати його, а потім інактивувати формаліном. Антиген виділяли за допомогою ультрацентрифугування, хроматографії та ферментативної обробки. Отриманий препарат інактивували для знищення вірусу гепатиту В та інших потенційно патогенних для організму людини контамінантів. Препарат проходив клінічні випробування у США, Франції, Англії, Голландії, Японії. Однак у зв'язку з технологічними труднощами при отриманні вакцини, обмеженістю в сировині та можливості контамінації препарату ця вакцина не набула широкого застосування.

За минулі роки було запропоновано технології отримання вакцин проти гепатиту В. На нашу думку, на увагу заслуговує технологія, запропонована рядом вчених-біотехнологів. Курячі ембріони заражають безпосередньо в алантоїсну рідину рекомбінантним вірусом вісповакцини, що експресує HBsAg. Після зараження курячі ембріони поміщають на 72 год при 37 °С, після чого охолоджують протягом 18 год при 4–5 °С. Потім в асептичних умовах збирають алантоїсну рідину. ІФА методом визначають вміст HBsAg, якого має бути не менше 300 нг/мл алантоїсної рідини. Алантоїсну рідину піддають стерилізуючій фільтрації через мембрани з розміром пор 0,22 мкм. Отриманий розчин концентрують у 4 рази на мембранах з порогом відсікання 15 кДа. До отриманого концентрованого розчину додають 0,01 М фосфатний буферний розчин (рН 7,2), що містить 0,15 М хлориду натрію і проводять діафільтрацію. Вихід HBsAg на цій стадії становить 83 %. У концентраті проводять контроль, що підтверджує відсутність вірусу. Виділення антигена здійснюють методом імуноафінної хроматографії з використанням специфічних поліклональних анти-HBsAg антитіл, виділених з козиної сироватки за допомогою сірчаноокислого амонію. Імуносорбент готують на основі CN-Br-активованої сефарози 4В. Ко-

лонку заповнюють підготовленим сорбентом та наносять матеріал, що містить HBsAg. Колонку промивають 0,15 М фосфатним буферним розчином (pH 7,2), що містить 0,15 М NaCl, а потім 0,15 М Na₂HPO₄ (pH 9,5) та 0,15 М KH₂PO₄ (pH 5,0). Десорбцію HBsAg проводять елююванням цитратно-фосфатним буферним розчином з pH 2,2. Отримані фракції контролюють на наявність HBsAg, об'єднують і нейтралізують. Вихід HBsAg становить 73 % від вихідного матеріалу. Отриманий антиген контролюють відповідно до вимог, які висуваються до антигена для конструювання вакцини.

З 1987 року стали доступні дві ліцензовані рекомбінантні вакцини, що виробляються дріжджами і містять головний поверхневий білок (S-білок) вірусу гепатиту В (HBsAg). Ці вакцини виготовляються лідерами виробництва вакцин: *Merck Sharp & Dohme* (США) та *SmithKline Beecham* (Бельгія). Оцінка, проведена FDA, визнала безпечність вакцини проти гепатиту В на основі дослідження 12 млн доз, введених дітям віком до 12 місяців. Вакцина продемонструвала високу ефективність для захисту від гепатиту В. В даний час рекомбінантну вакцину для профілактики гепатиту В випускають: *GlaxoSmithKline* (Бельгія), *Heber Biotec* (Куба), *Berna Biotech* (Корея), *Instituto Butantan* (Бразилія) та ряд інших виробників.

У більшості бактерій є ще один тип генетичних елементів, які існують у клітинах автономно, тобто незалежно від хромосом. Це плазмиди, які є типовими репліконами. Термін «плазмиди» вперше був застосований Джошуа Ледербергом для визначення всіх позахромосомних спадкових детермінант. Як і всі реплікони, вони мають здатність до саморегуляції незалежно від механізмів, які регулюють розмноження бактеріальної хромосоми. *Плазмиди* – лінійні чи кільцеві ковалентно замкнуті молекули ДНК, які містять від 1500 до 40 000 пар нуклеотидів. Плазмідна ДНК не перевищує кількох відсотків від загального вмісту ДНК у хроматині. Основною особливістю плазмід є їхня здатність до автономної реплікації та трансмісії (здатність до самопередачі). *Плазмиди складаються із трьох груп генів*: ділянок ДНК, що відповідають за автономну реплікацію плазмиди в клітині; генів, які забезпечують здатність плазмід до перенесення з однієї клітини до іншої; генів, які визначають корисні властивості для клітин господаря. Плазмиди успішно використовуються у генній інженерії.

Існує кілька *методів виділення плазмід*, наприклад, з використанням неіонного детергенту тритону X-100 та виділення за допомогою детерген-

ту додецилсульфату натрію. Суспензію бактеріальні клітини, наприклад, *E. coli*, збирають в середині логарифмічної фази росту (для отримання максимального лізису клітини); центрифугують при 10 000 об/хв при 5 °C протягом 10 хв; осад ресуспендують у буферному розчині (0,05 М трис, 0,005 М ЕДТА, 0,05 М NaCl, pH 8,0); осад повторно відокремлюють центрифугуванням при зазначених параметрах, ресуспендують у 25 %-вому розчині сахарози в буферному розчині (0,05 М трис, 0,001 М ЕДТА, pH 8,0) та охолоджують; додають розчин 5 мг/мл лізоциму в буфері (0,25 М трис, pH 8,0). Наступні стадії проводять одним із методів:

Метод з використанням тритону X-100: додають лізуючу суміш (10 % тритон X-100, 1 М трис, 0,25 М ЕДТА, pH 8,0), ретельно перемішують і витримують при 0 °C протягом 20 х; суміш центрифугують при 35 000 g протягом 20 хв при 5 °C на центрифугі *Beckman* (ротор JA-20). Цим методом від основної маси хромосомної ДНК відокремлюється близько 95 % плазмід. Фракцію піддають подальшому очищенню та концентруванню центрифугуванням у градієнті щільності хлористого цезію у присутності бромистого етидію.

Метод з використання додецилсульфату натрію: додають лізуючу суміш (20 % розчин додецилсульфату натрію), ретельно перемішують і витримують 10 хв при 0 °C (протягом цього часу клітини лізуються і розчин стає в'язким); осаджують хромосомну ДНК 3 М NaCl до кінцевої концентрації 1 М, залишають пробу на 2 год для формування осаду при температурі 0 °C; осаджують високомолекулярну хромосомну ДНК і всі залишки клітин протягом 30 хв при 17 000 об/хв при 5 °C і відокремлюють розчин, збагачений плазмідною ДНК; для видалення РНК додають рибонуклеазу (5 мг/мл) та проводять інкубування протягом 1 год при 37 °C; для депротейнізації додають рівний об'єм насиченого трисом фенолу. Суміш центрифугують при 5000 об/хв і відокремлюють фракцію, що містить плазмідну ДНК; додають 2 об'єми етанолу (при мінус 20 °C) і залишають на ніч при мінус 20 °C; осад ДНК, який випав, осаджують центрифугуванням при 12 000 g протягом 20 хв при температурі мінус 10 °C; розчиняють осад ДНК у трис-буфері.

Розглянемо приклад отримання HBsAg за допомогою спеціально розробленої системи з використанням інтегруючого вектора на метилотрофних дріжджах *Pichia pastoris*. Спочатку ген HBsAg вбудували між промотором гена алкогольоксидази 1 (AOX1p) та сигналом термінації – поліаде-

нілування (AOX1t) того ж гена. Регуляція активності гена AOX1 *P. pastoris* здійснюється за допомогою метанолу – у його присутності на частку алкогольоксидази може припадати до 30 % всіх білків клітини, а у відсутності метанолу алкогольоксидаза не синтезується взагалі.

Вектор, спеціально сконструйований для цих досліджень, містив такі елементи: 1) блок AOX1p-HBsAg-AOX1t; 2) сайт ініціації реплікації, що функціонує у *P. pastoris*; 3) фрагмент ДНК, що містить сайт ініціації реплікації плазміді pBR322 та селективний маркер *E. coli*; 4) фрагмент 3-OX1, що сприяє інтеграції клонованої ДНК у певний сайт хромосоми; 5) активний ген гістидинолдегідрогепази (HIS4), що кодує фермент, який бере участь у синтезі амінокислоти гістидину. Наявність у цій конструкції послідовностей pBR322 дозволяє використовувати для роботи з нею *E. coli*, що полегшує клонування та при необхідності дозволяє отримувати велику кількість векторної ДНК. Клон інтегрували фрагментом AOX1p-HBsAg-AOX1t при рості в присутності метанолу, який активує AOX1-промотор, який синтезує у великих кількостях автентичний білок HBsAg, що накопичується в цитоплазмі. Щоб запобігти втраті плазміді, була передбачена інтеграція ділянки AOX1p-HBsAg-AOX1t у геном *P. pastoris*. Для цього штам *P. pastoris* HIS4 з дефектним геном гістидинолдегідрогепази трансформували фрагментом вектора, що містить елементи AOX1p-HBsAg-AOX1t, HIS4 і 3'-AOX1. В результаті подвійного кросинговеру між AOX1p і 3'-AOX1 введеної ДНК з одного боку і комплементарними послідовностями хромосомної ДНК з іншого відбулася інтеграція послідовностей AOX1p-HBsAg-AOX1t і HIS4 в геном, що супроводжується втратою хромосомного гена. Клітини, у геном яких включився ген HIS4, ростуть на середовищі без гістидину – ця ознака може використовуватися для їх відбору. Другим критерієм відбору є уповільнення росту клітин у присутності метанолу, оскільки після втрати гена AOX1 в результаті подвійного кросинговеру активним залишається лише один, менш ефективний ген AOX2.

Рекомбінантна вакцина для профілактики гепатиту В є субодиничною вірусною вакциною, що містить HBsAg. Вакцину одержують з використанням культури модифікованих дріжджів. Препарат очищають за допомогою послідовних технологічних процесів, що включають хроматографію, ультрацентрифугування в градієнті хлористого цезію або бромистого калію, обробку формаліном. Вакцина містить 20 мкг HBsAg в 1 мл.

Для експресії клонованих еукаріотичних генів інтенсивно використовуються дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*. Існує принаймні п'ять причин, що зробили цей вид улюбленим об'єктом біотехнологів:

1. Дріжджі є одноклітинними мікроорганізмами, які просто культивуються в лабораторних та промислових умовах, а їхня генетика, біохімія та фізіологія добре вивчені.

2. Виділено та охарактеризовано декілька промоторів цих дріжджів, а для систем ендогенних дріжджових експресуючих векторів можуть використовуватися природні, так звані 2 мкм-плазмід.

3. Відносна простота очищення гетерогенних кінцевих продуктів, які секретуються в поживне середовище, тому що дуже невелика кількість власних білків дріжджів секретується в середовище.

4. У клітинах *S. cerevisiae* здійснюється велика кількість посттрансляційних модифікацій.

5. У США організацією FDA дані мікроорганізми визнані безпечними, що ґрунтується на багаторічному використанні дріжджів у хлібопекарській та пивоварній промисловості.

Аналіз представлених матеріалів дозволяє запропонувати схему одержання рекомбінантних продуктів:

- одержання ДНК та введення її у плазмідний вектор;
- трансформація та виявлення необхідного клону;
- вирощування культури та виділення плазмід;
- визначення нуклеотидної послідовності клонованого фрагмента ДНК;
- конструювання плазмід для експресії;
- трансформація та виявлення необхідного клону;
- вирощування культури та виділення плазмід;
- перевірка нуклеотидної послідовності ДНК;
- трансформація та вирощування культур для виробництва білка – HBsAg послідовності ДНК;
- трансформація та вирощування культур для виробництва білка – HBsAg.

Одержання рекомбінантної вакцини проти гепатиту В. Штам (дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* або *Hansenula polymorpha*) використовується як продуцент HBsAg у виробництві рекомбінантної вакцини проти гепатиту В. Штам був модифікований методом мутагенезу за допомогою

5-фтороротової кислоти з відбором стійкого фенотипу, а потім трансформований плазмідом рН-HBs, з наступною селекцією клонів трансформантів.

Штам являє собою клітини овальної форми розміром 3–15 мкм, частина клітин має дочірні утворення – «бруньки», які іноді досягають розмірів материнської клітини. Клітини ростуть на повних органічних та синтетичних середовищах, що містять глюкозу, гліцерин або метанол як єдине джерело вуглецю. При рості на щільних середовищах клітини формують гладкі круглі колонії білого кольору з рівними краями. На рідких середовищах культура має вигляд рівномірної суспензії. Клітини ростуть у температурних межах 4–42 °С. При рості на селективних середовищах клітини штаму виявляють прототрофні ознаки. Клітини штаму вирощуються в умовах ферментації з використанням 0,5 % метанолу як індуктора промотора MOX (метанолоксидаза) і, відповідно, експресії гена, що кодує HBsAg у кількості не менше 150 мг/л ферментаційного середовища. Зберігають штам у рідкому середовищі, що містить 2 % глюкози, 15 % гліцерину, 0,7 % азоту дріжджових середовищ при температурі мінус 70 °С. Вирощування проводять при 30 °С.

В даний час виробники вакцини проти гепатиту В використовують різні штами-продуценти та методи виділення антигена.

Технологічний цикл отримання вакцини складається з наступних стадій (рис. 4.20):

Ферментація виробничих штамів. Ферментація культури *Hansunela polymorpha* з інтегрованою копією плазмиду проводиться на середовищі, що складається з глюкози, гліцерину та метанолу, який даний штам використовує як єдине джерело вуглецю та енергії. Проводиться три генерації:

- ✓ 1 генерація протягом 45–48 год при 30–37 °С;
- ✓ 2 генерація протягом 20–24 год при 30–37 °С;
- ✓ 3 генерація (виробнича) протягом 72–120 год при 30 °С.

У процесі культивування проводиться контроль: контамінації культури (при мікроскопічному дослідженні не повинні виявлятися клітини мікроорганізмів, відмінні від дріжджів), вмісту дріжджових клітин за визначенням оптичної густини, сухої ваги (більше 100 г/л), рН середовища (6,5–7,5), кількості розчиненого кисню.



Рисунок 4.20 – Схема отримання вакцини проти гепатиту В

При культивуванні рекомбінантних мікроорганізмів необхідно підбирати спеціальні умови, а саме: тип реактора, тип мішалки, конструктив-

ні особливості реактора, температурні умови, тиск повітря, оскільки клітини рекомбінантних мікроорганізмів більш крихкі, ніж нетрансформовані клітини, оскільки частина енергетичних витрат витрачається на синтез чужорідних білків. і в результаті утворюється менш міцна клітинна стінка. Найпоширеніша відповідь клітин на зовнішній вплив – це зменшення кількості всіх білків, що синтезуються, у тому числі і рекомбінантних. Під впливом ряду факторів можуть змінюватися фізико-хімічні властивості клітин, що ускладнює подальшу технологічну роботу з ними, наприклад, може збільшуватись кількість полісахаридів або білків. Враховуючи цей факт, поява таких компонентів (полісахаридів, білків або ліпідів) може надалі ускладнювати очищення HBsAg.

Отриману культуру дріжджових клітин охолоджують до 10–15 °С і відокремлюють від культуральної рідини шляхом ультрацентрифугування при 10–15 °С. Біомасу клітин промивають буферними розчинами для повного видалення залишків поживного середовища.

Дезінтеграцію клітин *H. polyomorpha* проводять гомогенізацією високого тиску. Важливою умовою на цьому етапі є одноразовий силовий вплив з мінімальним виділенням тепла. При цьому утворюється екстракт, що містить різні білки та HBsAg. Гомогенізацію проводять на гомогенізаторах високого тиску, наприклад, фірм LKB (Швеція), Manton Gaulin (США), Laval (Швеція).

Отриманий екстракт з HBsAg обробляють з метою осадження баластних білків зруйнованих клітин таким чином, щоб у надосадній рідині знаходився неочищений розчин HBsAg. Одним із виробників вакцини для осадження баласту використовується ПЕГ, який додають при 2–8 °С. Отримана суміш для формування осаду витримується протягом 16–24 год за вказаної температури. Потім осад відокремлюється, надосадна рідина, що містить HBsAg, обробляється адсорбентом, в якому сорбується антиген. Адсорбент відокремлюють центрифугуванням, промивають та за допомогою сольових розчинів проводять десорбцію HBsAg. Кожен виробник визначає адсорбент на власний розсуд, наприклад, це може бути аеросил.

Отриманий розчин, що містить антиген, піддають іонообмінній хроматографії, збирають фракції з HBsAg, які потім об'єднують. Для видалення солей та концентрації розчину проводять ультрафільтрацію з подальшим ультрацентрифугуванням у градієнті хлористого цезію. За даними

інших виробників, вони використовують градієнт бромистого калію. Розчин очищають від солей ультрафільтрацією.

Отриманий розчин антигена піддають *молекулярно-розподільчій хроматографії*, після чого обробляють формаліном при 37 °С протягом 72–96 год. Для видалення вільного (незв'язаного з білком) формаліну проводять *ультрафільтрацію з наступною стерилізуючою фільтрацією* через мембрани з розміром пор 0,22 мкм.

Концентрований розчин HBsAg контролюють відповідно до рекомендацій ВООЗ: проводять визначення вмісту ліпідів (30–100 мкг на 100 мкг білка), полісахаридів (не більше 10 мкг на 100 мкг білка), ДНК (не більше 250 мкг на 100 мкг білка), формаліну (менше 0,01 %), цезію (не більше 25 мкг на 100 мкг білка), броміду (не більше 50 мкг на 100 мкг білка), білка (150–250 мкг/мл), стерильності (відсутність росту бактерій і грибів), ІФА аналіз (справжність HBsAg), SDS-PAGE (має виявлятися білок з молекулярною масою 23 кДа (95 %) і димер – 46 кДа).

Якщо якість препарату відповідає всім перерахованим вимогам, то очищений матеріал (*in bulk rHBsAg*) *розводять фосфатним буфером і піддають стерилізуючій фільтрації* на мембранах з розміром пор 0,22 мкм. До отриманого розчину додають *стерильну суспензію гідроксиду алюмінію* (адьювант) у фосфатному буфері. Адсорбцію проводять протягом щонайменше 2 год при кімнатній температурі. До суспензії додають стерильний розчин *мертіоляту* до кінцевої концентрації 0,01 %.

У табл. 4.10 наведено показники, за якими різні виробники контролюють готовий препарат вакцини.

Таблиця 4.10 – Характеристика вакцин проти гепатиту В різних виробників

Показник	Виробник, країна походження		
	Heber Biotec, Куба	Green Cross, Корея	Biotechnologia, Бразилія
Опис	Суспензія білого кольору	Суспензія білого кольору	Суспензія білого кольору
pH	6,4–7,4	5,4–7,4	6,6–7,4
Стерильність	Стерильний	Стерильний	Стерильний
Пірогени	Апірогенний	Апірогенний	Апірогенний
Аномальна токсичність	Атоксичний	Атоксичний	Атоксичний

Закінчення табл. 4.10

Показник	Виробник, країна походження		
	Heber Biotec, Куба	Green Cross, Корея	Biotechnologia, Бразилія
Вміст білка, мкг/мл	Від 13 до 30	Не більше 40	Не більше 25
Ідентифікація антигена по мол. масі	24 і 46 кДа	—	23 і 46 кДа
Специфічна активність (відносна) <i>in vitro</i>	Не менше 0,75	Не менше 0,65	0,65–1,2
Алюмінію, мг/мл	0,35–0,65	Менше 1,25	Менше 1,25
Мертиоляту, мг/мл	0,03–0,07	0,03–0,07	0,03–0,07

Під час обговорення рекомбінантних вакцин необхідно зупинитися на ще одному питанні – *туморогенній дії рекомбінантних препаратів*. Присутність у препаратах клітинної гетерологічної ДНК у великій концентрації становить онкогенну небезпеку, оскільки ДНК може викликати ін-активацію супресорних онкогенів або активацію протоонкогенів після її інтеграції з клітинним геномом. На вимогу ВООЗ рівень такої гетерологічної ДНК у вакцинах не повинен перевищувати 100 пг на одну дозу.

Отримання рекомбінантного очищеного HBsAg проводиться вже більше 35 років, причому використовуються різні системи експресії і методи очищення антигена. Наприклад, запропоновано метод імуноафінної хроматографії для очищення HBsAg. Очищення рекомбінантного HBsAg, отриманого у стабільній клітинній лінії китайського хом'ячка (CHO), проводили з використанням системи *LinxTM Affinity Purification System* (Invitrogen, США). HBs-Ag, секретований лінією CHO, очищали імуноафінною хроматографією з використанням мишачого моноклонального антитіла, яке у свою чергу було індуковано проти нативного HBs-Ag. Очищене моноклональне антитіло кон'югували з фенілдиборною кислотою та іммобілізували на носії для імуноафінної хроматографії. Слід зазначити, що фенілборна кислота є широко використовуваним лігандом для захвату моноклональних антитіл, отриманих в клітинній культурі, наприклад, лінії CHO. Метод, на думку розробників, простий і швидкий у порівнянні з діючими методами ультрацентрифугування. Крім того, цей метод відрізняється зниженням собівартості продукту. При цьому вдається виділити антиген безпосередньо з супернатанту клітин ссавців із чистотою понад

80 %. Інші автори запропонували використання матриці *Sepharose C4* як підкладки для імуносорбції при використанні моноклональних мишачих антитіл до HBs-Ag. Водночас, ряд дослідників вважають використання імуноафінної хроматографії для отримання очищеного HDs-Ag через не постійну густину ліганду, високу вартість компонентів, витікання ліганду та ряд інших факторів. Крім того, імуноафінну хроматографію досить складно масштабувати у виробничих об'ємах.

Запропоновано альтернативний метод замість імуноафінної хроматографії – інтегрувати неафінні хроматографічні методи (хроматографію гідрофобної взаємодії та ексклюзивну хроматографію) для ефективного виділення HBs-Ag, експресованого *P. pastoris*. Оптимізація такого процесу не є тривіальним та простим завданням, оскільки різні молекулярні характеристики експресованого HBs-Ag у кожному типі клітин-господарів викликають різні взаємодії в процесах неафінної хроматографії. Запропоновано склад робочого буфера та параметрів хромаографії, що визначають ефективність гідрофобної хроматографії. Найкращий результат для гідрофобної хроматографії був досягнутий при використанні буфера сульфату амонію в концентрації насичення 10 % при рН 7,0 з середовищем *Fast Flow Butyl-S Sepharose 6* з подальшим елююванням Твін-100 та сечовиною. У цьому процесі вилучення, чистота та загальний вихід становлять близько 84, 82 та 69 %, відповідно. Збільшивши масштаб гідрофобної хроматографії та інтегрувавши його з *Sephacryl S-400* ексклюзійною хроматографією отримана чистота вище 90 % вірусоподібних частинок VLP-HBs-Ag.

Всесвітньою організацією охорони здоров'я розроблено *основні вимоги до генно-інженерних продуктів*, зокрема до рекомбінантних вакцин. Ці вимоги викладено у ряді технічних доповідей ВООЗ і полягають вони у наступному:

1. Повинні бути наведені описи клітини-господаря, джерело їх походження та історії одержання культури, а також опис експресуючого вектора, що використовується у виробництві. Ці описи повинні включати подробиці про походження та ідентичність клонованого гена, а також генетику і структуру експресуючого вектора. Необхідний повний опис джерела отримання та функції компонентів вектора, такі як область початку реплікації, промотори або індикатори резистентності до антибіотиків, карта розщеплення рестриктаз, що показує щонайменше ті сайти, які використо-

вуються в конструкції. Необхідно докладно описувати метод, за допомогою якого вектор вводиться в клітину-господаря, стан вектора в клітині, тобто має бути детально описано або вектор інтегрований, або знаходиться поза хромосомою із зазначенням кількості реплік. Особливу увагу приділено питанням документального підтвердження генетичної стійкості поєднання «господар—вектор».

2. Необхідно вказати послідовність нуклеотидів вставленого гена та фланкуючих контрольних ділянок експресуючого вектора.

3. При виробництві препаратів необхідно докладно описати заходи стимулювання та контролю експресії гена, що клонується в клітині-господарі.

4. ВООЗ рекомендовано основні вимоги контролю виробництва. Виробництво продукту генної інженерії має ґрунтуватися на системі посівних серій, до складу якої входить банк робочих клітин виробника та походження головної серії. Клітини-господарі, які містять експресуючий вектор, повинні клонуватися і використовуватися для створення головної серії посівного матеріалу. У процесі отримання посівного матеріалу одночасно в одній і тій же лабораторії або одними і тими самими фахівцями не повинні оброблятися інші лінії клітин. Необхідно мати повну інформацію про походження, форму, зберігання та середню тривалість життя посівного матеріалу при передбаченому ступені його використання. Також мають бути передбачені докази стабільності системи експресії «господар—вектор» у банку посівного матеріалу в умовах зберігання та взяття у виробництво. При використанні для виробництва вищих еукаріотів при встановленні ідентичності посівного матеріалу є дуже зручними клітинні маркери, які дозволяють відрізнити клітини, наприклад, специфічні ізоферменти або імунологічні особливості.

5. Вкрай важливим є отримання відомостей про онкогенність безперервних ліній клітин. Послідовність ДНК клонованого гена повинна бути підтверджена на стадії головної серії посівного матеріалу. Однак у деяких випадках, наприклад, коли у геном безперервної лінії клітин вставляють множинні копії генів, може бути незручним визначати послідовність ДНК клонованого гена на стадії головної серії посівного матеріалу. У цих випадках можуть бути інформативними саузерн-блот сумарної клітинної ДНК і нозерн-блот транскриптів, що містять послідовність продукту.

6. Суттєвими є доказові дослідження, спрямовані на підтвердження відсутності у серії посівного матеріалу інфекційних агентів (бактерій, мікоплазм, вірусів, грибів), а також бажано підтвердити відсутність онкогенних агентів.

7. Особливу увагу необхідно приділяти контамінації вірусами тканин тварин, у тому числі тих, із яких створюються лінії клітин. Належна виробнича практика (GMP) рекомендує встановлювати критеріїв відбраковування збору клітин або припинення введення цієї культури. Причинами відбраковування може бути контамінація культури одним з перерахованих агентів, відхилення виходу продукту, яке не повинно перевищувати встановлені межі.

8. Повинна бути встановлена молекулярна цілісність експресованого гена, а також фенотипні та генотипні характеристики клітини-господаря після тривалого вирощування культури; має бути регламентована максимальна тривалість використання безперервної культури на підставі інформації щодо стабільності системи.

9. При виробництві, заснованому на обмеженій кількості пасажів, має бути встановлена та специфікована максимальна кількість подвоєнь клітин або пасажів, дозволених при виробництві.

10. Процес виробництва повинен передбачати технологічні процедури для очищення від баластних компонентів, пов'язаних з самим продуктом або з клітинами-господарями: білків, нуклеїнових кислот, вуглеводів, ліпідів або інших контамінуючих агентів, у тому числі компонентів поживних середовищ і хімічних реактивів, що використовуються в процесі очищення.

Виконання цих вимог значною мірою визначає ефективність та безпечність одержуваних препаратів.

Перша рекомбінантна вакцина проти гепатиту В під назвою «ЕнджеріксTM» була створена компанією *SmithKline Beecham*. За минулі роки вакцинами проти гепатиту В було вакциновано мільйони людей, і ефективність цього препарату вже не викликає сумніву. Імунізація стандартними вакцинами для профілактики гепатиту В, що містять рекомбінантний HBs-Ag, приводить до формування імунної відповіді за класичним шляхом, тобто через презентуючі клітини до Т-хелперних лімфоцитів (CD4), які впізнають молекули II класу головного комплексу гістосумісності на антигенпрезентуючих клітинах. Т-хелпери запускають механізм диференці-

ації HBs-специфічних В-лімфоцитів у плазматичні клітини, що продукують анти-HBs-імуноглобуліни класу G. Таким чином, під час первинної імунної відповіді на вакцину відбувається формування як Т-, так В-лімфоцитів пам'яті, які забезпечують швидку (до 4 днів) і сильну імунну відповідь у разі контакту імунізованої людини з нативним збудником.

Створення вакцин проти вірусу гепатиту В продовжується. Фірма *GlaxoSmithKline* розробила та ліцензувала вакцину *Fendrix*®. Це також рекомбінантна вакцина, в якій антиген гепатиту HBs-Ag отриманий на клітинах дріжджів *S. cerevisiae*. У складі вакцини присутній поверхневий антиген у дозі 20 мкг, як ад'ювант використаний AS04C у кількості 50 мкг/дозу (3-0-дезоцил-4'-монофосфорилліпід А), адсорбований на фосфаті алюмінію 0,5 мг. Використання даного ад'юванту дозволило збільшити імуногенність вакцини *Fendrix*®.

Підсумовуючи, необхідно зазначити, що сьогодні рекомбінантна вакцина проти гепатиту В є єдиною ефективною вакциною проти даної інфекції і використовується у всіх країнах, які проводять вакцинацію проти гепатиту В. Численні спроби створити інші форми вакцин проти гепатиту В виявилися безуспішними. Робота з дослідження цих вакцин продовжується і до сьогодні. Створення альтернативних вакцин диктується тим, що лише 90–95 % вакцинованих дають позитивну відповідь. Запропоновано вакцини з синтетичних пептидів, які є фрагментами оболонки вірусу гепатиту В (HBsAg), інкапсульовані в олігосахаридні мікроносії або ліпосоми. Проте після вивчення імунної відповіді на тваринах авторам довелося визнати низьку ефективність запропонованих препаратів. Використовувана у якості вакцини ДНК була вивчена на лабораторних тваринах і пройшла контроль на добровольцях у США в 2005 році, проте також не підтвердила терапевтичної ефективності запропонованого препарату.

Водночас, проводилися розробки зі створення рекомбінантної вакцини з підвищеною імуногенністю. Така вакцина була схвалена FDA у 2017 році. Нова вакцина проти гепатиту В під назвою *HEPLISAV-B*® (виробник *Dynavax Technologies Corporation*, США) була ліцензована для дорослих віком від 18 років у 2018 році. Перевагою цієї вакцини є той факт, що потрібно лише дві дози з інтервалом в 1 місяць замість трьох доз протягом 6-місячного періоду. Вакцина містить рекомбінантний HBs-Ag, отриманий на дріжджах *H. polymorpha*. До складу вакцини введено запатентований ад'ювант – агоніст Toll-подібного рецептора TLR9, олігодезо-

ксинуклеотид, який містить імуностимулюючий CpG, який стимулює В-клітини та плазмацитоїдні дендритні клітини шляхом зв'язування з TLR9. Первинними лігандами для рецепторів TLR9 є неметильовані фосфатгуанізинові (CpG) олігонуклеотиди. Активність TLR9 індукує запальні процеси, що призводять до посиленого знищення мікроорганізмів та ракових клітин, а також виникнення адаптивних імунних відповідей. CpG – цитозинфосфогуанін синтетична форма ДНК, що імітує бактеріальний та вірусний генетичний матеріал. CpG як ад'ювант пройшов клінічні випробування, він збільшує концентрацію антитіл, стимулює популяцію хелперних (CD4+) і цитотоксичних (CD8+) клітин та викликає стійкі відповіді Т-і В-клітин пам'яті. У клінічних дослідженнях у дорослих віком 40–70 років рівень серопротекції проти HBs-Ag у вакцинованих осіб склав 96,6 % через 4 тижні після другої ін'єкції, що вище, ніж у людей, вакцинованих звичайною вакциною проти гепатиту В. Через 4 тижні після третьої вакцинації рівень серопротекції також мав значні відмінності у осіб, яким вводили досліджувану ISS та звичайну вакцину (100 % проти 73,1 %). Ад'ювант CpG широко досліджується при отриманні вакцин, наприклад, отримана вакцина з ад'ювантом CpG та нейрамінідазою вірусу грипу, що демонструє високий рівень захисту у мишей, заражених вірусом грипу.

Останніми роками з'являються дослідження присвячені створенню терапевтичних вакцин проти гепатиту В. Відомо, що для звільнення організму господаря від вірусу гепатиту В необхідні як вроджені, так і адаптивні гуморальні та клітинні імунні відповіді. Елімінація віріонів у клітинах печінки залежить переважно від відповідей Т-клітин. З використанням різних генів (Р, С, S, preS) вірусу гепатиту В із застосуванням різних методів, заснованих на білку, комплексі «білок-антитіло», пептидах, ДНК, зроблено спроби створення терапевтичної вакцини проти гепатиту В, спрямованої на стимуляцію гуморального або клітинного імунітету. Показані специфічні гуморальні та/або імунні клітинні реакції на експериментальних тваринах і людині. Проте необхідно подальше вивчення перспективності створення лікувальної вакцини. Певна надія на створення терапевтичної вакцини з'являється після створення ад'юванту CpG 1018, який сприяє розвитку субпопуляції Т-хелперів Th1, яка необхідна для захисту від інфекцій, викликаних вірусами та внутрішньоклітинними бактеріями.

У розділі 5.5.1 наведені сучасні дані щодо створення вакцин для профілактики гепатиту В, зокрема дані про комерційну ліпосомальну вак-

цину *НераХеп* фірми *Lірохеп*. Пр застосуванні цієї вакцини рівень антитіл у 20 разів перевищує рівень специфічних антитіл порівняно з використанням неліпосомальної вакцини. У зв'язку з цим, виникла реальна можливість зменшити профілактичну дозу вакцини і кількість ін'єкцій.

4.3. Комбіновані вакцини

Комбіновані вакцини можуть бути отримані шляхом групування декількох антигенів в одну ін'єкцію, що є ефективним і важливим способом підвищення рівня вакцинації. ВООЗ розділила комбіновані вакцини на два типи:

- 1) вакцини, що містять кілька антигенів в одному препараті і захищають від більш ніж одного захворювання,
- 2) вакцини, що містять різні штами або серотипи одного і того ж організму, що запобігають одній інфекційній хворобі.

Дитячі комбіновані вакцини широко застосовуються з 1940-х років. В даний час у всьому світі ліцензовані та широко використовуються п'ять комбінованих вакцин. Вакцина проти кашлюку, дифтерії та правця з комбінованими дифтерійно-правцевими анатоксинами та цілісноклітинною кашлюковою вакциною (АКДП-DPT) є однією з таких вакцин, яка була рекомендована для немовлят та дітей молодшого віку в період з 1990-х. До 2020 року охоплення третьою дозою вакцини проти дифтерії, правця і кашлюку (DPT) склало 74 %. Комбінована п'ятивалентна вакцина проти дифтерії/правця/ кашлюку/гепатиту В/інактивованого поліомієліту (DTP-HBV-IPV) та дифтерії/правця/безклітинного коклюшу/інактивованого поліомієліту/ кон'югована вакцина проти *Haemophilus influenzae* типу В (DTaP-IPV- Hіb) ліцензовані в 2002 та 2008 роках відповідно. Комбінована шестивалентна вакцина проти дифтерії/правця/безклітинного кашлюку/гепатиту В/інактивованого поліомієліту/ кон'югованої Hіb (DTaP-HBV-IPV-Hіb) була ліцензована в 2010 році в якості первинної вакцини для немовлят і для використання як бустерної дози другого року життя.

У таблиці 4.11 наведено склад комбінованих вакцин.

Таблиця 4.11 – Склад комбінованих вакцин

Назва вакцини, виробник	Дифтерійний анатоксин	Правцевий анатоксин	Кашлюкові антигени	Антигени вірусу поліомієліту	Очищений по- лісахарид Hib	HBs-Ag,
<i>Infanrix Hexa™</i> , <i>GlaxoSmithKline</i> <i>Biologicals S.A.</i> , Бельгія	Не менше 25 Lf / 30 IU	Не менше 10 Lf / 40 IU	ФГА – 25 мкг, ПРН – 8 мкг, кашлюковий токсин – 25 мкг.	Тип-1 штам <i>Mahoney</i> – 40 D-АО; Тип-2 штам MEF – 8 D-АО; Тип 3 штам <i>Sauket</i> – 32 D-АО	10 мкг, кон'югований з правцевим ана- токсином як носієм протеїну	10 мкг
<i>Daptacel®</i> , <i>Sanofi Pasteur</i> , <i>Inc.</i> , США	15 Lf	5 Lf	ФГА – 5 мкг, ПРН – 3 мкг, кашлюковий токсин – 10 мкг, фі- мбрії типу 2 і 3 – 5 мкг.	Тип-1 штам <i>Mahoney</i> – 40 D-АО; Тип-2 штам MEF – 8 D-АО; Тип 3 штам <i>Sauket</i> – 32 D-АО.	–	–
<i>Vaxelis®</i> , <i>Sanofi</i> <i>Pasteur / MSD /</i> <i>MCM</i> , США, Канада, Фран- ція, Нідерланди	Не менше 20 IU	Не менше 40 IU	ФГА – 20 мкг, ПРН – 3 мкг, кашлюковий токсин – 20 мкг, фі- мбрії типу 2 і 3 – 5 мкг.	Тип-1 штам <i>Mahoney</i> – 40 D-АО; Тип-2 штам MEF – 8 D-АО; Тип 3 штам <i>Sauket</i> – 32 D-АО.	3 мкг, кон'югований з протеїном ме- нингококу – 50 мг	10 мкг
АКДП, Біолік, Україна	15 Lf	5 Lf	Кашлюкові мікробні клітини – 10 МОО.	–	–	–
<i>DTaP</i> , <i>Sanofi</i> <i>Pasteur, Inc.</i>	15 Lf	5 Lf	ФГА – 5 мкг, ПРН – 3 мкг, кашлюковий токсин – 10 мкг, фі- мбрії типу 2 і 3 – 5 мкг.	–	–	–

Примітка. Lf – limit of flocculation, флокулюючі одиниці; IU – International Units, міжнародні одиниці; МОО – міжнародні оптичні одиниці; D-АО – D-антигенних одиниць; ФГА – філаментозний гемагглютинін; ПРН – пертактин.

До комбінованих вакцин належить вакцина MMR проти кору, епідемічного паротиту і краснухи, до складу якої входять три штами атенуйованого вірусу. Різні виробники використовують для виробництва вакцин атенуйовані штами вірусів:

➤ *Priorix (GlaxoSmithKline Biologicals, Бельгія)* містить штами: кору (*Schwarz* – не менше ніж 10^3 CCID50), епідемічного паротиту (*RiT 4385* – не менше ніж $10^{3,7}$ CCID50), краснухи (*Wistar RA 27/3* – не менше ніж 10^3 CCID50);

➤ *Trimovax (Sanofi Pasteur, США)* містить штами: кору (*Edmoston* – не менше ніж 1000 (3,0 lg) CCID50), епідемічного паротиту (*Jeryl Lynn* – не менше ніж 10000 (4,0 lg) CCID500, краснухи (*Wistar RA 20/3* – не менше ніж 1000 (3,0 lg) CCID50).

Як видно, незважаючи на те, що штами вакцин відрізняються, їхня активність достатня близька.

Безпечність та імуногенність вакцин для дітей, які вводяться одночасно, – це вкрай актуальні питання, оскільки з'являються нові антигени та зростають зусилля, спрямовані на те, щоб прищеплювати дітей дошкільного віку за першої ж нагоди. Комбіноване введення всіх вакцин, які потрібні дитині, – це важлива стратегія, покликана забезпечити виконання щеплень за календарем. Чим більше разів батькам доводиться водити дитину на щеплення до медичних закладів, тим більша ймовірність того, що дитина пропустить якісь щеплення та залишиться незахищеною. Практика використання комбінованих вакцин – це безпечна та ефективна практика.

Перевагами комбінованих вакцин є:

- ✓ менші психологічні навантаження на дитину;
- ✓ оптимальний вибір клінічного стану для вакцинації;
- ✓ максимальний контроль за проведенням вакцинації.

Однак залишаються й невирішені питання, на які ми сьогодні не можемо відповісти повною мірою.

Необхідно докладно вивчити:

- ❖ ризик побічних реакцій, які можуть відбуватися після застосування комбінованих препаратів;
- ❖ вплив одного з антигенів на імуногенність іншого компонента комбінованої вакцини;
- ❖ кількісна оцінка безпечності та ефективності комбінованої вакцинації.

При конструюванні комбінованих вакцин обов'язковим є вивчення таких факторів:

- фізико-хімічної сумісності антигенів, ад'ювантів, консервантів та інших компонентів, що входять до складу вакцини;
- стабільність багатокomпонентних комбінацій антигенів;
- різна тривалість набутого імунітету в окремих компонентів комбінованої вакцини.

Вкрай важливим є вплив одного компонента вакцини на протективні властивості іншого. Наприклад, у Європі за останні роки було зареєстровано дві вакцини, що містять 6 антигенів для профілактики дифтерії, правця, кашлюку, поліомієліту, гепатиту В та НіВ-інфекції. При вивченні імуногенності цієї вакцини у США було виявлено зниження титру антитіл проти НіВ-антигена порівняно з моновакциною. Це стало причиною відмови реєстрації цієї вакцини у США. В Україні сьогодні використовується вакцина INFANRIX-HEXATM, що містить 6 компонентів: дифтерійний та правцевий анатоксини, інактивовані формальдегідом; ацелюлярний компонент, представлений пертактином (м.м. 69 кДа), гемаглютинін, кашлюковий токсин, інактивовані глютаровим альдегідом та формальдегідом; HBsAg; інактивовані віруси поліомієліту типу 1 штамп *Mahoney*, типу 2 – штамп MEF-1, типу 3 – штамп *Saukett*, що знаходяться у вигляді сорбованої суспензії у шприці (консервант 2-феноксіетанол); вакцина НіВ, ліофілізована у флаконі. Перед використанням вміст шприця переноситься у флакон, розчиняється та вводиться у вигляді 6-валентної вакцини.

Як приклад ефективності використання комбінованих вакцин можна навести досвід бельгійських вчених які вивчали ефективність вакцини *TwinrixTM* (*SmithKline Beecham Biologicals*). Ця вакцина містить антигени проти гепатиту А та В. Показано, що через три роки позитивна реакція сироватки досліджуваних дітей та дорослих на антитіла до вірусу гепатиту А становила 100 %, а 94 % вакцинованих мали позитивні захисні титри сироватки по відношенню до гепатиту В. За цими показниками не виявлено відмінностей у порівнянні із використанням моновакцин. Комбінована вакцина проти гепатитів А та В продемонструвала свою безпечність, хорошу переносимість, високий рівень імуногенності як для дорослих, так і для дітей. Комбінована вакцина зручніша і знижує вартість при застосуванні порівняно з моновалентною вакциною. Аналогічні дані, що підтверджують високу ефективність, безпечність та економічну доцільність при за-

стосуванні, отримані під час використання багатьох комбінованих препаратів. Водночас показано, що діти, які отримали комбіновану вакцину DTaP-HBV-Hib, мали нижчі рівні антиправцевих антитіл, ніж група, що отримала моновакцину проти правця. Таким чином, використання комбінованих вакцин призводить до меншої кількості ін'єкцій, що полегшує численні імунізації для пацієнтів – дітей, батьків та працівників охорони здоров'я.

Досвід показує, що розробка комбінованих вакцин – це більше, ніж просте змішування антигенів. Можлива несумісність чи взаємна інтерференція між самими антигенами, ад'ювантами чи консервантами робить обов'язковим тестування кожного складу на стабільність, ефективність і, що дуже важливо, безпечність. Однак із використанням комбінованих вакцин не все так однозначно. Незважаючи на багаторічне застосування для імунізації дітей комбінованих вакцин, їх вивчення триває до сьогодні. Безпечність комбінованих вакцин має першочергове значення через їх ширше застосування серед здорових дітей порівняно з окремими вакцинами. ВООЗ у 2019 році опублікувала заяву щодо побоювань щодо безпечності комбінованих вакцин: «Загалом ліцензовані комбіновані вакцини так само безпечні та ефективні, як і вакцини проти однієї хвороби». Водночас деякі дослідження показують, що комбіновані вакцини не завжди такі безпечні та ефективні, як окремі вакцини. Ще в 1995 році автори зазначали, що при використанні комбінованих вакцин АКДП існує ризик фебрильних судом, що збільшується після введення вакцини АКДП. У 2012 році проведено дослідження в Данії, що також показало підвищений ризик фебрильних судом після вакцинації DTaP-IPV-Hib. Дослідження, проведені в Європі (Німеччина та Італія) показали, що раптова несподівана смертність збільшилася після застосування комбінованої вакцини DTaP-HBV-Hib-IPV. Існує думка, що необхідно проводити постійний контроль за застосуванням комбінованих вакцин для оцінки їх ефективності.

І на останок, наявні в літературі результати свідчать про те, що комбіновані вакцини DTaP-IPV-Hib, DTaP-IPV-Hib-HbsAg та ін. є безпечними, добре переносяться і являють собою імуногенні альтернативи окремим вакцинам у дітей. Комбінована вакцина DTaP-HBV-IPV-Hib показала відносно високі показники захворюваності на лихоманку, проте ці показники залишалися нижчими за кумулятивні показники захворюваності на лихоманку, пов'язану з усіма вакцинами.

Запитання для самоконтролю

1. Які захворювання входять до календаря щеплень України?
2. Назвіть основні стадії виробництва дифтерійного анатоксину.
3. Назвіть основні стадії виробництва правцевого анатоксину.
4. Які контрольні параметри регламентовані ВООЗ для анатоксинів?
5. Які види вакцин проти кашлюку вам відомі? Яка різниця у їх складі та способі одержання?
6. Які основні та допоміжні компоненти входять до складу АКДП-вакцини?
7. Які штами мікобактерій називаються слабкими, а які сильними?
8. Які альтернативи вакцині BCG відомі на сьогоднішній день?
9. Що входить до складу кон'югованих Ніб-вакцин? На прикладі Ніб-вакцини поясніть переваги кон'югованих вакцин.
10. Які основні штами вірусів кору, краснухи та ендемічного паратиту використовуються для виробництва вакцин?
11. Назвіть основні етапи виробництва моновакцин проти вірусів кору, краснухи та ендемічного паратиту?
12. Назвіть основні етапи виробництва комбінованої вакцини проти кору, краснухи та ендемічного паратиту?
13. Назвіть основні контрольні параметри для вірусних вакцин на прикладі вакцин проти кору, краснухи та ендемічного паратиту?
14. Які переваги аерозольних вакцин та вакцин на основі пластирів з мікроголками порівняно з ін'єкційним підшкірним введенням?
15. У чому переваги та недоліки живої оральної та інактивованої вакцин проти поліомієліту?
16. Назвіть основні етапи виробництва живої вакцини проти поліомієліту.
17. Назвіть основні етапи виробництва інактивованої вакцини проти поліомієліту.
18. У чому особливість вакцини проти гепатиту В у порівнянні з іншими вірусними вакцинами календаря щеплень?
19. Назвіть основні етапи виробництва вакцини проти гепатиту В.
20. Які ліцензовані комбіновані вакцини Вам відомі? Які компоненти входять до їх складу?
21. У чому переваги і недоліки комбінованих вакцин?

Список джерел інформації до розділу 4

1. Герасименко В. Г. Біотехнологія: Підручник / В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін. – Київ : Фірма «ІНКОС», 2006. – 647 с.
2. Гильчук П. В. Оценка методов ренатурации для промышленного получения рекомбинантных белков из телец включения *E. coli* в биологически активной форме / П. В. Гильчук // Біополімери і клітини. – 2004. – Т. 20(3). – С. 182-192.
3. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1-3.
4. Краснопольский Ю. М. Биотехнология иммунобиологических препаратов: монография / Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская. – Харьков : Фармитек, 2008. – 312 с.
5. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов : учеб. пособ. / Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2009. – 351 с.
6. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ. Часть I : учеб. пособ. / Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2012. – 303 с.
7. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ. Часть II : учеб. пособ. / Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2013. – 192 с.
8. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: аспекты фармацевтической химии : учеб. пособ. / Ю. М. Краснопольский, О. В. Звягинцева. – Харьков : НТУ "ХПИ", 2018. – 247 с.
9. Краснопольський Ю. М. Фармацевтична біотехнологія: Біотехнології виробництва готових лікарських форм : навч. посіб. / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : ТОВ «ДРУКАРНЯ МАДРИД», 2020. – 279 с.
10. Краснопольський Ю. М. Фармацевтична біотехнологія: сьогодення та майбутнє : навч. посіб. / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : ТОВ «Друкарня Мадрид», 2022. – 151 с.
11. Краснопольський Ю. М. Створення систем доставки антигенів та ліків на основі штучних і природних ліпідних наночастинок: ліпосоми та екзосоми : монографія / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : Друкарня Мадрид, 2023. – 179 с.

12. Смирнов В. В. Імунобіологічні препарати: довідник / В. В. Смирнов. – Київ : Моріон, 2001. – 186 с.
13. Чернишева Л. І. Імунопрофілактика інфекційних хвороб: навч.-метод. посіб. / Л. І. Чернишева, Ф. І. Лаптії, А. Н. Волока та ін. – Київ : «Медицина», 2022. – 336 с.
14. Badizadegan K. The potential role of using vaccine patches to induce immunity: platform and pathways to innovation and commercialization / K. Badizadegan, J. L. Goodson, P. A. Rota, K. M. Thompson // Expert review of vaccines. – 2020. – V. 19(2). – P. 175–194. – <https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1732215>
15. Belcher T. Live attenuated Bordetella pertussis vaccine candidate BPZE1 transiently protects against lethal pneumococcal disease in mice / T. Belcher, H. Kammoun, L. Coutte et al. // Vaccine. – 2022. – V. 40(11). – P. 1555–1562. – <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.01.025>
16. Campbell J. D. Development of the CpG Adjuvant 1018: A Case Study / J. D. Campbell // Methods in molecular biology. – 2017. – V. 1494. – P. 15–27. – https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6445-1_2
17. Capeding M. R. Safety and immunogenicity of a new inactivated polio vaccine made from sabin strains: a randomized, double-blind, active-controlled, phase 2/3 seamless study / M. R. Capeding, G. D. Gomez-Go, P. Oberdorfer et al. // The Journal of infectious diseases. – 2022. – V. 226(2). – P. 308–318. – <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa770>
18. Chang M. J. Genetically detoxified tetanus toxin as a vaccine and conjugate carrier protein / M. J. Chang, M. Ollivault-Shiflett, R. Schuman et al. // Vaccine. – 2022. – V. 40(35). – P. 5103–5113. – <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.07.011>
19. Decker M. D. Comparative trial in infants of four conjugate Haemophilus influenzae type b vaccines / M. D. Decker, K. M. Edwards, R. Bradley, P. Palmer // The Journal of pediatrics. – 1992. – V. 120(2 Pt 1). – P. 184–189. – [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(05\)80424-x](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(05)80424-x)
20. de la Torre Arrieta J. A thermostable tetanus/diphtheria (Td) vaccine in the StablevaX™ pre-filled delivery system / J. de la Torre Arrieta, D. Briceño, I. G. de Castro, B. Roser // Vaccine. – 2023. – V. 41(22). – P. 3413–3421. – <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.04.039>
21. da Silva e Mouta S. Simple immunoaffinity method to purify recombinant hepatitis B surface antigen secreted by transfected mammalian cells / S. da Silva e Mouta, C. Otávio Alves Vianna, I. Ennes et al. // Journal of chromatography. – 2003. – V. 787(2). – P. 303–311. – [https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(02\)00954-6](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(02)00954-6)

22. Dotiwala F. Granulysin: killer lymphocyte safeguard against microbes / F. Dotiwala, J. Lieberman // *Current opinion in immunology*. – 2019. – V. 60. – P. 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.04.013>
23. D  x A. Measles virus and rinderpest virus divergence dated to the sixth century BCE / A. D  x, S. Lequime, L. V. Patrono et al. // *Science*. – 2020. – V. 368(6497). – P. 1367–1370. – <https://doi.org/10.1126/science.aba9411>
24. Edens C. A microneedle patch containing measles vaccine is immunogenic in non-human primates / C. Edens, M. L. Collins, J. L. Goodson et al. // *Vaccine*. – 2015. – V. 33(37). – P. 4712–4718. – <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.02.074>
25. Fang T. Expression, purification and characterization of diphtheria toxin mutant CRM 197 in *E. coli* / T. Fang, Z. Tao, Y. Liu et al. // *Chinese journal of biotechnology*. – 2018. – V. 34(4). – P. 561–568. – <https://doi.org/10.13345/j.cjb.170333>
26. Farrington P. A new method for active surveillance of adverse events from diphtheria/tetanus/pertussis and measles/mumps/rubella vaccines / P. Farrington, S. Pugh, A. Colville et al. // *Lancet*. – 1995. – V. 345(8949). – P. 567–569. – [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(95\)90471-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(95)90471-9)
27. Franco A. R. Developing New Anti-Tuberculosis Vaccines: Focus on Adjuvants / Franco A. R., Peri F. // *Cells*. – 2021. – V. 10(1). – ID 78. – <https://doi.org/10.3390/cells10010078>
28. Fritzell B. Efficacy and safety of a *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide-tetanus protein conjugate vaccine / B. Fritzell, S. Plotkin // *The Journal of Pediatrics*. – 1992. – V. 121(3). – P. 355–362. – [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(05\)81786-x](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(05)81786-x)
29. Gilsdorf J. R. Hib Vaccines: Their Impact on *Haemophilus influenzae* Type b Disease / J. R. Gilsdorf // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2021. – V. 224(12 Suppl 2). – P. S321–S330. – <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa537>
30. Goffin P. High-yield production of recombinant CRM197, a non-toxic mutant of diphtheria toxin, in the periplasm of *Escherichia coli* / P. Goffin, M. Dewerchin, P. De Rop et al. // *Biotechnology journal*. – 2017. – V. 12(7). – <https://doi.org/10.1002/biot.201700168>
31. Goodson J. L. Innovations in vaccine delivery: increasing access, coverage, and equity and lessons learnt from measles and rubella elimination / J. L. Goodson, P. A. Rota // *Drug delivery and translational research*. – 2022. – V. 12(5). – P. 959–967. – <https://doi.org/10.1007/s13346-022-01130-9>
32. Hamidi A. Process development of a new *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine and the use of mathematical modeling to identify process optimization possibilities / A. Hamidi, H. Kreeftenberg, L. V. D. Pol et al. // *Biotechnology progress*. – 2016. – V. 32(3). – P. 568–580. – <https://doi.org/10.1002/btpr.2235>

33. Hassan J. Potential of microneedle systems for COVID-19 vaccination: current trends and challenges / Hassan J., Haigh C., Ahmed T. et al. // *Pharmaceutics*. – 2022. – V. 14(5). – ID 1066. – <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14051066>
34. Heath P. T. Haemophilus influenzae type B conjugate vaccines: a review of efficacy data / P. T. Heath // *The Pediatric infectious disease journal*. – 1998. – V. 17(9). – P. S117–S122. – <https://doi.org/10.1097/00006454-199809001-00005>
35. HEPLISAV-B. Heplisav B : EPAR - Product. – 2021. – 25 p. – URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/heplisav-b-epar-product-information_en.pdf
36. Herbert J. A. Immune response to viruses / Herbert J. A., Panagiotou S. – *Encyclopedia of Infection and Immunity*, 2022. – P. 429–444. – <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00235-4>
37. Hosseini S. N. Large-scale purification of recombinant hepatitis B surface antigen from *Pichia pastoris* with non-affinity chromatographic methods as a substitute to immunoaffinity chromatography / S. N. Hosseini, A. Javidanbardan, B. S. Alizadeh Salim, M. Khatami // *Preparative biochemistry & biotechnology*. – 2018. – V. 48(8). – P. 683–692. – <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1487854>
38. Hudu S. A. Hepatitis B therapeutic vaccine: a patent review / S. A. Hudu, A. O. Jimoh, K. G. Ibrahim, A. S. Alshrari // *Pharmaceutics*. – 2022. – V. 15(12). – ID 1542. – <https://doi.org/10.3390/ph15121542>
39. INFANRIX hexa : Adsorbed Hib reconstituted with PEDIARIX. Product monograph including patient medication information. – GSK Inc., 2014. – 33 p. – URL: <https://ca.gsk.com/media/6247/infanrix-hexa.pdf>
40. Ioshimoto L. M. Safety and immunogenicity of hepatitis B vaccine ButaNG in adults / L. M. Ioshimoto, M. L. Rissato, V. S. Bonilha et al. // *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. – 1999. – V. 41(3). – P. 191–193. – <https://doi.org/10.1590/s0036-46651999000300011>
41. Joyce J. C. A microneedle patch for measles and rubella vaccination is immunogenic and protective in infant rhesus macaques / J. C. Joyce, T. D. Carroll, M. L. Collins et al. // *The Journal of infectious diseases*. – 2018. – V. 218(1). – P. 124–132. – <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy139>
42. Just M. Reactogenicity and immunogenicity of a recombinant hepatitis B vaccine compared with a plasma-derived vaccine in young adults / M. Just, R. Berger, V. Just // *Postgraduate medical journal*. – 1987. – V. 63(2). – P. 121–123.
43. Keech C. Immunogenicity and safety of BPZE1, an intranasal live attenuated pertussis vaccine, versus tetanus-diphtheria-acellular pertussis vaccine: a randomised, double-blind, phase 2b trial / C. Keech, V. E. Miller, B. Rizzardi et

- al. // Lancet. – 2023. – V. 401(10379). – P. 843–855. – [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)02644-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02644-7)
44. Kelkar D. S. Proteogenomic analysis of Mycobacterium tuberculosis by high resolution mass spectrometry / D. S. Kelkar, D. Kumar, P. Kumar et al. // Molecular & cellular proteomics : MCP. – 2011. – V. 10(12). – ID M111.011627. – <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.011445>
 45. Lin A. Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 induces a broad antibody response in humans / A. Lin, D. Apostolovic, M. Jahnmatz et al. // The Journal of clinical investigation. – 2020. – V. 130(5). – P. 2332–2346. – <https://doi.org/10.1172/JCI135020>
 46. Liu F. J. Evaluation of recombinant tetanus toxin subunit vaccine / F. J. Liu, D. Y. Shi, Z. Y. Li et al. // Toxicon. – 2020. – V. 187(1). – P. 75–81. – <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.08.001>
 47. Liu B. Immunogenicity and safety of childhood combination vaccines: a systematic review and meta-analysis / B. Liu, B. Cao, C. Wang et al. // Vaccines. – 2022. – V. 10(3). – ID 472. – <https://doi.org/10.3390/vaccines10030472>
 48. Mansoor I. Microneedle-based vaccine delivery: review of an emerging technology / I. Mansoor, H. A. Eassa, K. H. A. Mohammed et al. // AAPS PharmSciTech. – 2022. – V. 23(4). – ID 103. – <https://doi.org/10.1208/s12249-022-02250-8>
 49. Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. – World Health Organization, 2013. – 312 p. – URL: – <https://iris.who.int/handle/10665/80681>
 50. Method for producing Hib conjugate vaccine using low molecular weight PRR. – Patent WO 2018074296 A1. – 2017.
 51. Moon S. S. Microneedle patch as a new platform to effectively deliver inactivated polio vaccine and inactivated rotavirus vaccine / S. S. Moon, M. Richter-Roche, T. K. Resch et al. // NPJ vaccines. – 2022. – V. 7(1). – ID 26. – <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00443-7>
 52. Panaiotov S. Complete genome sequence, genome stability and phylogeny of the vaccine strain Mycobacterium bovis BCG SL222 Sofia / S. Panaiotov, Y. Hodzhev, V. Tolchkov et al. // Vaccines. – 2021. – V. 9(3). – ID 237. – <https://doi.org/10.3390/vaccines9030237>
 53. Przedpelski A. A Novel High-Potency Tetanus Vaccine / A. Przedpelski, W. H. Tepp, S. Pellett et al. // mBio. – 2020. – V. 11(4). – ID e01668-20. – <https://doi.org/10.1128/mBio.01668-20>
 54. Priorix combined measles, mumps and rubella vaccine, live attenuate. Product monograph. – GSK Inc., 2024. – 23 p. – URL: – <https://ca.gsk.com/media/6254/priorix.pdf>

55. Puliyel J. Infanrix hexa and sudden death: a review of the periodic safety update reports submitted to the European Medicines Agency / J. Puliyel, C. Sathiyamala // Indian journal of medical ethics. – 2018. – V. 3(1). – ID 43–47. – <https://doi.org/10.20529/IJME.2017.079>
56. Rasi V. Improved purification of human granzyme A/B and granulysin using a mammalian expression system / V. Rasi, O. A. Hameed, P. Matthey et al. // Frontiers in immunology. – 2022. – V. 13. – ID 830290. – <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.830290>
57. Recommendations for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccine // WHO Technical Report Series. – 1992. – No. 800 – P. 80-170.
58. Recommendations for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccine // WHO Technical Report Series. – 2005. – No. 927. – P. 138-147.
59. Recommendations for the production and control of the acellular pertussis component of monovalent or combined vaccines // WHO Technical Report Series. – 1998. – No. 878. – P. 57-77.
60. Recommendations for the production and control of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines // WHO Technical Report Series. – 2000. – No. 897. – P. 27-60.
61. Recommendations for the production and control of poliomyelitis vaccine (inactivated) // WHO Technical Report Series. – 2002. – No. 910. – P. 32-66.
62. Recommendations for the production and control of poliomyelitis vaccine (oral) // WHO Technical Report Series. – 2002. – No. 904. – P. 31-93.
63. Recommendations to Assure the Quality, Safety and Efficacy of Recombinant Hepatitis B Vaccines // WHO Technical Report Series. – 2013. – No. 889. – P. 191-240.
64. Requirements for measles, mumps and rubella vaccines and combined vaccine (live) // WHO Technical Report Series. – 1994. – No. 840. – P. 100-202.
65. Requirements for dried BCG vaccine // WHO Technical Report Series. – 1985. – No. 745. – P. 60-92.
66. Requirements for dried BCG vaccine // WHO Technical Report Series. – 1988. – No. 771. – P. 212.
67. Sun Y. Risk of febrile seizures and epilepsy after vaccination with diphtheria, tetanus, acellular pertussis, inactivated poliovirus, and Haemophilus influenzae type B / Y. Sun, J. Christensen, A. Hviid et al. // JAMA. – 2012. – V. 307(8). – P. 823–831. – <https://doi.org/10.1001/jama.2012.165>
68. Tarahomjoo S. Soluble diphtheria toxin variant, CRM 197 was obtained in Escherichia coli at high productivity using SUMO fusion and an adjusted expression strategy / S. Tarahomjoo, M. Bandehpour, M. Aghaebrahimian, S. Ahangaran. // Protein and peptide letters. – 2022. – V. 29(4). – P. 350–359. – <https://doi.org/10.2174/0929866529666220209155738>

69. Thalen M. Manufacture of a stable lyophilized formulation of the live attenuated pertussis vaccine BPZE1 / M. Thalen, A. S. Debie, L. Coutte et al. // *Vaccines*. – 2020. – V. 8(3). – ID 523. – <https://doi.org/10.3390/vaccines8030523>
70. The application of viruses to biotechnology / Eds: C. Varanda, P. Materatski. – MDPI, 2021. – 306 p. – <https://doi.org/10.3390/books978-3-0365-2538-9>
71. Vaccine-preventable diseases and vaccines. Chapter 6 // In: *International Travel and Health*. – WHO, 2019. – 53 p.
72. Velotti F. Granzyme B in inflammatory diseases: apoptosis, inflammation, extracellular matrix remodeling, epithelial-to-mesenchymal transition and fibrosis / F. Velotti, I. Barchetti, F. A. Cimini, M. G. Cavallo // *Frontiers in immunology*. – 2020. – V. 11. – ID 587581. – <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.587581>
73. Vidor E. Manufacturing DTaP-based combination vaccines: industrial challenges around essential public health tools / E. Vidor, B. Soubeyrand // *Expert review of vaccines*. – 2016. – V. 15(12). – P. 1575–1582. – <https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1205492>
74. Yu-ping Z. Evaluation of the immunization effectiveness of bOPV booster immunization and IPV revaccination / Z. Yu-ping, L. Jing, H. Teng. et al. // *NPJ Vaccines*. – 2023. – V. 8. – ID 44. – <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00642-w>
75. Zhao H. Hepatitis B vaccine development and implementation / H. Zhao, X. Zhou, Y. H. Zhou // *Human vaccines & immunotherapeutics*. – 2020. – V. 16(7). – P. 1533–1544. – <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1732166>

РОЗДІЛ 5. СУЧАСНІ ПРИНЦИПИ СТВОРЕННЯ ВАКЦИН

У цьому розділі будуть розглянуті біотехнологічні аспекти нових напрямів одержання вакцин для профілактики вірусних та бактеріальних інфекцій: рекомбінантні вакцини для профілактики захворювань, викликаних вірусом папіломи людини; препарати для профілактики інфекцій спричинених вірусом гепатиту А, вірусом сказу та ін. У цьому розділі представлені останні досягнення нанобіотехнології при створенні ліпосомальних вакцин проти бактеріальних, вірусних та онкологічних захворювань, а також вакцин на основі мРНК для боротьби з пандемією вірусу SARS-CoV-2. Звертає на себе увагу той факт, що у виробництві цих вакцин використовуються принципово різні методології підвищення імуногенності препаратів під час використання рекомбінантних антигенів, ад'ювантів різної структури, імуностимулюючих комплексів, систем доставки антигенів тощо.

5.1. Вакцини для профілактики вірусу папіломи людини

Вірус папіломи людини – HPV (англ. – *Human PapillomaVirus*), вражаючи епітеліальні клітини, викликає захворювання у людини. HPV має діаметр 40–50 нм. Основним білком є L1, а білок L2, присутній у HPV, належить до мінорних (рис. 5.1). На підставі відмінностей у послідовності ДНК вірусу папіломи виділено понад 200 типів. За даними ВООЗ, понад 630 млн осіб є носіями інфекції, а 190 млн осіб мають клінічні прояви. HPV типів 16 і 18 викликають епітеліальну дисплазію слизової оболонки статевих органів, а саме: ці типи HPV асоційовані з більшою частиною преінвазивних та інвазивних карцином аногенітального середовища. HPV-16 і HPV-18 призводять до раку шийки матки, вульви, пеніса, піхви та анусу. HPV-6 і HPV-11 призводять до появи генітальних кондилом.

В даний час виділяють два види вакцин проти HPV: профілактичні та терапевтичні. Профілактичні вакцини активують гуморальний імунітет та вироблення вірус-нейтралізуючих антитіл, перешкоджають проник-

ненню вірусу в клітині господаря та індують ефект захисту від HPV інфекції. Терапевтичні вакцини проти HPV можна розділити на такі платформи: наночастинки, бактерії, живі вектори (бактеріальні та вірусні), нуклеїнові кислоти (ДНК і РНК), білки, пептиди, клітини (трансдуковані цитокінами аутологічні пухлинні клітини та дендритні клітини).

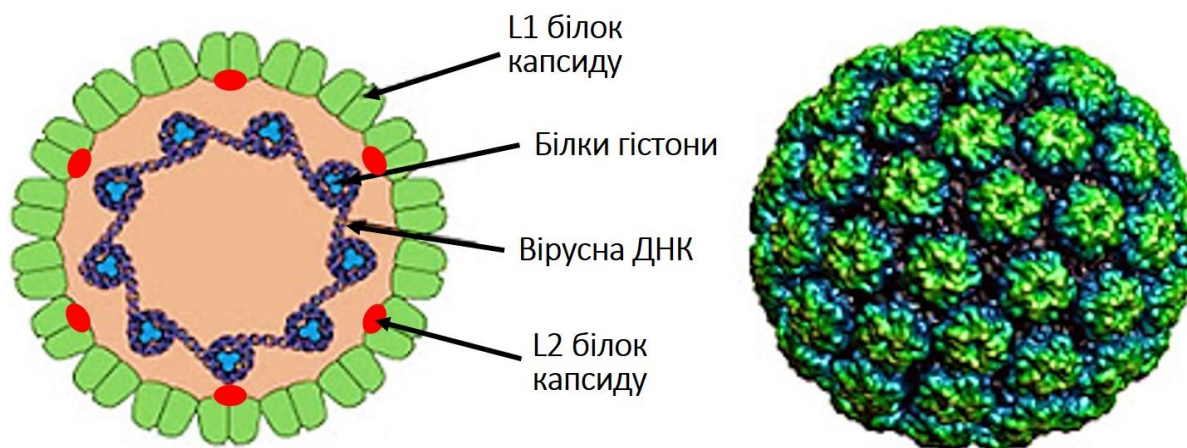


Рисунок 5.1 – Схема віріона HPV

Ми зупинимося на профілактичних вакцинах. На сьогоднішній день доступні три вакцини: *Gardasil®*, *Cervarix™*, *Gardasil®9*. Ці вакцини одержані за допомогою технології рекомбінантних ДНК з використанням капсидних білків L1 HPV, які самозбираються у неінфекційну форму вірусоподібних частинок (VLP). Перше покоління профілактичних вакцин, що отримали назву *Gardasil*, було схвалено в 2006 р. Вакцина складається з VLP, що містять HPV-6 низького ризику, HPV-11, а також HPV-16 високого ризику та HPV-18, які є причиною 90 % гострих кондилом. *Cervarix™* – рекомбінантна бівалентна вакцина проти вірусу папіломи людини, яка містить VLP з високого ризику HPV-16 та HPV-18, які викликають приблизно 80 % інвазивних раків шийки матки. Вакцину *Cervarix™* схвалено у 2009 році. Наступним поколінням вакцин проти вірусу папіломи людини є *Gardasil®9*, в якій міститься 9 компонентів (табл. 5.1).

Таблиця 5.1 – Характеристика рекомбінантних вакцин проти HPV

Назва вакцини	Склад вакцини, L1 антигені в 1 дозі (0,5 мл)	Система експресії	Допоміжні речовини	Виробник
<i>Gardasil®</i>	HPV-6 – 30 мкг, HPV-11 – 40 мкг, HPV-16 – 60 мкг, HPV-18 – 40 мкг	Рекомбінантний штам <i>Hansenula polymorpha</i>	Ад'ювант – алюмінію гідроксифосфату сульфат – 0, 225мг в 0,5 мл; натрію хлорид, L-гістидин, полісорбат 80, натрію борат.	<i>Merck Sharp & Dohme</i> , Нідерланди
<i>Gardasil®9</i>	HPV-6 – 30 мкг, HPV-11 – 40 мкг, HPV-16 – 60 мкг, HPV-18 – 40 мкг, HPV-31 – 20 мкг, HPV-33 – 20 мкг, HPV-45 – 20 мкг, HPV-52 – 20 мкг, HPV-58 – 20 мкг	Рекомбінантний штам <i>Hansenula polymorpha</i>	Ад'ювант – алюмінію гідроксифосфату сульфат – 0, 225мг в 0,5 мл; натрію хлорид, L-гістидин, полісорбат 80, натрію борат.	<i>Merck Sharp & Dohme</i> , Нідерланди / Франція
<i>Cervarix™</i>	HPV-16 – 20 мкг, HPV-18 – 20 мкг	Рекомбінантний бакуловірус на культурі клітин <i>Trichoplusia ni</i>	Ад'ювант AS04 – складається з гідроксиду алюмінію і 3-0-дезацил-4'-монофосфорилліпиду А (МФА)	<i>GlaxoSmithKline</i> , Бельгія
<i>Cecolin®</i>	HPV-16 – 20 мкг, HPV-18 – 20 мкг	Рекомбінантний штам <i>E. coli</i>	Ад'ювант – гідроксид алюмінію, натрію хлорид, полісорбат 80, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	<i>Xiamen Innovax Biotech</i> , Китай

Для одержання рекомбінантних вакцин проти HPV використовують різні системи експресії. Так, бівалентну вакцину CervarixTM отримують з використанням інфікованих бакуловірусів клітин комах *Trichoplusia*. Для підвищення ефективності імунної реакції бівалентна вакцина містить ад'ювант AS04, що складається з 500 мг гідроксиду алюмінію і 50 мг агоніста Toll-подібного рецептора 4'-3-0-дезацил-4-(монофосфорилліпід А) в якості додаткового імуностимулятора.

У молекулярній біотехнології системи експресії на основі бакуловірусів набули поширення (див. розділ 3.2.1 «Продукти для генно-інженерної біотехнології. Клітини комах»). Бакуловіруси (*Baculoviridae*) – родина паличкоподібних вірусів, які розділені на 2 групи: вірус ядерного поліедра і вірус збудника гранульозів, на які хворіють тільки комахи. На сьогоднішній день, для отримання рекомбінантних білків успішно використовуються системи експресії «бакуловіруси/клітини комах», оскільки рекомбінантні білки, одержувані у цих системах за своїми функціональними параметрами не відрізняється від природних аналогів і характеризується високим виходом. Рекомбінантні бакуловіруси отримували на основі даного вірусу та клітинах або личинках комах як біорактора, що дозволяє отримати цільовий білок безпечним та ефективним способом.

Широке використання бакуловірусів визначається рядом переваг: відсутність вираженої токсичності в клітинах ссавців *in vitro* навіть при введенні великих доз вірусу (500 PFU), що свідчить про безпечність їх використання; бакуловіруси не реплікуються в клітинах ссавців, здатні трансдукувати широкий спектр білків і завдяки структурі геному та вірусних частинок дозволяють включати в геном вірусу великі (до 30 тис. п.н.) фрагменти гетерогенної ДНК. Наприклад, використовуючи рFB1 як вектор, була отримана бакуловірусна експресуюча плазміда, що містить послідовність гена L1 білка HPV-16. Сконструйованим вірусом інфікували в клітинну лінію комах *Trichoplusia ni* (метелик родини *Noctuidae*). Після інкубації при 27 °C протягом 72 год інфіковані клітини збирали та екстрагували загальні клітинні білки. Аналіз SDS-PAGE виявив 56 000 експресованих білків, вестерн-блотинг підтвердив, що експресовані білки належать до L1 HPV-16, тобто придатні для отримання вакцини проти HPV.

Вакцини Gardasil® (4-валентна) та Gardasil®9 (9-валентна) були отримані на мікробній системі експресії – рекомбінантних штамів дріжджів *S. cerevisiae* або *H. polymorpha*. Білки L1 продукуються шляхом роз-

дільної ферментації культури дріжджових клітин, отриманої за технологією рекомбінантної ДНК, а вірусні частинки (VLP) утворюються шляхом самозбирання. VLP кожного типу адсорбуються на аморфному ад'юванті (гідроксіфосфат сульфату алюмінію – HAlO_9PS). VLP не містять вірусної ДНК і не можуть інфікувати клітини та бути причиною захворювань різної локалізації. Як ад'ювант використовували гідроксіфосфат сульфату алюмінію, одержаний при взаємодії алюмінію хлориду, натрію фосфату та гідроксиду натрію.

В останні роки використовують різні бактерії як системи експресії, наприклад, *E. coli*, яку використовують для виготовлення VLP-вакцин, замість дорогих еукаріотичних систем. VLP-вакцина отримана з *E. coli* проти L1 HPV-16 та HPV-18 під назвою *Cecolin*® та вакцина на основі *E. coli* проти HPV-16, HPV-18, HPV-6 проходять клінічні випробування фаз III та I відповідно. Крім того, для зниження вартості виробництва вакцин проти HPV використовують метилотрофні дріжджі *Pichia pastoris* та *H. polymorpha*. Важливо, що білки L1 продукуються шляхом роздільної ферментації культурою дріжджових клітин, наприклад, *S. cerevisiae* штаму Canada 3C-5 або штаму 1895, отриманої за технологією рекомбінантної ДНК, утворюючи вірусні частинки шляхом самозбирання.

Технологію отримання L1 білка HPV розглянемо на прикладі 4-валентної вакцини, створеної на основі головного капсидного білка L1 HPV типів 6, 11, 16, 18, одержуваних шляхом культивування рекомбінантного штаму дріжджів *H. polymorpha* (рис.5.2).

1. Отримання плазмідних векторів, які містять рекомбінантні гени, відповідальні за синтез капсидного білка L1 типів HPV-6-L1, HPV-11-L1, HPV-16-L1, HPV-18-L1.

2. Отримання рекомбінантного штаму *H. polymorpha*. Штам *H. polymorpha* трансформували відповідними плазмідами шляхом гідролізу рестриктазами (*Xho*I та ін.). Трансформанти відбирали на середовищі, яке містить суміш солей і вітамінів, глюкозу, агар-агар, лейцин (*DIFCO*™ *Yeast Nitrogen Base*). З отриманих трансформантів були відібрані клони, здатні до синтезу білків HPV-6-L1, HPV-11-L1, HPV-16-L1, HPV-18-L1. Отримані рекомбінантні штами *H. polymorpha* містять 2 експресійні касети з промоторами – MOX (метанол специфічна промоторна система, метанолоксидаза) і DAK (дигідроацетон кіназа).

Промотор – регуляторна ділянка ДНК, розташована перед відкритою рамкою зв'язування гена на початку оперона. Промотор є необхідним для ініціації транскрипції. Він забезпечує контроль транскрипції цього гена або оперону. Кожен ген може мати більше, ніж один промотор, які регулюються окремо один від одного.

3. Культивування рекомбінантного штаму *H. polymorpha*. Ферментацію здійснювали у 2 етапи: на першому етапі при 30 °С нарощували біомасу в культуральному середовищі, яка містить 4 % дріжджового екстракту, 2 % бактопептону, 4 % гліцерину протягом 2 год до густини сирової біомаси 150 г/л; на другому етапі додавали індуктор та продовжували культивування 48–72 год.

4. Виділення рекомбінантного білка L1 із клітин *H. polymorpha*. Після культивування штаму продуцента проводили осадження клітин центрифугування при 4000 g протягом 15 хв при температурі 4–5 °С. Осад біомаси суспендували у сольовому фосфатному буфері (рН 7,2) до концентрації 300 г вологих клітин на літр.

5. Осадження білків сірчаноокислим амонієм. Клітини руйнували на млині (Dyno-Mill типу KDL) з використанням скляних кульок діаметром 0,5–0,7 мм. З метою видалення основної маси баластних білків отриманий клітинний лізат насичували сульфатом амонію до 35 %. Осаджені білки відділяли центрифугуванням при 12 000 g протягом 30 хв. Надосадну рідину, яка містить баластний білок, видаляли. Осад з цільовими білками ресуспендували в 9 об'ємах фосфатного буферу з рН 7,2, що містить 0,01 % твіна 80. До розчину додавали сірчаноокислий амоній до концентрації 5 %. Отриману суміш інкубували протягом 24 год при кімнатній температурі до розчинення цільового продукту і випадання в осад білкових домішок. Осад відділяли центрифугуванням при 12 000 g протягом 30 хв. Отриманий супернатант діалізували у фосфатному буфері з рН 6,2, який містить 0,2 М хлориду натрію і 0,01 % твіну 80.

6. Хроматографічне очищення білка. Розчин, отриманий після діалізу, адсорбували на сорбенті *SP Sepharose FF*. Потім сорбент промивали фосфатним буфером з рН 6,2, що містить 0,2 М хлориду натрію і 0,01 % твіну 80. Білок L1 елюювали лінійним градієнтом від 0,2 до 1,5 М натрію хлориду. Об'єднані фракції, що містять антиген-білок L1, концентрували ультрафільтрацією в тангенціальному потоці на мембрані 300 кДа (Pellicon) під контролем SDS-PAGE.

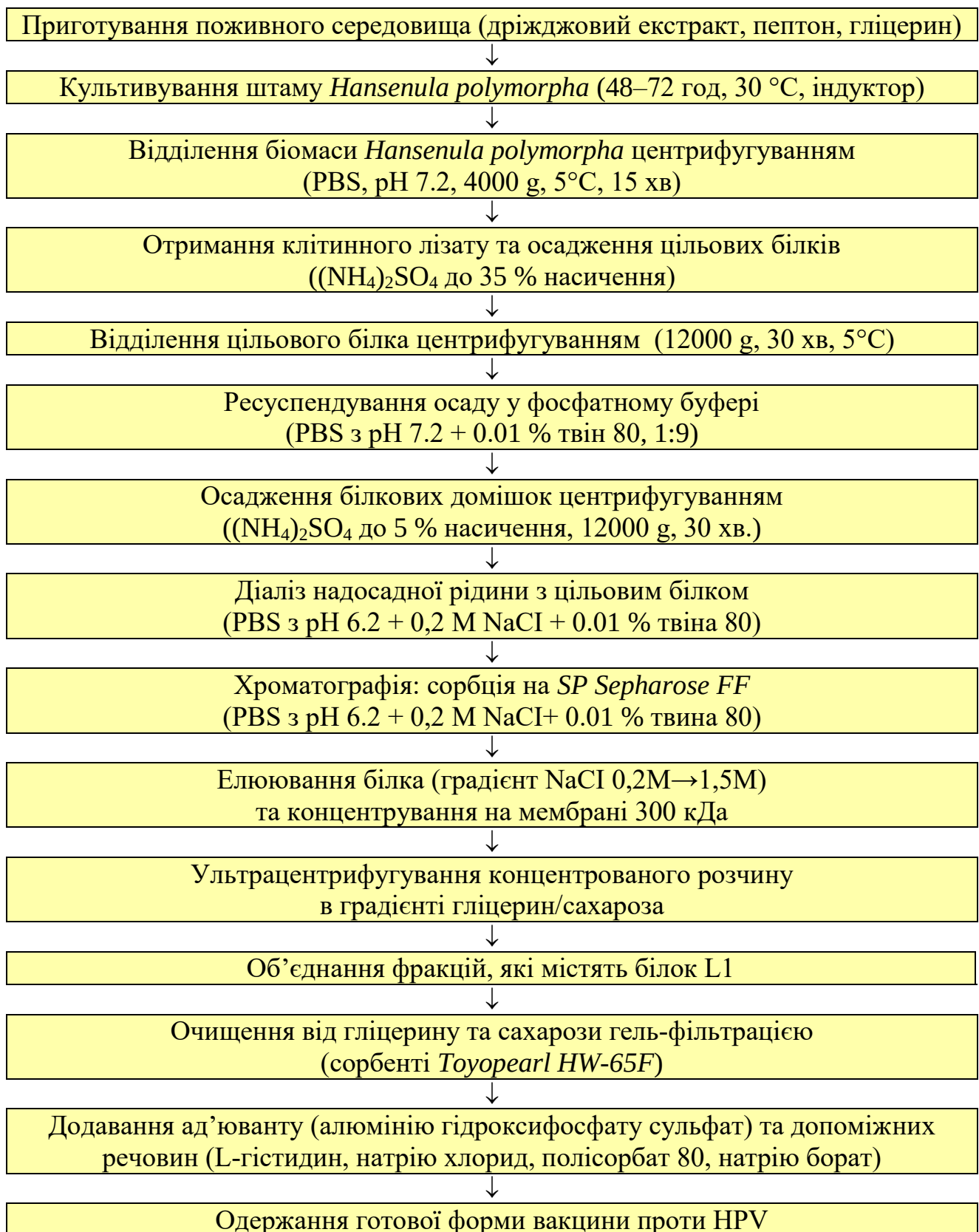


Рисунок 5.2 – Схема одержання рекомбінантної вакцини проти HPV

7. Ультрацентрифугування та гел'єфільтрація розчину білка. Концентрований розчин розділяли за допомогою зонального ультрацентрифугування (центрифуга типу *Beckman*) у градієнті (гліцерин/сахароза). Фракції, які містять цільовий білок L1, об'єднували, а потім очищали від гліцерину та сахарози гел'єфільтрацією на сорбенті *Toyopearl HW-65F*. Методом SDS-PAGE визначали чистоту фракцій. Фракції, які містять не менше 95 % білка L1, об'єднували. Вихід очищеного білка з 1 кг сирової біомаси становив близько 50 мг, залежно від використовуваного штаму *H. polymorpha* з різними експресійними касетами (HPV-6-L1, HPV-11-L1, HPV-16-L1, HPV-18-L1), які вирощувалися окремо.

8. Отримання готового препарату – вакцини *Gardasil*. Після успішного проходження контролю проводили об'єднання всіх чотирьох білків L1. На наступній стадії об'єднані білки сорбували на ад'юванті – алюмінію сульфаті гідроксифосфаті (0,025 мг/дозу). У препарат також вводять допоміжні речовини: L-гістидин, хлорид натрію, полісорбат-80, натрію борат. рН готового продукту становить 6,8–7,2.

5.2. Антирабічні вакцини

Сказ – лат. *Rabies* – є одним із найдавніших неврологічних захворювань, що викликається вірусом сказу – лат. *Rabdovirus* (RV). Вірус належить до роду *Lyssavirus*, родини *Rhabdoviridae*. RV – нейротропний, одноланцюговий вірус із негативною РНК. RV викликає у ссавців смертельний енцефаліт, відомий як сказ, що призводить до смерті при розвитку клінічних симптомів та є причиною близько 60 000 смертей у світі щорічно. В Україні в 2019 році вакциновано 20 894 особи, з них 1 938 – з підтвердженим діагнозом «сказ». Вірус потрапляє на периферичну ділянку та поширюється у центральну нервову систему, викликаючи дисфункцію нейронів, що є основною причиною летальності при сказі.

Усі рабдовіруси мають 2 основні структурні компоненти: спіральне ядро нуклеопротеїну і навколишню оболонку (рис. 5.3). Геном RV кодує п'ять білків: нуклеопротеїн (N), фосфопротеїн (P), матричний білок (M), глікопротеїн (G), полімераза (L). Білок M пов'язаний як з оболонкою, так і з нуклеопротеїном і може бути центральним білком зборки RV. G утворює близько 400 шипів, щільно розташованих на поверхні вірусу.

G – єдиний білок, що експонується на поверхні віріонів. Він є основним вірусним компонентом, що відповідає за індукцію антитіл господаря. G служить важливим імуногеном вакцин проти сказу. Розробляються різні конструкції, що експресують білок G, використовуючи параміксовіруси і вектори аденовірусів, які можуть викликати стійкий гуморальний імунітет у відповідь на RV.

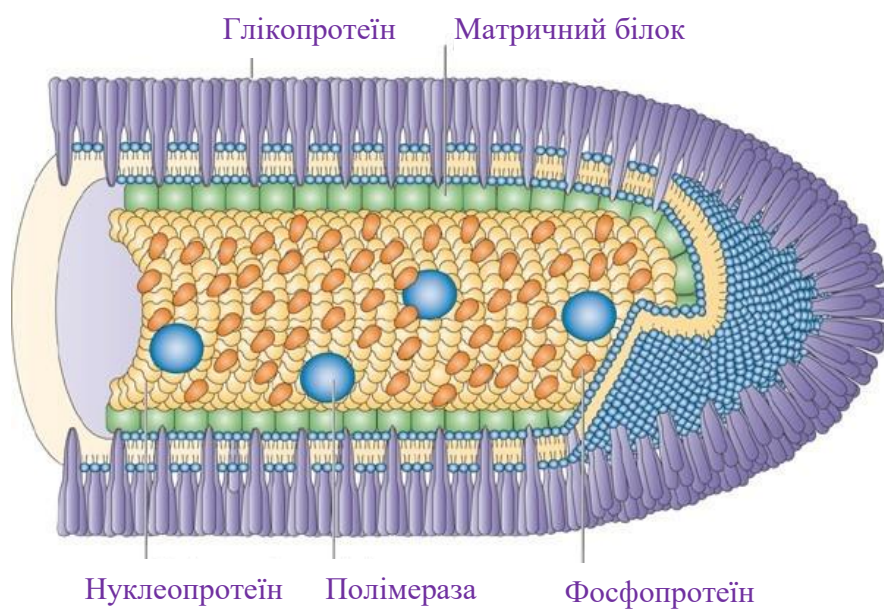


Рисунок 5.3 – Схема будови віріона RV

RV проникає у нервову систему, зв'язуючись з нервовими рецепторами, наприклад, рецепторами ацетилхоліну, адгезії нервових клітин, фактором росту нейронів. Потім RV транспортується до центральної нервової системи аксонним (переміщення по аксону нервової клітини різного біологічного матеріалу) або ретроградним транспортом (транспорт речовин від нервового закінчення до тіла нейрона зі швидкістю 2,5–7,5 мм/год; приблизно у 2 рази повільніше, ніж аксонний транспорт), можливо, шляхом зв'язування з цитоплазматичним динейном. В аксонах RV здійснює ретроградний транспорт шляхом переміщення на поверхні трубочок цитоскелета – рухається від плюс-кінців до мінус-кінців (рис. 5.4).

Імунобіотехнологія, зокрема, вакцинологія дозволяє запобігти захворюванню на сказ за допомогою вакцинації за умови її своєчасного та правильного проведення.

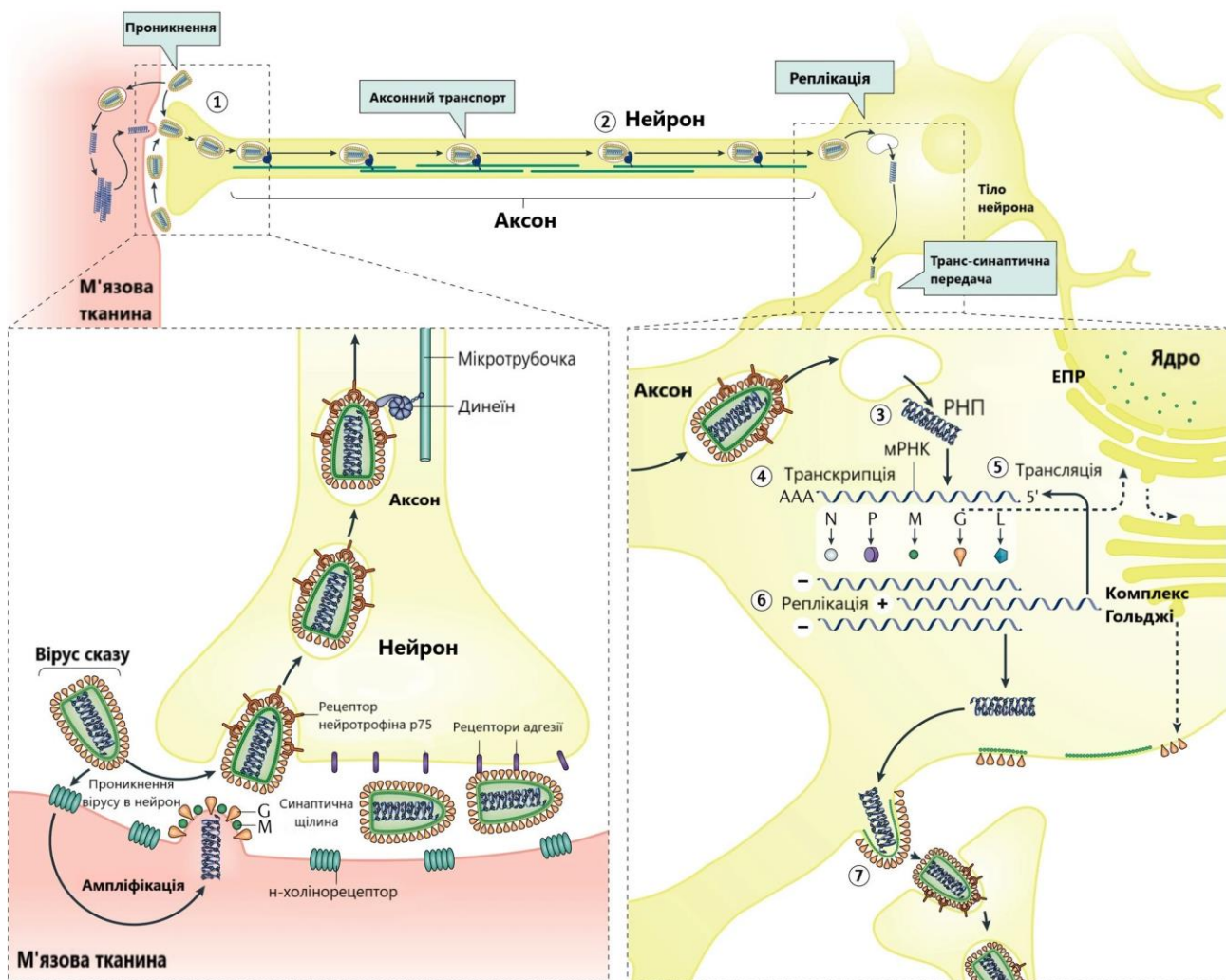


Рисунок 5.4 – Схема проникнення RV у нервову систему: 1) рецепторно-опосередкований ендоцитоз RV на пресинаптичній мембрані; 2) ретроградний аксональний транспорт RV до тіла нейрона; 3) вивільнення рибонуклеопротеїну з ендоцитарної везикули; 4) транскрипція вірусних мРНК; 5) трансляція вірусних білків; 6) реплікація повнорозмірних геномів РНК; 7) формування та вихід вірусних частинок з клітини. *Скорочення:* ЕПР – ендоплазматичний ретикулум; РНП – рибонуклеопротеїн

З часів Луї Пастера (1822–1895 рр.) вакцини проти сказу для людини виготовляються з інактивованого RV. З 1880 року Л. Пастер розпочав проведення експериментів, спрямованих на штучне зниження вірулентності збудників інфекційних захворювань та отримання атенуйованих штамів. Вченим були отримані ослаблені штами збудників курячої холери та сибірської язви. Принципи та методи атенуації Л. Пастер використовував при отриманні та практичному використанні вакцин проти сказу. Отримавши так званий фіксований RV (fixe-RV) зі стандартним ступенем вірулентності, Пастер вводив RV субокципітально кроликам, викликаючи їх за-

раження. Потім спинний мозок тварин піддавався висушуванню із різною тривалістю, що викликало атенуацію RV та зменшення кількості живих частинок RV. Ці дослідження дозволили створити антирабічні вакцин. Л. Пастер застосував свої відкриття вже не на тваринах, а на людині: з Ельзасу до нього привезли хлопчика, якого покусав собака, уражений вірусом сказу. Пастер почав курс, що складається з 13 ін'єкцій емульгованого матеріалу спинного мозку кролика, через три дні після того, як дитина була укушена. 90 пасажів було використано Л. Пастером для першої вакцини із фіхе-RV. Вакцина проти RV, розроблена Л. Пастером, була отримана на основі нервової тканини, а RV було інактивовано шляхом висушування.

Вперше вакцинацію проти сказу провели за допомогою мозкової вакцини, зареєстрованої Л. Пастером у 1885 році. Однак дана вакцина представляла небезпеку, зумовлену можливістю активації RV та розвитку алергічних реакцій через присутність у нервовій тканині мієліну. Пізніше безпечність вакцини була підвищена за рахунок інактивації RV фенолом (1911 р.). Однак після застосування як і раніше спостерігалися серйозні побічні ефекти, у тому числі кілька випадків паралічу та смерті. Основним фактором є гіперчутливість до мієліну. Згодом було виявлено, що кількість мієліну у вакцині можна знизити при використанні новонароджених мишей, що мають менший вміст мієліну в мозку.

В Україні до початку 80-х років застосовувалась ліофілізована протисказова вакцина типу Фермі, виготовлена з мозку овець, заражених фіхе-RV. Гомогенізований мозок у розчині 0,9 % NaCl, що містить 1,0 % фенолу, інактивують протягом 8 діб при температурі 20–22 °C. У вакцину додають сахарозу та ліофілізують. При застосуванні вакцини спостерігалися серйозні побічні ефекти, пов'язані з гіперчутливістю до мієліну. Крім того, необхідно враховувати наявність у мозкових вакцинах типу Фермі різних імунохімічно активних ліпідів, які можуть призводити до появи протиліпідних антитіл. Необхідно зазначити, що у складі мозкової тканини містяться гангліозиди, які можуть бути рецепторами для зв'язування з RV. Дослідження гангліозидів, виділених з мозку великої рогатої худоби (GT1 та GD1a), у досліджах *in vitro* та *in vivo* показало антивірусну активність при зараженні тварин RV на ранніх стадіях. Виживання у порівнянні з контролем (загибель 100 % тварин) становила від 20 до 60 % (активність вірусу – 50–100 LD₅₀) залежно від концентрації гангліозидів.

Як видно з наведених даних, спочатку антирабічні вакцини отримували з нервової тканини. Сьогодні ж їх виробляють переважно на основі клітинних культур та ембріонів птахів. Перед фахівцями стояло завдання створення виробництва антирабічних вакцин на біологічних субстратах, вільних від нервової тканини. Вакцини почали отримувати на основі клітинних культур ембріонів птахів для культивування RV: качиних, а згодом і курячих. Вакцини на основі клітинних культур містять RV, що розмножується у клітинних субстратах. У процесі розробки вакцин, що містять інактивованій RV, запропоновано використання інших клітин: первинної культури клітин нирок хом'яка, диплоїдної культури клітин людини (HDC, англ. – *human diploid cells*), клітин Vero та ін. Одночасно з цими дослідженнями жосліджено можливість використання різних штамів RV (табл. 5.2). Дослідження на людях показали відсутність побічних ефектів вакцин, що містять вірус Flury з низьким рівнем пасажів (Flury-LEP) на курячих ембріонах. Однак ці вакцини відрізнялися недостатньою імуногенністю. Використання RV штаму Flury з великою кількістю пасажів (Flury-HEP) збільшувало імуногенність вакцини порівняно з препаратом на основі Flury-LEP, але вона була меншою порівняно з мозковою. Вакцина з інактивованим вірусом Flury, вирощеним на культурі качиних ембріонів виявилася більш ефективною, але її імуногенність виявилася нижчою, ніж у мозкових вакцин.

Таблиця 5.2 – Культури клітин та штами RV, які використовуються для отримання антирабічних вакцин для людини

Тип культури клітин	Штами RV
✓ HDC – диплоїдна культура клітин людини	✓ Flury-LEP – 40–50 пасажів
✓ Первинна культура клітин нирок собак	✓ Flury-HEP – 227–330 пасажів
✓ Vero – клітини епітелію нирок зеленої африканської мавпи	✓ Pitman moore
✓ BNK 21 – культура нирок новонароджених хом'яків	✓ Внуково 32
✓ Первинна культура курячих ембріонів	✓ Paris Pasteur
✓ Первинна культура клітин нирок хом'яків	✓ Rabbit fix
✓ Первинна культура клітин курячих ембріонів	✓ Street-Alabama Duffering
	✓ Challenge Virus Standard (CVS) 11

Надалі були проведені дослідження з використанням культури фібробластів плода людини, які являли собою HDC з обмеженою тривалістю життя. Незабаром було показано, що фібробласти плода чутливі до вірусів людини та вільні від латентних вірусів. На початку 1960-х років для розмноження RV була використана високоімуногенна лінія HDC. Вакцини на HDC були вперше ліцензовані в Європі у 1976 р., а в США – у 1980 р., і застосовуються до сьогодні. У 1985 р. отримана очищена концентрована вакцина проти сказу на клітинах *Vero*, яка має високу імуногенність на рівні вакцин на HDC.

На сьогоднішній день вимоги до антирабічних вакцин, розроблені ВООЗ, представлені в серії технічних доповідей, опублікованих у різні роки, в яких вимоги до цих препаратів постійно підвищуються. У доповідях наведено основні вимоги до виробництва та контролю антирабічних вакцин для людини. У документі докладно описані культури клітин та вимоги до них, а також розглянуті штами RV, які дозволені до використання для отримання антирабічних вакцин, їх контроль, описані стандарти та основні положення технології виробництва: культивування, очищення, інактивація, ад'юванти (гідроксид алюмінію), вимоги до вакцин на різних стадіях виробництва.

За минулий період було розроблено антирабічні вакцини, отримані вирощуванням RV на культурі клітин качиних ембріонів. Однак ці вакцини мають меншу імуногенність порівняно з вакцинами з тканини мозку. Для препаратів з культури клітин качиних ембріонів рекомендовано від 14 до 23 щоденних щеплень, але іноді навіть такі високі дози не захищають від розвитку захворювання після інтенсивного контакту із джерелом зараження. Інший недолік цих вакцин полягає в тому, що вони також містили білки мієліну, які викликали побічні реакції, внаслідок чого препарат був заборонений ВООЗ.

Надалі антирабічні вакцини отримували у культурі клітин та тканин. Вакцини, виготовлені з використанням культур клітин, були не тільки безпечнішими порівняно із застосуванням вакцин на основі мозкової тканини через відсутність нейротропної тканини, але й більш ефективними.

Пізніше були отримані такі антирабічні вакцини: очищена качина ембріональна; вакцина на основі HDC; очищена на основі клітин курячих ембріонів; очищена на основі клітин *Vero*; адсорбована, одержана на первинній культурі клітин нирок хом'яків.

Технологічний процес, що привів до розробки зазначених вище вакцин, включав: адаптацію штаму *Pitman Moore RV* до стабільних клітинних ліній, таких як клітини *Vero (AbhayRab® та VeroRab®)* та *HDC MRC-5*. Вакцини на основі *HDC* вважається препаратом золотого стандарту. Сьогодні для отримання антирабічних вакцин використовуються різні штами *RV* та культури клітин (табл. 5.2).

В даний час для профілактики сказу у людей використовуються вакцини, отримані з різних штамів *RV* з використанням культур клітин різного походження (табл. 5.3).

В даний час широко використовуються такі антирабічні вакцини, як *Rabavert®* і *Rabipur®*, представлені інактивованими *RV*. Оскільки інактивовані вакцинми не можуть викликати сильний імунітет для забезпечення довгострокового захисту від інфекції *RV*, реципієнти повинні отримувати кілька щеплень протягом певного часу, що потребує нових технологічних підходів до створення вакцин. *Rabipur®* – перша очищена вакцина, отримана на клітинах курячого ембріона, яка була ліцензована в Німеччині в 1984 році, а потім ще в 60-ти країнах. Імуногенність вакцини *Rabipur®* була підтверджена під час численних клінічних випробувань.

Rabipur® виготовляється з використанням штаму *RV Flury-LEP*, вирощеного на культурі клітин первинних фібробластів курячих ембріонів. Вірус інактивують β -пропіолактоном та очищають за допомогою безперервного центрифугування у градієнті щільності. В результаті одержують висококонцентрований препарат, стабілізований полігеніном, з наступною ліофілізацією. *Rabipur®* виробляється у м. Марбург (Німеччина) та м. Анклешвар (Індія).

Нижче наведено технологічну схему антирабічної вакцини, отриманої з використанням *RV Pitman Moore* та культури клітин курячих фібробластів:

1 стадія – приготування культури клітин качиних та курячих ембріонів за класичною схемою (9–11 днів, при температурі 35–37 °C та 70–90 % вологості, трипсинізація та центрифугування);

2 стадія – зараження первинної культури фібробластів качиних ембріонів *RV* – 7 пасажів (адаптація), після чого отриманий штам культивують на культурі фібробластів курячих ембріонів – 4 пасажі; відібрані ембріони трипсинізують, центрифугують і суспендують клітини у ростовому середовищі до кінцевої концентрації $1,7 \times 10^6$ клітин/мл;

3 стадія – суспензію трипсинізованих клітин фільтрують через нейлоновий фільтр, центрифугують (1000–1500 об./хв, 15 хв, при 2–4 °С). Осад клітин суспендують у свіжому ростовому середовищі, перемішують і повторно центрифугують за тих же умов. Суспензію клітин перемішують протягом 5–10 хв при 35±2 °С. Кінцеву концентрацію клітин доводять ростовим середовищем до концентрації $1,4\text{--}2,2 \times 10^6$ клітин/мл;

4 стадія – суспензію клітин інокулюють RV та інкубують (90–120 хв при 35±2 °С) при перемішуванні для адсорбції вірусу на клітинах. Інфіковану RV суспензію клітин з вірусом інкубують при температурі 34,5±0,5 °С протягом 6 днів;

5 стадія – на 4–5 день культивування супернатант відбирають (1-й збір) та додають свіже ростове середовище, на 7–8 день відбирають 2-й збір. Збори зберігають при 2–8 °С;

6 стадія – об'єднані збори вірусу очищають та концентрують за допомогою ультрацентрифугування у градієнті щільності сахарози на зональній центрифuzі при 35 000 об./хв. Відбирають відповідні ділянки, що містять живий RV, при концентрації сахарози 35–40 %. Концентрат RV на період контролю зберігають при мінус 60 °С. Проводять контроль стерильності, ендотоксинів, імуногенності та ін.;

7 стадія – концентрат розморожують при 37 °С та охолоджують при 4±2 °С, розводять стабілізуючим розчином (сахароза, гідролізований желатин, альбумін сироватковий людини, солі натрію) до вмісту антигена 8,5 МО/мл. рН доводять до 8±1 за допомогою 10 %-вого NaOH;

8 стадія – до вірусної суспензії додають β-пропіолактон до кінцевої концентрації 0,025 %. Інкубацію проводять при 2–6 °С та постійному перемішуванні не менше 48 годин до повної інактивації RV;

9 стадія – наповнення первинної упаковки, ліофілізація та герметизація;

10 стадія – контроль вакцини.

Таблиця 5.3 – Характеристика інактивованих антирабічних вакцин для людини

Назва вакцини	Штам	Культура клітин	Вид очищення	Інактиватор	Допоміжні речовини на дозу	Виробник
<i>Rabipur</i> , ліоф. > 2,5 ME	<i>Flury LEP</i>	Фібробласти курячих ембріонів	Зональне ультрацентрифугування в градієнті щільності сахарози	β-пропіолактон	Сахароза – 75 мг, полігелін – 10 мг	<i>Chiron Behring vaccines</i> , Індія
<i>Verorab</i> , ліоф. > 2,5 ME	<i>Wistar Rabies PM W 138-1503-34</i>	<i>Vero</i>	Зональне ультрацентрифугування в градієнті щільності сахарози	β-пропіолактон	Мальтоза – 26,3 мг, АСЛ – 2,5 мг	<i>Sanofi Pasteur</i> , Франція
<i>Indirab</i> , ліоф. > 2,5 ME	<i>PM</i>	<i>Vero</i>	Хроматографія, ультрафільтрація	β-пропіолактон	Мальтоза – 25,0 мг, АСЛ – 5 мг, мертиолат 0,01 %	<i>Bharat Biotech</i> , Індія
Кокав, ліоф. > 2,5 ME	Внуково 32	Клітини нирок сирійських хом'яків	Ультрафільтрація	УФ-опромінення	АСЛ – 10 мг; сахароза 75 мг, полігелін – 10 мг	НПО «Микроген», Росія
<i>Imovax rabies</i> , ліоф. > 2,5 ME	<i>Wistar Rabies PM W 138-1503-3M</i>	HDC	Ультрафільтрація	β-пропіолактон	АСЛ – 100 мг, неомицин – 150 мкг	<i>Sanofi Pasteur</i> , Франція
<i>RabAvert</i> , ліоф. > 2,5 ME	<i>Fix virus, Flury LEP</i>	Курячі фібробласти	Зональне ультрацентрифугування в градієнті щільності сахарози	β-пропіолактон	АСЛ – 0,3 мг, Na-ЕДТА – 0,3 мг, натрію глутамін – 1 мг, полігелін – 12 мг	<i>Glaxo Smith Kline</i> , Бельгія

Примітка. АСЛ – альбумін сироватковий людини; РМ – штам RV Pitman Moore; Vero – епітеліальні клітини нирок зеленої африканської мартишки; Полігелін – полімер сечовини та поліпептидів із денатурованого желатину великої рогатої худоби.

На теперішній час продовжуються дослідження щодо створення нових форм антирабічних вакцин. Дослідження проводяться за кількома напрямками:

1. Живі атенуйовані вакцини. На відміну від інактивованих, живі вакцини імітують природну інфекцію і часто однієї дози достатньо, щоб викликати стійку імунну відповідь. Досі, незважаючи на широке використання атенуйованих препаратів для оральної вакцинації проти сказу диких тварин (лисиці, єноти та ін.), живих вакцин проти сказу домашніх тварин та людей ще немає. Всі живі вакцини, що використовуються для диких тварин, отримують у результаті багатократного пасажу штамів SAD (*Street Alabama Dufferin*) у культурі клітин, тому їх можливе повернення до вірулентності може стати практичним обмеженням для їх подальшого розвитку та використання для імунізації домашніх тварин і особливо для людини.

2. Пептидні вакцин. Відомі роботи зі створення пептидних вакцин проти сказу. Вивчено ефективність білкової субодиниці (очищеного від інфікованих клітин G-білка) для захисту від сказу. G-білок вірусу сказу є основним антигеном, який відповідає за захисний імунітет проти RV. У дослідженні G-білок RV був введений у клітину дріжджів та отримані рекомбінантні клітинні екстракти, що містять G-білок RV, який захищав морських свинок від летального зараження RV при внутрішньом'язовому введенні. Однак ці екстракти не захищали мишей, заражених RV внутрішньомозково. В цілому вакцини на основі білкових субодиниць RV є низькоімуногенними і можуть викликати обмежені імунні відповіді.

3. Антирабічні вакцини рослинного походження є препаратами на основі трансгенних рослин, в геном яких вбудований відповідний фрагмент геному патогенного мікроорганізму. У літературі наведено дослідження щодо використання кукурудзи та тютюну для експресії G-білка RV для отримання «їстівної» вакцини. Рослинні вакцини поки що не знайшли застосування, незважаючи на те, що питанням створення таких вакцин проти RV та інших інфекцій займаються протягом багатьох років.

4. Ліпосомальні антирабічні вакцини. Показано, що ліпосомальна антирабічна вакцина сприяє виробленню нейтралізуючих антитіл до RV у мишей лінії BALB/c. Емульсію ліпосом готували з гідрогенізованого фосфатидилхоліну сої та холестерину. Така вакцина складається з ліпосомальної емульсії та інактивованої антирабічної вакцини. Імунну відповідь

порівнювали між мишами, які отримували ліпосомальну та звичайну інактивовану вакцину. У мишей, імунізованих ліпосомальною антирабічною вакциною, спостерігали вищі титри інтерлейкіну-2, інтерферону- γ та активності відповідних клітин-кілерів, ніж у мишей, імунізованих звичайною інактивованою вакциною. Дані авторів показали вище виживання мишей, які отримали 3 ін'єкції ліпосомальної антирабічної вакцини (56,2 %), ніж тих, які отримали 5 ін'єкцій інактивованої антирабічної вакцини (40,6 %).

5. Антирабічні вакцини на основі РНК. В останнє десятиліття однією зі стратегій боротьби з інфекційними захворюваннями є вакцинація РНК-вакцинами. На відміну від ДНК-вакцин, які мають потенційний ризик інтеграції у геном господаря, вакцини на основі РНК усувають цю небезпеку. Крім того, ДНК-вакцини повинні доставлятися в ядро і транскрибуватися всередині ядра для експресії антигена, що може бути неефективним для деяких клітин. Навпаки, РНК-вакцини безпосередньо транслюються до цитоплазми, що не тільки усуває необхідність доставки в ядро, але призводить до швидкої експресії антигена. Вакцини на основі РНК мають високу імуногенність і призводять до стійких результатів. Стимулом для розвитку антирабічних РНК-вакцин може бути успішне застосування РНК-вакцин для профілактики COVID-19 фірм *Pfizer* і *Moderna*. Наприклад, вакцина фірми *Pfizer* є модифікованим нуклеїдом мРНК, що кодує мутантну форму білка-шипа SARS-CoV-2, який інкапсульований у біодеградабельні ліпідні наночастинки.

6. Антирабічні вакцини на основі вірусних векторів. В даний час запропоновано ряд антирабічних вакцин на основі відомих вірусів: везикулярного стоматиту, парагрипу типу 5, хвороби Ньюкасла, віспи, аденовірусів людини та ін. Генно-інженерні вакцини на основі вказаних вірусних векторів дозволяють доставляти у клітини людини або тварини тільки гени, які кодують синтез необхідних антигенів, що дозволяє не використовувати при отриманні вакцин живі патогенні віруси. Сьогодні рекомбінантні вакцини широко застосовують для боротьби зі сказом у диких м'ясоїдних тварин. Виділено клон вірусу вісповакцини, що утворює поверхневий G-білок RV. Отримано вакцину, що містить рекомбінантний вірус коров'ячої віспи, що несе ген G-білку оболонки RV. Такі вакцини часто використовуються перорально для імунізації лисиць. Створено вакцину на основі аденовірусу собак.

7. Антирабічні вакцини, одержані з використанням методу зворотної генетики. Зворотна генетика дозволяє виявляти функції генів. Дослідники маніпулюють послідовністю генів, змінюючи або вимикаючи той чи інший ген, і аналізують до яких змін це призводить. Це шлях зворотної генетики – від гена до ознак, що дозволив створити нове покоління антирабічних вакцин. Зворотні генетичні методи пропонують альтернативне рішення для розробки безпечних та ефективних живих атенуєваних вакцин для профілактики сказу, наприклад, амінокислота у положенні 333 глікопротеїду (G) у декількох фіксованих штамів RV відповідає за патогенність у дорослих мишей. Встановлено, що аргінін у положенні 333 сприяє реверсії патогенності. В роботі з живою ослабленою антирабічною вакциною запропоновано реплікон, в якому провели заміну структурних генів венесуельського кінського енцефаліту (VEEV) на G-білок RV. Плазмиду VEEV-RV-G було сконструйовано з використанням стандартних методів рекомбінантних ДНК. Отриману глікопротеїдну послідовність ампліфікували з використанням інфекційного клону як матриці та клонували у вектор експресії реплікону альфа вірусу VEEV у сайтах AscI та PacI.

Щоб додатково охарактеризувати VEEV-RV-G, частинки VEEV-RV-G очищали ультрацентрифугуванням і проаналізували білковий склад цих частинок за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі. Білок RV-G був єдиним структурним білком RV, виявленим у вірусних частинках.

Об'ємні сферичні частинки розміром близько 60–90 нм спостерігалися на поверхні клітин, інфікованих VEEV-RV-G, порівняно з типовими частинками RV у формі кулі. Показано, що VEEV-RV-G може збирати вірусні інфекційні частинки, які сильно відрізняються від RV як за формою, так і за розмірами.

G-білок RV забезпечує ефективне пакування химерної РНК реплікону в інфекційні частинки, які можуть самопоширюватися в культурі клітин у високих титрах. Частинки VEEV-RV-G були сильно ослаблені у мишей-сосунків і могли викликати сильні гуморальні імунні відповіді у відносно низьких дозах. Мишей вакцинували VEEV-RV-G внутрішньом'язово, що захищало тварин від смерті при внутрішньоцеребральному зараженні RV.

Створенню, вивченню та використанню антирабічних вакцин присвячено низку досліджень та оглядових матеріалів. Роботи останніх років

присвячені ефективності існуючих антирабічних вакцин та перспективам їхнього розвитку.

При розробці та виробництві вакцини важливим є збереження стабільності штамів, що використовуються. Розвиток молекулярної біології та біотехнології дозволяє підтвердити справжність штамів RV та їх стабільність. Проведено аналіз штаму Внуково-32, який застосовується при отриманні культурної очищеної інактивованої сухої антирабічної вакцини. Показано, що структура РНК штамів RV Внуково-32, CVS-11, кодує частини фрагмента G-білка відповідає аналогічному фрагменту РНК у RV. Структура РНК штаму RV завдовжки 539 п.н., що кодує фрагмент G-білка, є стабільною на всіх етапах технології. Показано можливість застосування рестрикційного аналізу для підтвердження справжності штаму RV Внуково-32 на всіх етапах виробництва, включаючи готову форму вакцини.

Нині інактивовані вірусні вакцини набули широкого застосування для профілактики низки інфекцій. Деякі використовуються вже протягом десятиліть і зазвичай добре переносяться. Оскільки віруси при вирощуванні *in vitro* зазвичай виходять у клітинне культуральне середовище, їх відокремлюють від інфікованих культур. Великий розмір частинок вірусів порівняно з іншими макромолекулами середовища дозволяє легко відокремити частинки з використанням простих технологій очищення, що ґрунтуються на розподілі частинок за розміром. До таких вакцин належать вірус поліомієліту, вірус грипу, RV і вірус японського енцефаліту. В альтернативному підході, який застосовується у випадку вбитої вірусної вакцини (гепатит А, COVID), інфіковані клітини піддають лізису та проводять очищення вірусних частинок. Вірусні частинки інактивуються хімічним шляхом, зазвичай, за допомогою обробки β -пропіолактоном, формаліном, опроміненням, а потім дія інактивованого вірусу може посилюватися за рахунок ад'ювантів (наприклад, гідроксиду або фосфату алюмінію). Інактивовані вірусні вакцини зазвичай мають високу імунологічну активність, наприклад, 1 доза вакцини гепатиту А забезпечує захист у кількості 50 нг. Таким чином, ця класична стратегія, що характеризується бездоганною історією створення добре переносимих та ефективних вакцин, залишається досить перспективною технологією, що обирається для багатьох вірусних вакцин, зокрема антирабічних.

Можливе використання ліпосом для посилення імуногенності вірусних вакцин, наприклад, *LipoRabTM* – ліпосомальна вакцина для профілактики сказу. Ліпосоми підвищують імуногенність вакцини з включеним в них вірусом сказу, у порівнянні з використанням вакцини тільки з вірусом сказу. Перевагою цієї вакцини є можливість зменшення доз та кількості ін'єкцій.

5.3. Вакцини для профілактики COVID-19

11 березня 2020 року ВООЗ визнала спалах захворювання на коронавірус пандемією. Пандемія раніше невідомого коронавірусу SARS-CoV-2, що викликає атипову пневмонію COVID-19 (англ. – *COrona Virus Disease 2019*), призвела до смерті мільйонів людей на планеті. Найважливішою протидією цьому захворюванню є вакцинація та створення колективного імунітету у населення. Розробці проти COVID-19 присвячені дані матеріали.

Будова коронавірусу SARS-CoV-2. Коронавіруси (лат. – *Coronaviridae*) являють собою крупні оболонкові РНК-віруси, геном яких представлений позитивною одноланцюговою РНК довжиною від 25 до 32 т.п.н. Вперше коронавіруси були описані в 60-х роках XX-го століття як збудники гострих респіраторних інфекцій. Високо патогенні коронавіруси були причиною важкого гострого респіраторного синдрому (SARS, англ. – *Severe Acute Respiratory Syndrome*) з високою летальністю у 2002 році – SARS-CoV, а потім у 2013 році як збудники близькосхідного респіраторного синдрому (англ. – *Middle East Respiratory Syndrome*) – MERS-CoV. Геном вірусу SARS-CoV-2 є високогомологічним з геномом вірусу SARS-CoV.

Розрізняють чотири субродини коронавірусів: α - та β -коронавіруси, які інфікують лише ссавців, γ - і δ -коронавіруси, які вражають переважно птахів. Вірус SARS-CoV-2 є β -коронавірусом. Як і інші коронавіруси, віріони SARS-CoV-2 мають сферичну або овальну форму і діаметр від 60 до 140 нм. Віріон коронавірусів вкритий ліпідною оболонкою з чітко помітними на електронномікроскопічних знімках булавовидними шипами (англ. – *spike*) завдовжки 10 нм. Коронавіруси містять чотири структурні білки: шипові (S), оболонкові (E), мембранні (M) та нуклеокапсидні (N) (рис. 5.5).

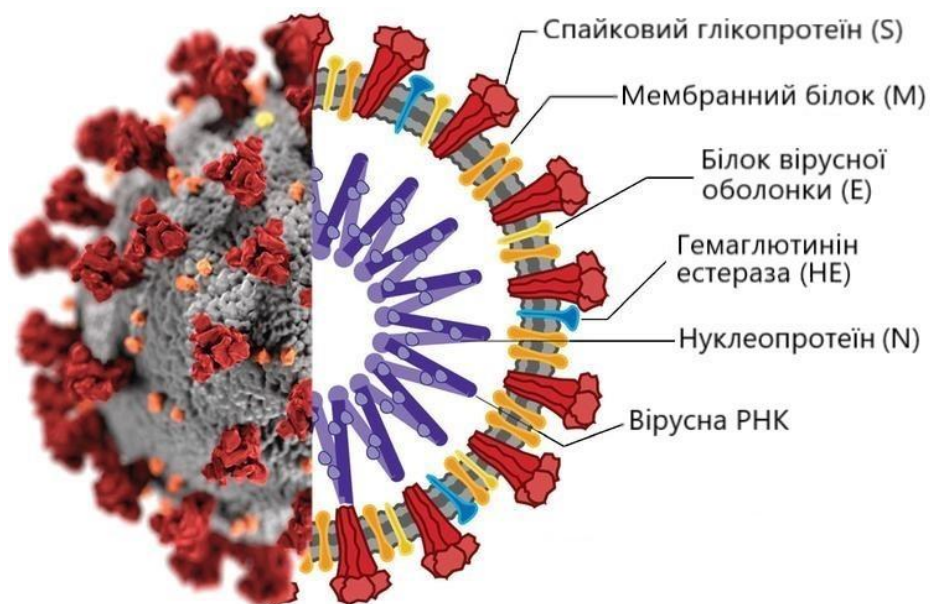


Рисунок 5.5 – Структура SARS-CoV-2

Білок S зв'язується з рецепторами клітини-мішені і запускає інфекційний процес. Білки М взаємодіють один з одним та з мембраною, яку вірус захоплює із ураженої клітини і в результаті утворюється вірусна оболонка.

Пентамери білка Е є тільки у представників *Coronavirinae*, вони присутні в кількості всього декількох копій на віріон і являють собою важливий фактор вірулентності. Білок Е формує пентамерні іонні канали, які руйнують мембрани клітин у ході брунькування вірусів. Вивільнення дочірніх віріонів із клітини може бути здійснено двома способами: шляхом лізису (вибуховий спосіб) клітини та шляхом брунькування. Шлях лізису клітини тісно пов'язаний із її деструкцією. Цей шлях характерний для безоболонкових вірусів, які не мають супероксиду. Вихід шляхом брунькування характерний для оболонкових вірусів, наприклад, коронавірусів. У цьому випадку клітина-господар деякий час зберігає життєздатність. Віруси, які мають суперкасид, вивільняються протягом 2-6 годин. На початку суперкасидні білки встановлюються на зовнішній поверхні мембрани у вигляді своєрідних шпильок, витісняючи клітинні білки, потім через модифіковану клітинну мембрану проходить нуклеокасид із утворенням суперкасиду.

N-білки упаковують вірусну РНК у вигляді спіралі і відіграють важливу роль у зборці віріону. SARS-CoV-2 має додатковий шар протеїнів

оболонки – гемагглютинінестераз (HE), які беруть участь у взаємодії з клітиною-мішенню.

Основна частина генома коронавірусів консервативна, проте він легко піддається генетичній рекомбінації, тож вірус може бути перенацілений з диких тварин на людину шляхом зміни структури білка S.

Вперше геном SARS-CoV-2 під назвою *Wuhan-Hu-1* було виділено та секвеновано в Китаї у січні 2020 р. Геном SARS-CoV-2 має 96 % подібності до коронавірусу кажана BatCoV-RaTG13, 82 % ідентичності з геномом SARS-CoV та 70 % – з геномом MERS-CoV.

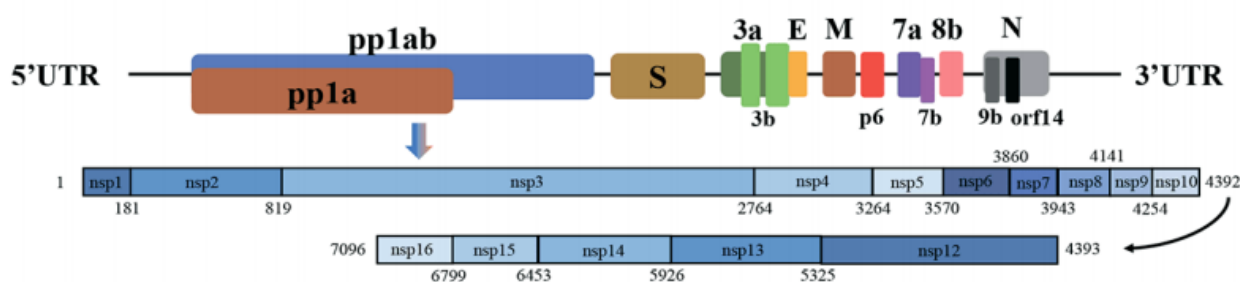


Рисунок 5.6 – Геном SARS-CoV-2

Спіральний нуклеокапсид сформований з N-білка в комплексі з РНК(+), яка складається з 5'-термінальної кейп-структури та 3'-поліаденільованого «хвоста». РНК SARS-CoV-2 має 14 відкритих рамок зчитування (ORF, англ. – *open reading frame*), що кодують 27 білків. 5'-кінець генома містить гени ORF1ab та ORF1a. ORF1ab – найбільший ген (складає 2/3 генома), що кодує білок pp1ab, який розщеплюється на 16 неструктурних протеїнів (nsp), що беруть участь в транскрипції і реплікації. 3'-кінець РНК кодує структурні білки: S, E, M та N, а також містить 8 допоміжних білків (3a, 3b, p6, 7a, 7b, 8b, 9b та ORF14). Допоміжні білки відіграють роль в ухиленні коронавірусу від імунної відповіді, включаючи інгібування інтерферонів I типу (3b та 6), стимулювання апоптозу (3a, 3b, 8a), припинення синтезу клітинної ДНК (6, 8b), стимуляції синтезу хемокинів (3a стимулює ліганди CCL5 і CXCL8) та розвитку запалення (7a та 7b активують запалення через NF-kB та MAPK-8).

Патогенез SARS-CoV-2. В умовах організму основними клітинами-мішенями для коронавірусів є епітеліальні клітини та макрофаги, що мають на своїй поверхні спеціальні рецептори, які розпізнає та з якими взаємодіє поверхневий білок S вірусу. На поверхні розташовані пепломери

(виражені структури у вигляді відростків на ліпопротеїновій оболонці (суперкапсиді), що оточує віріон), кожен з яких містить три однакових S глікопротеїни, складені з трьох компонентів: поверхневий S1 взаємодіє з клітинним рецептором, а S2 і S3 – запускають процес злиття вірусної мембрани з клітинною. SARS-CoV-2 використовує CD147-глікопротеїн та ангіотензин перетворюючий фермент 2-го типу (АПФ-2) як рецептори для проникнення в клітину. Молекула S-білка SARS-CoV-2 ідентична такому SARS-CoV, однак у SARS-CoV-2 ділянка, що зв'язується з рецептором АПФ-2, має підвищену афінність до своєї мішені, що може пояснити легкість, з якою новий вірус інфікує клітини і поширюється. Після зв'язування вірусу SARS-CoV-2 з рецептором комплекс SARS-CoV-2/АПФ-2 проникає в клітину за допомогою механізмів злиття мембрани віріона з мембраною клітини або шляхом ендоцитозу (рис. 5.7).

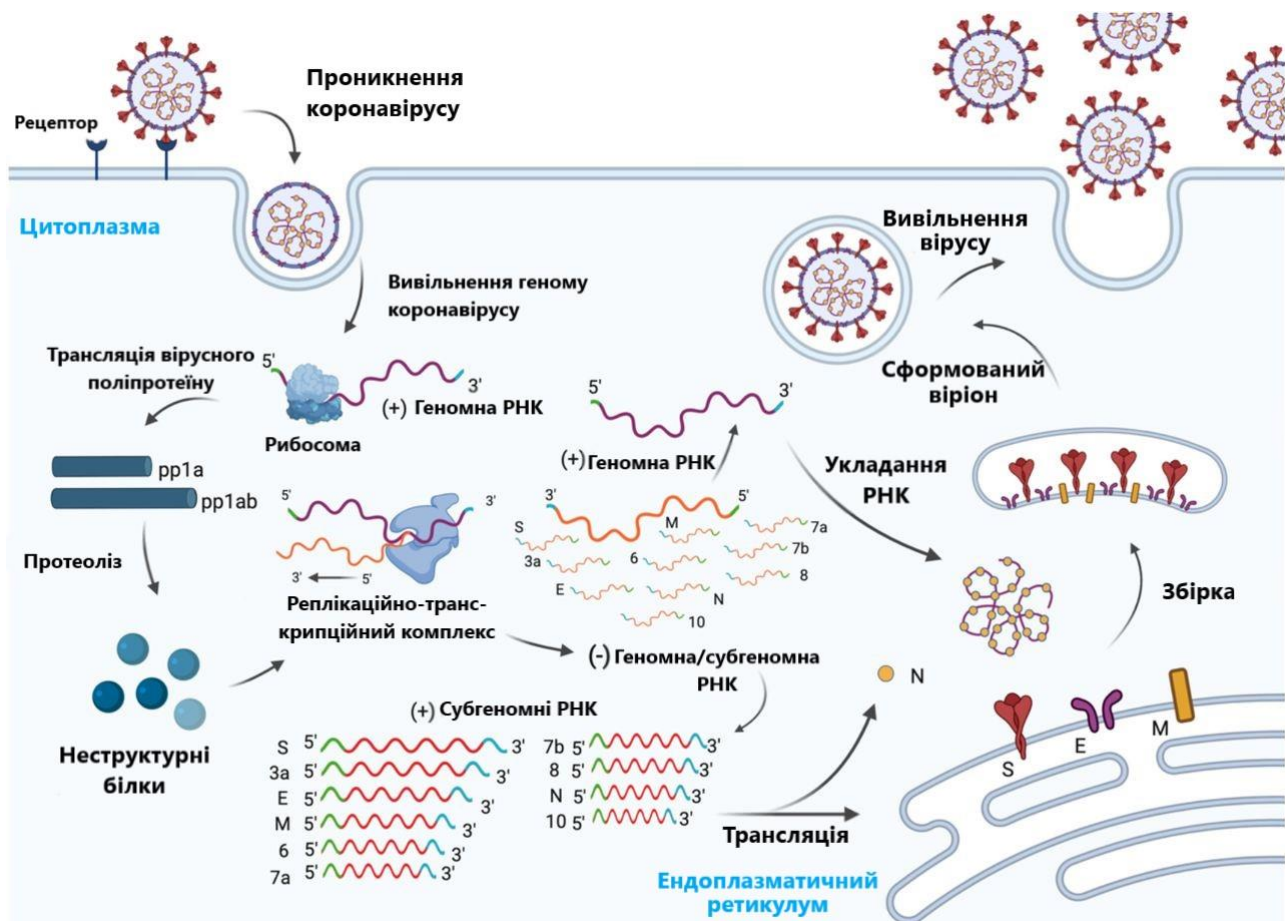


Рисунок 5.7 – Схема проникнення та реплікації коронавірусу в клітині-мішені

Інокуляція SARS-CoV-2 у дихальні шляхи людини викликає пригнічення активності мукоциліарного кліренсу за рахунок інгібування рухли-

вості війок епітелію і супроводжується загибеллю епітеліоцитів. Вірус SARSCoV-2 проникає через слизову оболонку носа, гортані та бронхіального дерева у периферичну кров і вражає цільові органи – легені, травний тракт, серце, нирки, клітини яких експресують АПФ-2. Вважається, що основною мішенню вірусу SARSCoV-2 є епітеліоцити легень.

Аналіз клітинних зразків на наявність РНК-послідовностей SARS-CoV-2 виявляє значну транскрипцію РНК в епітелії носу і меншу – в клітинах нижніх дихальних шляхів і альвеолярного епітелію. Це свідчить про те, що верхні, а не нижні дихальні шляхи є початковим місцем зараження SARS-CoV-2. АПФ-2 локалізовані в пневмоцитах I та II типу, клітинах ендотелію судин та ентероцитах (тому симптоми з боку дихальних шляхів часто супроводжуються симптомами з боку шлунково-кишкового тракту – нудота, діарея та ін.). Зараження SARS-CoV-2 призводить до цитопатичних ефектів, включаючи апоптоз, лізис клітин та утворення синцитію у тканинах легенів.

Після проникнення до клітини-господаря геном SARS-CoV-2 приєднується до рибосом, що призводить до трансляції вірусних поліпротеїнів, які в подальшому переробляються вірусними протеолітичними ферментами. У результаті протеолізу, опосередкованого протеазами вірусу 3CLpro (англ. – *chymotrypsin-like protease*) та PLpro (*papain-like protease*), поліпротеїни розщеплюються на менші компоненти, що відіграє головну роль у опосередкуванні реплікації та транскрипції вірусів, а також сприяє поширенню інфекції. Інший фермент – RdRp (англ. – *RNA-dependent RNA-polymerase*) – репліказа, має важливе значення для реплікації вірусного геному та продукції нових віріонів. Отже, ці ферменти можна розглядати як потенційні лікарські мішені для розробки терапевтичних засобів, оскільки вони мають вирішальне значення для виживання, реплікації та передачі SARS-CoV-2. Лише 100 нм базальної мембрани відокремлює поверхні епітеліальних та ендотеліальних клітин в альвеолах, і це сприяє тому, що SARS-CoV-2 може заражати обидва типи клітин послідовно і насамкінець призводить до викиду вірусу в кров. Так само як і SARS-CoV, SARS-CoV-2 викликає тяжкі ускладнення – гострий респіраторний дистрессиндром і гостру легеневу недостатність, що є основною причиною смерті пацієнтів.

Створення вакцин проти COVID-19. Протягом 2020–2021 рр. на світовому фармацевтичному ринку для боротьби з пандемією COVID-19

з'явилися вакцини різної структури та ефективності. Досить швидко розробку вакцин проти COVID-19 обумовили декілька факторів:

- значні досягнення в галузі вакцинних технологій за останні 10–15 років, зокрема вакцини на основі мРНК, значно прискорили розробку вакцин проти вірусу SARS-CoV-2, що викликає COVID-19;

- уряди різних держав забезпечили значне фінансування, що дозволило вченим проводити кілька етапів розробки вакцин паралельно, а не послідовно;

- успішне координування робіт між промисловістю, науковими установами та донорськими організаціями.

В результаті було створено платформу на основі матричної рибонуклеїнової кислоти (мРНК), яка була використана фірмами *Pfizer-BionTech* і *Moderna* для своїх вакцин проти COVID-19.

мРНК, або іРНК (матрична, або інформаційна РНК), містить інформацію про первинну структуру білків. мРНК синтезується на основі ДНК в процесі транскрипції, після чого використовується при трансляції як матриця для синтезу білків.

Технологія вакцин на основі матричної РНК розроблялася понад два десятиліття. На відміну від традиційних вірусних вакцин, які можуть доставляти інактивовану або ослаблену версію вірусу або частину вірусу, наприклад, капсульний білок, мРНК-вакцини доставляють генетичну інструкцію щодо перетворення частини цільового вірусу у клітини людини. Потім клітини організму синтезують білок, необхідний для створення імунної відповіді. На молекулі мРНК записана інформація вірусу SARS-CoV-2 – збудника COVID-19.

В останні роки вакцини з мРНК матрицею інтенсивно пропонуються в галузі імунотерапії раку та інфекційних захворювань через їх високу ефективність та безпечність. мРНК – частина генетичного коду вірусу, що призводить до синтезу антигенних білкових структур, у відповідь на які в організмі синтезуються специфічні антитіла.

Необхідно зазначити, що вкрай важливим компонентом мРНК-вакцин є ліпідні наночастинки, в які інкапсульована молекула мРНК. На думку багатьох експертів, створення ліпідних компонентів та отримання на їх основі наночастинок мало вирішальне значення для створення мРНК-вакцин. Ліпідні наночастинки захищають мРНК і переносять її у клітини.

Починаючи з кінця 1990-х років були розроблені ліпідні наночастинки для доставки ланцюгів нуклеїнових кислот. Наночастинки є сумішшю чотирьох ліпідних молекул (рис. 5.8): три з них стабілізують структуру наночастинки, а четвертий ліпід – іонізований – є ключем до успіху ліпідних наночастинок. Ця речовина заряджається позитивно при отриманні ліпідних наночастинок, що дає ті ж переваги, що і ліпосомальні частинки, але іонізовані ліпіди згодом перетворюють заряд на нейтральний у фізіологічних умовах, наприклад, у кровотоку, що обмежує його токсичну дію на організм. Крім того, суміш із чотирьох ліпідів дозволяє підвищити стабільність вакцини у процесі виробництва, транспортування та зберігання. А також ліпідні наночастинки підтримують стабільність вакцини в організмі.

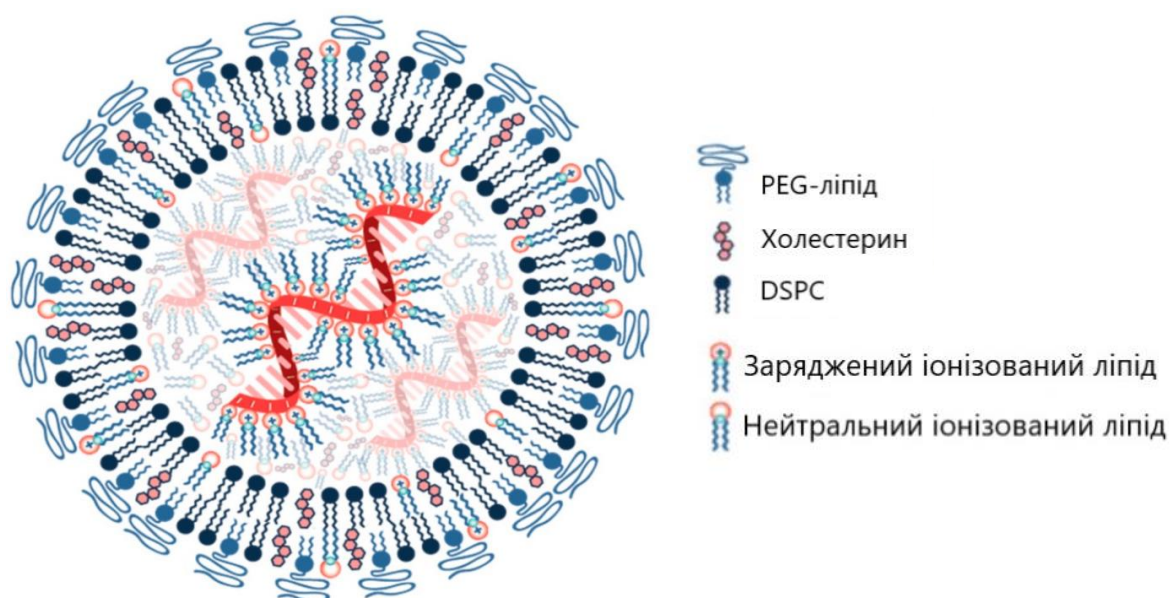


Рисунок 5.8 – Схема ліпідної наночастинки мРНК вакцини

До середини 2000-х років було розроблено новий спосіб формування та виробництва цих наночастинок. Він включав використання апарату з Т-подібним з'єднувачем, який об'єднує розчинені в етанолі ліпіди з нуклеїновими кислотами, розчиненими в кислотному буфері. Коли потік двох розчинів зустрічаються, компоненти мимовільно утворюють упаковані ліпідні наночастинки. Кожен виробник, який випускає мРНК-вакцини, використовує різні варіації цієї платформи доставки ліпідних наночастинок.

У складі вакцин виробництва компанії *Pfizer-BionTech* присутні такі чотири ліпідних компоненти:

- 1) іонізований ліпід: ((4-гідроксибутил) азандиіл) біс(гексан-6,1-диіл) біс (2-гексилдеканоат);
- 2) 2[(поліетиленгліколь)-2000]-N,N-дитетрадецилацетамид (PEG-ліпід);
- 3) дистеароїлфосфотидилхолін (DSPC, англ. – *distearoylphosphatidylcholine*);
- 4) холестерин.

Формування ліпідних наночастинок з мРНК відбувається кількома методами:

- 1) шляхом швидкого змішування в мікрорідинному змішувачі або змішувачі з Т-подібним з'єднанням чотирьох ліпідів (іонізований ліпід, DSPC, холестерин і PEG-ліпід), розчинених в етанолі, з мРНК, розчиненої у кислотному буфері;
- 2) шляхом зустрічі іонізованого ліпиду з водною фазою – він стає протонуваним при рН 5,5, що є проміжним між рК буфера і рК іонізованого ліпиду;
- 3) іонізований ліпід електростатично зв'язує аніонну фосфатну групу мРНК і водночас виявляє гідрофобність у водному середовищі, стимулюючи утворення везикул та інкапсуляцію мРНК;
- 4) після початкового утворення везикул рН підвищується за рахунок розведення діалізом або фільтрацією, що приводить до нейтралізації іонізованого ліпиду, роблячи його більш гідрофобним і тим самим змушуючи зливатися везикули, викликавши в подальшому зв'язування іонізованого ліпиду з мРНК всередині ліпідної наночастинок.

PEG-ліпід зупиняє процес злиття, забезпечуючи наночастинок гідрофільним зовнішнім шаром і визначаючи його термодинамічну стабільність і розмір, а DSPC формує бішар, присутній безпосередньо під цим PEG-ліпідним шаром наночастинок. Склад вакцини Pfizer-BioNTech представлений: 50 % іонізованого ліпиду, 10 % DSPC, 38,5 % холестерину, 1,5 % PEG-ліпиду. Розмір ліпідних наночастинок становить 100–170 нм.

Проводяться дослідження використання у складі вакцини проти COVID-19 як ліпідних наночастинок, так і ліпосом. Так, у Південній Кореї проведено роботи зі створення ліофілізованої ліпосомальної мРНК вакцини-кандидата – EG-COVID. Для отримання вакцини використовували ліпосоми, отримані з таких ліпідів: 1,2-діолеїл-3-триметиламонійпропан (DOTAP, англ. – *1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane*), діолеїлфосфо-

етаноламін (DOPE, англ. – *dioleoylphosphoethanolamine*) і холестерин. Розмір отриманих ліпосом до ліофілізації становив $191,7 \pm 8,5$ нм (дзета-потенціал – $-54,5 \pm 3$ мВ), а після ліофілізації – $266,7 \pm 12,2$ нм (дзета-потенціал – $-44,4 \pm 2,1$ мВ). Для порівняння авторами отримано препарат з ліпідами аналогічними вакцині Pfizer. Ліпосомальні та ліпідні наночастинки включали мРНК. Активність двох препаратів порівнювали при внутрішньом'язовому введенні. Вакцина EG-COVID викликала стійкий гуморальний і клітинний імунітет до вірусу SARS-CoV-2. Сироватка, отримана від імунізованих мишей, пригнічувала вірусну інфекцію SARS-CoV-2 у клітинах Vero. На думку авторів досліджень, ліофілізована вакцина краща за рідкий препарат, оскільки сухий препарат можна зберігати і транспортувати при більш високих температурах, порівняно з вакциною фірми Pfizer.

G. Gregoriadis, один з піонерів роботи з ліпосомами, обґрунтував їх переваги при отриманні вакцин так:

- 1) ліпосоми біодеградують, є простими у приготуванні та можуть кількісно включати мРНК;
- 2) включена у ліпосоми мРНК повністю захищена від нуклеазної атаки у кров'яному руслі;
- 3) ліпосомальна мРНК потрапляє у цитоплазму клітини шляхом ендоцитозу;
- 4) катіонні ліпосоми з мРНК уникають лізосомотропного шляху та залишаються інтактними у цитоплазмі;
- 5) усередині цитоплазми мРНК експресується у вигляді S-білка, після чого ліпосоми або їх фрагменти виявляють свою імунологічну ад'ювантну дію, механізм якої ще не досліджено.

Крім вакцин на основі мРНК, у світі використовуються вакцинні препарати, отримані із застосуванням інших біотехнологічних схем. Так, в Україні активно проводилася імунізація населення вакциною CoronaVac виробництва китайської фірми Sinovac. CoronaVac є інактивованою вірусною вакциною, отриманою на основі виділеного в Китаї штаму коронавірусу. Вірус культивують на клітинах нирок африканських зелених мавп (Vero). Потім вірус збирають та інактивують з метою запобігання його реплікації, продукт концентрують, очищають і адсорбують на гелі гідроксиду алюмінію (ад'ювант, що стимулює імунну відповідь у людини). Ізольовані штами SARS-CoV-2 були відібрані в інфікованих пацієнтів. Вірус ку-

льтивують у великих об'ємах клітин *Vero* та інактивують β -пропіолактоном протягом 24 годин з подальшим очищенням методами іонообмінної та ексклюзійної хроматографії. Отриманий інактивований, очищений та концентрований продукт адсорбують на гідроксиді алюмінію. Адсорбовану вакцину оцінюють за імуногенною та захисною ефективністю на тваринах: мишах лінії BALB/c та щурах лінії *Vistar*. Встановлено високу імуногенність вакцини, що призводить до появи захисного титру антитіл. Додатково вакцина протестована на макаках-резус, що не належать до людського виду приматів, у яких було виявлено захворювання подібне до COVID-19, викликане SARS-CoV-2. Мавп імунізували тричі внутрішньом'язово середніми (3 мкг/дозу) та високими (6 мкг/дозу) дозами інактивованої вакцини. На 0, 7 та 14 день визначали титри специфічних антитіл. Виявлено появу антитіл на 2-му тижні та подальше їх зростання. Всі вакциновані макаки були захищені від інфекції SARS-CoV-2. Вірусне навантаження не виявлялося у глотці і легенях вже на 7 день після зараження.

На схемі, зображеній на рис. 5.9, наведено технологію вакцини, отриманої за класичною схемою з використанням методу інактивації вірусу. Розглядати цю схему необхідно спільно з описом технології вірусних вакцин: вимог до культури клітин, культуральних середовищ, мікроносіїв, інактивації та інших технологічних стадій, викладених у попередніх розділах.

На сьогоднішній день використовується близько 10-ти комерційних вакцин проти коронавірусу SARS-CoV-2 і більше 100 вакцин знаходиться на різних стадіях доклінічного або клінічного вивчення. Розглянемо кілька комерційних вакцин, що виробляються біотехнологічними компаніями різних країн (табл. 5.4).

Завдяки вакцинації у світі заговорили про революцію у біотехнології та фармації. Вакцини проти SARS-CoV-2 стали масовими препаратами, які базуються як на принципово нових біотехнологіях – на матричній РНК (*Pfizer, Moderna*, США) та аденовірусних векторах (*AstraZeneca*, Великобританія, *CoviShield*, Індія), а також на класичних біотехнологіях (*CoronaVac, Sinovac*, Китай). Вакцини на основі мРНК містять вірусну молекулу мРНК, пов'язану з ліпідною наночастинкою. Опинившись у організмі мРНК надходить у клітину і починає синтезувати патогенно специфічні антигени, які викликають імунну реакцію. Вакцини виявляють різну

ефективність від 85 до 95 %. За наявними сьогодні даними, вакциновані проти COVID-19 демонструють на 94 % менше випадків інфекції з симптомами, ніж у контрольній групі людей, які не були вакциновані. Серед тих, хто був вакцинований і заразився коронавірусом спостерігається на 92 % менше випадків тяжкого перебігу захворювання.

Сьогодні вакцинація проти SARS-CoV-2 – єдина можливість боротьби проти пандемії COVID-19 та збереження людських життів.

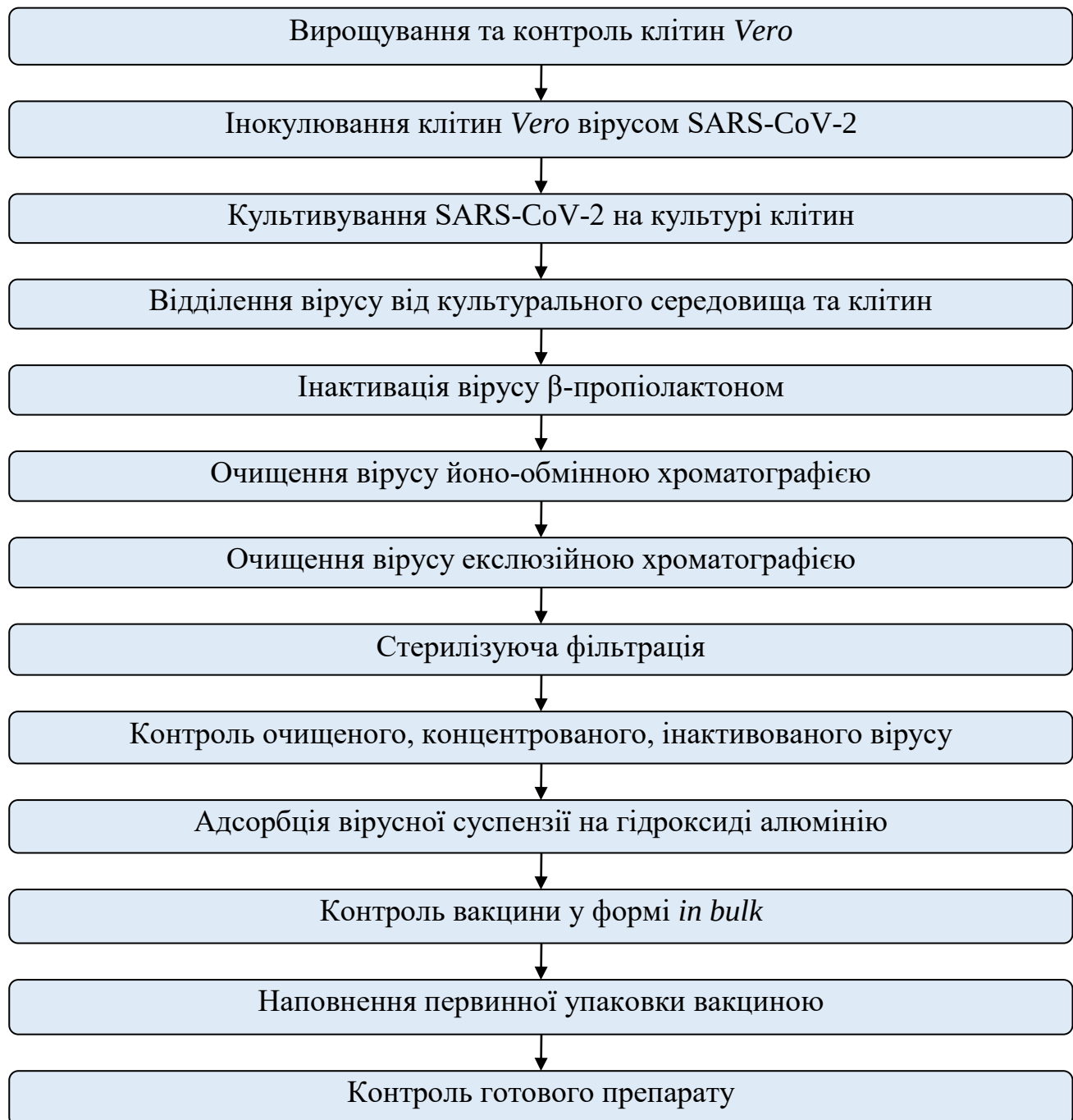


Рисунок 5.9 – Технологія отримання інактивованої вакцини Sinovac COVID-19

Таблиця 5.4 – Порівняльна характеристика вакцин проти коронавірусу SARS-CoV-2

Назва вакцини та виробник	Діюча речовина	Допоміжні речовини	1 доза	Умови зберігання
<i>AstraZeneca</i> , Шве- дсько-Британська ком- панія разом із Окс- фордським університе- том / <i>Covishield</i> , Індія	Рекомбінантний аденовірус- ний вектор шимпанзе з дефек- том реплікації, що кодує S- білок SARS-CoV-2, одержаний в генетично-модифікованих клітинах нирки ембріона лю- дини HEK-293	L-гістидин, L-гістидину гідро- хлорид, $MgCl_2 \times 6H_2O$, NaCl, Твін-80, етанол, сахароза, ди- натрію едтат, вода для ін'єкцій	5×10^{10} вірусних частинок у дозі	2 – 8 °C
<i>Pfizer</i> , США	мРНК, одержана шляхом тран- скрипції <i>in vitro</i> із відповідних ділянок ДНК, що кодують S- білок SARS-CoV-2 у ліпідній наночастинці	KCl, NaCl, KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , ALC-0315, ALC-0159, холес- терол, DSPC, сахароза, вода для ін'єкцій	30 мкг у дозі	(-90)–(-60) °C
ЭпиВакКорона, Век- тор, РФ	Пептидні антигени N1, N2 і N3 S-білка SARS-CoV-2, адсорбо- вані на $Al(OH)_3$	$Al(OH)_3$, KCl, NaCl, KH_2PO_4 , $NaHPO_4$, вода для ін'єкцій	Три антигени по 75 ± 15 мг у дозі	2 – 8 °C
<i>CoronaVac</i> , <i>Sinovac</i> , Китай	Інактивований очищений кон- центрований вірус SARS- CoV-2, адсорбований на $Al(OH)_3$, одержаний на кліти- нах <i>Vero</i>	NaCl, $NaHPO_4 \times 12 H_2O$, $Na_2HPO_4 \times H_2O$, $Al(OH)_3$, вода для ін'єкцій	600 ОД інакти- вованого анти- гена	2 – 8 °C

Закінчення табл. 5.4

Назва вакцини та виробник	Діюча речовина	Допоміжні речовини	1 доза	Умови зберігання
Спутник V, Національний дослідницький центр епідеміології та мікробіології ім. Н. Ф. Гамаї, РФ	2-х компонентний препарат: №1 – рекомбінантні аденовірусні частинки 26 серотипу, що містять ген S-білка SARS-CoV-2; №2 – рекомбінантні аденовірусні частинки 5 серотипу, що містять ген S-білка SARS-CoV-2. Одержані на клітинній лінії HEK-293	MgCl ₂ , Твін-80, етанол, сахароза, трис-амінометан, вода для ін'єкцій	$1 \pm 0,5 \times 10^{11}$ частинок у дозі	2 – 8 °C
Moderna, США	мРНК, що містить інформацію про S-білок SARS-CoV-2 в ліпідній наночастинці	SM-102, холестерин, DSPC, PEG-2000-DMG, трометамол, трометамолу гідрохлорид, оцтова кислота, натрію ацетату тригідрат, сахароза, вода для ін'єкцій	100 мкг у дозі	(-25)–(-15) °C
Johnson-Johnson, США	Рекомбінантні аденовірусні частинки 26 серотипу, що містять ген S-білка SARS-CoV-2	Твін-80, моногідрат лимонної кислоти, тринатрію цитрат дигідрат, 2-гідрокситропіл-β-циклодекстрин, вода для ін'єкцій	Не менше ніж $8,92 \log_{10}$ інфекційних одиниць	-70 °C – рік; 2–8 °C – 3 місяці.

Примітка. SM-102 – гептадекан-9-іл8-((2-гідроксіетил)-(6-оксо-6-(ундецилокси)гексил) аміно) октаноат, DSPC – дістеароїлфосфохолін, PEG-2000-DMG – 1,2-димірістоїл-рац-гліцеро-3-метоксіполіетилен гліколь-2000.

5.4. Вакцини проти вірусів Ебола та Зіка

В даний час проводиться розробка ряду вакцин для боротьби з вірусними інфекціями, наприклад, проти хвороб Ебола, Зіка та ін.

Лихоманка Ебола – гостра висококонтагіозна хвороба, рідкісне, але вкрай небезпечне захворювання. Спалахи епідемії зафіксовані у Центральній та Західній Африці. Летальність у середньому становить 50 %. Вірус Ебола розповсюджується через кров або рідкі виділення організму хворої або померлої людини або тварини. Інфікуватися можна через нещодавно заражені біологічними рідинами предмети.

У листопаді 2019 року на фармацевтичний ринок виведено першу комерційну вакцину проти вірусу Ебола – *Ervebo* (виробництва *Merck*) – rVSV-ZEBOV-GP. *Ervebo* – це живий атенуований рекомбінантний вірус везикулярного стоматиту (rVSV), в якому ген, що кодує глікопротеїн (PO3522) оболонки вірусу, змінений на поверхневий глікопротеїн вірусу Ебола (P87666), виділеного з типового заїрського вірусу (*Zaire ebolavirus*) (рис. 5.10).

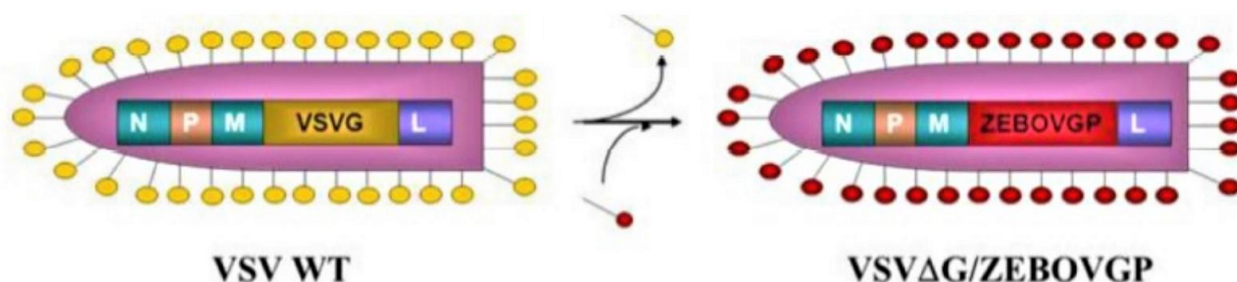


Рисунок 5.10 – Структура штаму VSV дикого типу та рекомбінантного вірусу rVSV-ZEBOV-GP

Вірус у цій вакцині не є патогенним для людини. Вакцина проти вірусу Ебола пройшла випробування на 16 000 осіб. Препарат індукуює імунну відповідь у вигляді нейтралізуючих антитіл. Вакцина rVSV-ZEBOV – *Ervebo* є єдиною вакциною проти лихоманки Ебола, схваленою FDA. Запропонована вакцина забезпечує захист від ізолятів *Zaire ebolavirus* та не захищає від інших ізолятів вірусу Ебола або вірусу Марбург.

Також запропонована вакцина, розроблена *Johnson&Johnson* і виготовлена компанією *Janssen*. З метою запуску імунної відповіді запропонована комплексна вакцина, яка несе генетичний код декількох білків вірусу

Ебола та складається з двох компонентів: 1) Ad26.ZEBOV (*Zabdeno*) – рекомбінантна ДНК-вакцина на основі аденовірусу 26 серотипу (Ad26); 2) MVA-BN-Filo (*Mvabea*) — рекомбінантна ДНК-вакцина на основі модифікованого вірусу осповакцини Анкара (MVA).

У 2020 році запропонована вакцина «ГамЭвак-комби» – комбінована векторна вакцина розроблена для профілактики геморагічної лихоманки Ебола. Препарат складається з двох компонентів, де як вектор міститься аденовірус 5-го серотипу (Ad5). Перший компонент містить рекомбінантні вірусні частинки на основі вірусу везикулярного стоматиту (VSV), що експресують ген GP вірусу Ебола; другий компонент містить рекомбінантні псевдоаденовірусні частинки, що експресують ген GP вірусу Ебола. У дослідженні вакцини прийняли участь лише 2000 осіб. У зв'язку з відсутністю матеріалів 1 і 2 фази клінічних випробувань, дана вакцина не рекомендована міжнародним співтовариством до застосування.

Останні роки активно розробляються вакцина проти **вірусу Зіка** (рис. 5.11). Передача хвороби іншим людям здійснюється трансмісивним шляхом. Хвороба Зіка передається через укуси комарів *Aedes aegypti* в тропічних і екваторіальних районах. Вірус Зіка належить до роду *Flavivirus*. Протікає хвороба відносно доброякісно, характеризується висипанням, нетривалою лихоманкою без вираженої інтоксикації. Виявлено, що вірус Зіка проникає через плаценту, впливаючи на ембріон і викликаючи у немовлят мікроцефалію (значно зменшений розвиток черепа), що призводить до розумової недостатності.

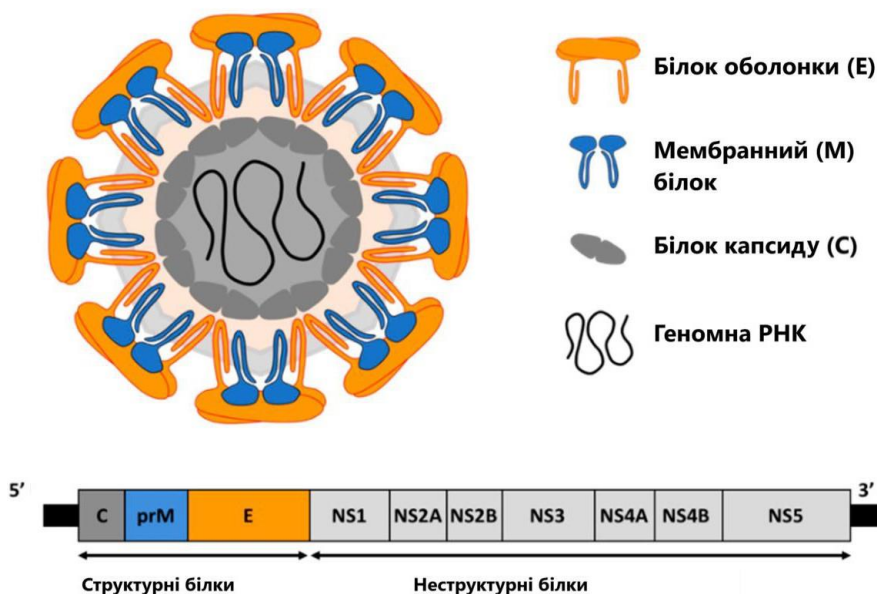


Рисунок 5.11 – Структура вірусу Зіка

Сьогодні запропоновано кілька варіантів вакцин проти вірусу Зіка:

1. Вакцина на основі ДНК розробляється вченими Центру досліджень вакцин NIAID (США). Ними використана стратегія, аналогічна експериментальній флавівірусній вакцині проти вірусної інфекції Західного Нілу. Вакцина-кандидат на основі ДНК проти вірусу Зіка пройшла першу фазу клінічних випробувань у серпні 2016 року, другу фазу з тестування розпочали у грудні 2016 року. У лютому 2017 року розпочато дослідження безпечності й імуногенності. ДНК-вакцина складається з плазмідної ДНК, модифікованої білками E і PrM, що входять до складу зовнішньої білкової оболонки віріона вірусу Зіка. ДНК-вакцина призначена для зборки білкових частинок, які імітують вірус Зіка та запускають імунну відповідь в організмі людини. На першій фазі відкритого клінічного дослідження, у якому прийняли участь 40 людей, вводили 3 дози вакцини по 1 і 2 мл. Перша ін'єкція у дозі 1 мл забезпечувала захист у 25 % пацієнтів, у дозі 2 мл – у 60 %; друга ін'єкція у дозі 1 мл забезпечувала захист у 65 % пацієнтів, у дозі 2 мл – у 84 %. За два тижні перед введенням третьої дози титр нейтралізуючих антитіл спостерігали у 70 і 95 % пацієнтів відповідно.

2. Очищена інактивована вакцина проти вірусу Зіка під назвою ZPIV1 розроблена Армійським дослідницьким інститутом Уолта Ріда (США). Вакцина містить інактивовані частинки вірусу і не може розмножуватися в організмі людини та викликати захворювання. У дослідженнях на мишах і мавпах-мармозетках (при їх вагітності) показано, що як первинна внутрішньом'язова, так і первинна бустерна вакцинація забезпечує 80 %-вий ефект появи нейтралізуючих антитіл.

3. Жива ослаблена (атенуйована) вакцина проти вірусу Зіка. Створено химерний вірус за допомогою генної інженерії – об'єднання кількох вірусів (реасортанти отримують після спільного інфікування двома різними вірусами із сегментованим генотипом, містить гени обох батьківських вірусів). Химерний вірус складається з кістяка вірусу Денге типу 4 (Денге викликається будь-яким з 4-х споріднених вірусів, які називаються серотипами), який експресує поверхневі білки вірусу Зіка. Химерний вірус – живий, атенуйований (ослаблений) і не може викликати захворювання.

4. мРНК-вакцина (платформа на основі генів, аналогічна ДНК-вакцина). мРНК призводить до синтезу антитіл проти білків E і PrM, що входять до складу зовнішньої білкової оболонки віріону вірусу Зіка.

5. Вакцина на основі вірусних векторів використовують вірус кору або модифіковану версію вірусу везикулярного стоматиту VSV. Принцип той самий, що й у вакцині проти вірусу Ебола.

6. Вакцина, яка спрямована на білки слини комара, а не на конкретний вірус. Вакцина містить 4 синтетичні білки слинних залоз комарів, призначені для індукції антитіл у вакцинованої людини – для індукції модифікованої алергічної реакції, яка може запобігти зараженню у разі укусу комаром-переносником хвороби Зіка.

Насамкінець хотілося б звернути увагу на можливість отримання вакцин проти вірусів на основі різних платформ: ДНК, мРНК, вірусних векторів, атенуйованих, очищених інактивованих та ін. Розвиток біотехнології та створення низки методологій дозволяє успішно боротися з небезпечними інфекційними вірусними захворюваннями.

5.5. Ліпосомальні форми ад'ювантів і вакцин

В даний час у різних напрямках медицини широкого використання набули ліпосомальні препарати. Один з таких напрямків – застосування ліпосом як ад'ювантів для конструювання вакцин. Спочатку ад'ювантна дія ліпосом по відношенню до різних антигенів була встановлена при введенні експериментальним тваринам антигенних субстанцій, вірусів і бактерій, глобулінів та альбумінів сироватки крові, ферментів. Надалі ліпосомальні вакцини знайшли широке застосування у профілактиці інфекційних захворювань людини.

У таблиці 5.5 представлені комерційні ліпосомальні вакцини, що використовуються у клініці.

Таблиця 5.5 – Ліпосомальні вакцини для застосування людиною

Назва вакцини	Виробник	Антиген	Захворювання
<i>Epraxal</i> Berna vaccine, в/м	<i>Crucell-Berna-Bio-tech</i> , Швейцарія	Антиген гепатиту А	Гепатит А
<i>Inflexal virosomal influenza vaccine</i> , в/м	<i>Crucell-Berna-Bio-tech</i> , Швейцарія	Антигени вірусу грипу А, гемагглютинін, нейрамінідаза	Грип
<i>НераХен combintd vaccine</i> , в/м	<i>Lipoxen</i> , Велика Британія	Антиген гепатиту В	Гепатит В

Закінчення табл. 5.5

Назва вакцини	Виробник	Антиген	Захворювання
<i>Lipovasa influenza vaccine</i> , в/м	Болгарія	Гемагглютинін, нейрамінідаза	Грип
<i>Mosquirix</i> , в/м	<i>GlaxoSmithKline</i> (GSK), Бельгія	Епітоп прееритроцитарного циркумспорозійного білка <i>Plasmodium falciparum</i> і S-антиген вірусу гепатита В (HBsAg)	Малярія
<i>Shingrix</i> , в/м	<i>GlaxoSmithKline</i> (GSK), Бельгія	Рекомбінантний антиген ліпопротеїна Е вірусу вітряної віспи	Оперізуючий лишай

Основним завданням при отриманні антигенів, що використовуються у складі вакцин, є досягнення їх високого ступеня очищення від баластних домішок різної природи: білкових, ліпідних, ліпопротеїдних, полісахаридних та ін. Добре відомо, що дані сполуки здатні посилювати імуногенність речовин, що вводяться. Водночас їхня присутність небажана через посилення ними побічної дії вакцини. Саме цей факт змушує використовувати для конструювання вакцин імуностимулятори, що отримали назву «ад'юванти».

До ад'ювантів у вакцинології висуваються досить жорсткі вимоги:

- ❖ ад'юванти повинні бути вільними від сторонніх домішок та не викликати побічних імунних реакцій;
- ❖ ад'юванти не повинні бути онкогенними або алергогенними речовинами та викликати появу відповідних сполук в організмі;
- ❖ ад'юванти не повинні містити антигени, подібні до антигенів господаря (поява таких антигенів може призвести до аутоімунних реакцій);
- ❖ після виконання своїх функцій ад'юванти повинні досить легко метаболізуватися.

Посилення дії антигена в організмі при введенні його з ад'ювантами пояснюється кількома причинами:

- ✓ уповільненою резорбцією антигена з утвореного на місці введення «депо», що сприяє антигенному подразненню;
- ✓ запальною реакцією організму у відповідь на введення ад'ювантів;

- ✓ утворенням комплексу антигена з ад'ювантом за типом хімічного зв'язку, внаслідок чого підвищується імуногенність антигена;
- ✓ стимуляцією ад'ювантом фагоцитарної активності ретикулоендотеліальної системи;
- ✓ загальним посиленням синтезу білка в організмі;
- ✓ уповільненням гідролізу антигена тканинними ферментами;
- ✓ стресорною дією ад'юванту на організм;
- ✓ активацією системи комплементу;
- ✓ прискоренням транспорту антигена до імунокомпетентних клітин;
- ✓ стимуляцією утворення цитокінів;
- ✓ стимуляцією проліферації, диференціювання та функціональної активності Т- і В-клітин та їх взаємодії.

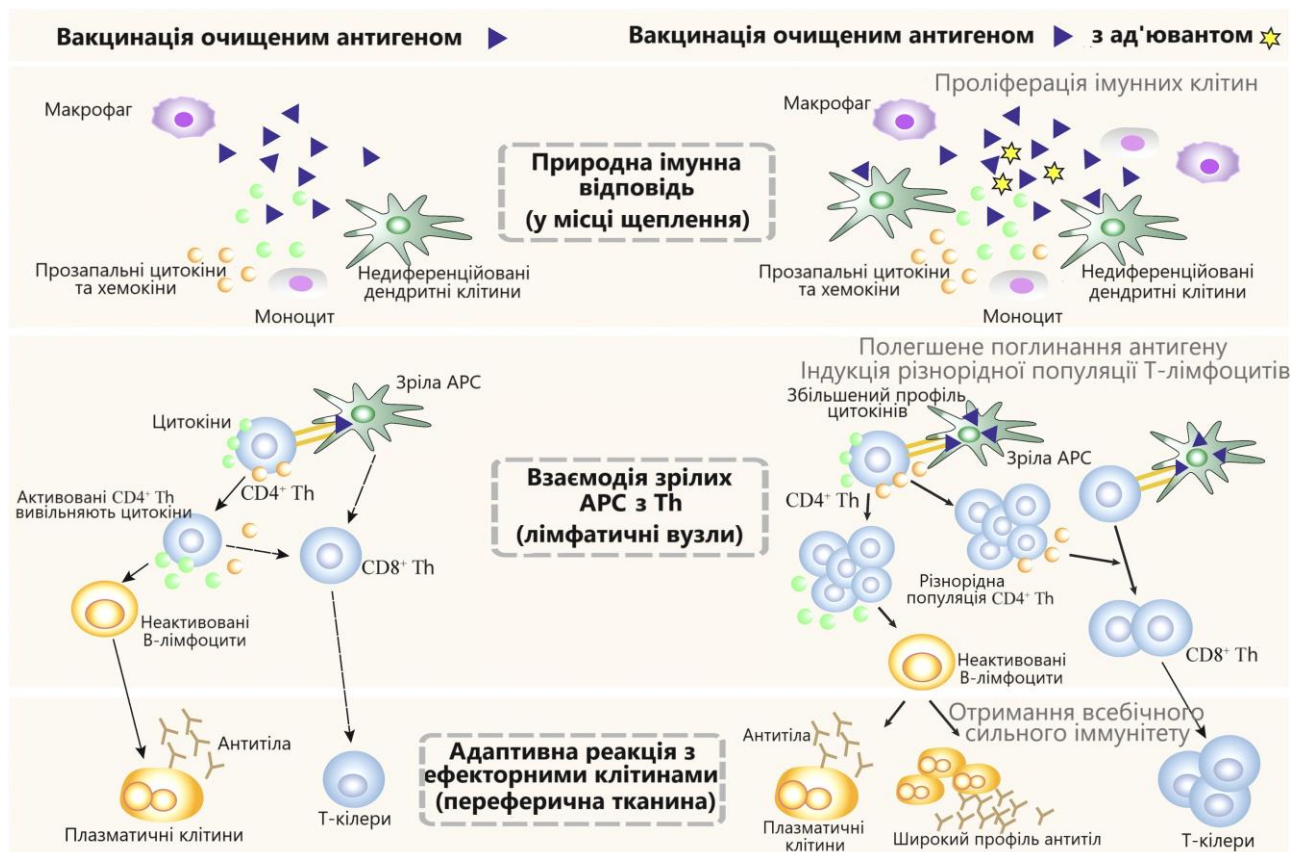


Рисунок 5.12 – Імунні відповіді, викликані імунізацією вакцинами в присутності ад'юванта або без нього. *Скорочення:* APC – антигенпрезентуюча клітина (англ. – *antigen-presenting cell*); Th – Т-хелпери

Необхідно зупинитися на ряді клітин, що беруть участь в імунній відповіді (рис. 5.13):

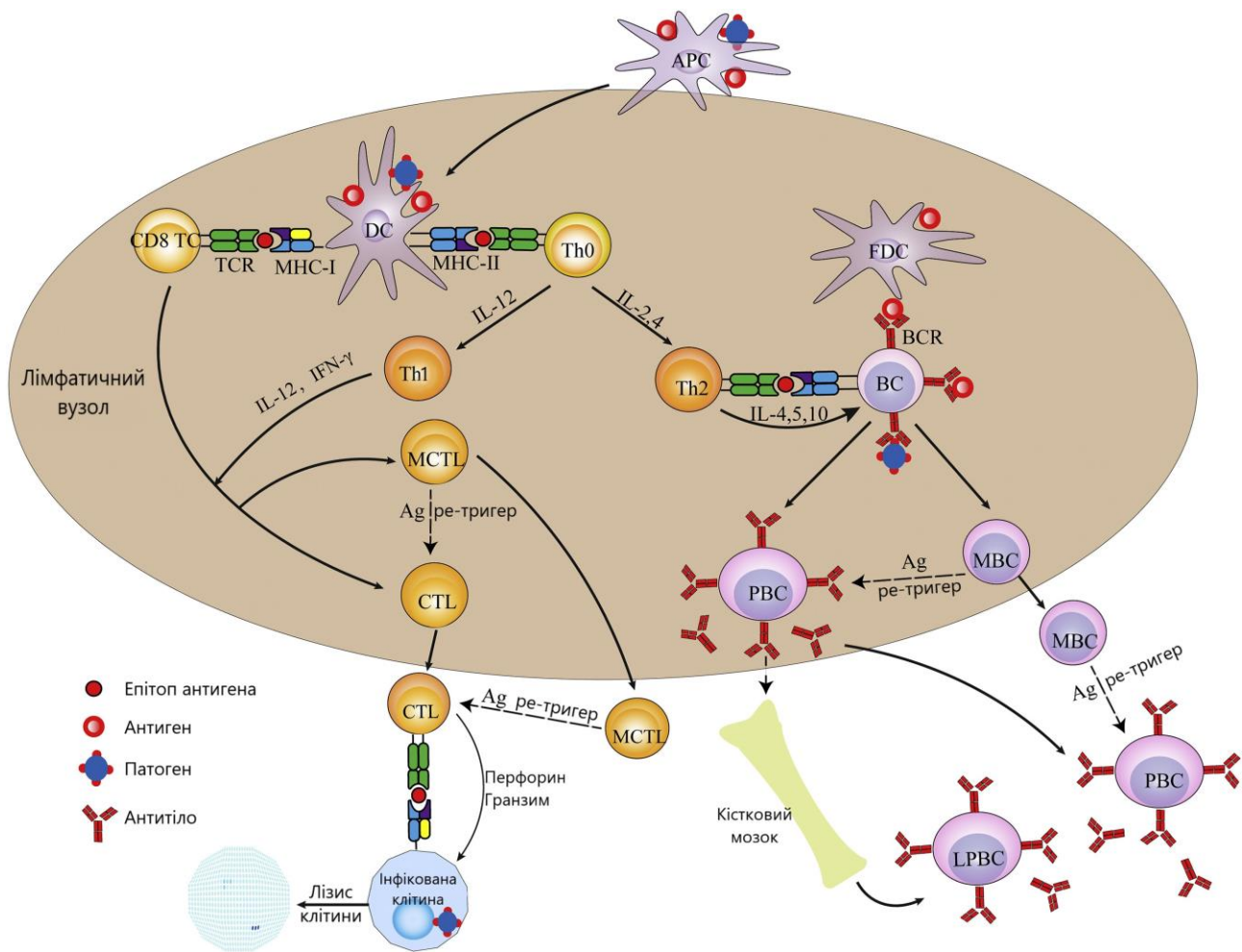


Рисунок 5.13 – Схематичний опис процесу формування гуморального та клітинного імунітету, спровокованого збудником або вакциною. *Скорочення:* APC – антигенпрезентуюча клітина (англ. – *antigen-presenting cell*); DC – дендритна клітина (англ. – *dendritic cell*); FDC – фолікулярна дендритна клітина (англ. – *follicular dendritic cell*); CTL – цитотоксичний Т-лімфоцит (англ. – *cytotoxic T-lymphocyte*); MHC – головний комплекс гістосумісності (англ. – *major histocompatibility complex*); MCTL – цитотоксичний Т-лімфоцит пам'яті (англ. – *memory cytotoxic T-lymphocyte*); TCR – Т-клітинний рецептор (англ. – *T-cell receptor*); BCR – В-клітинний рецептор (англ. – *B-cell receptor*); MBC – В-клітина пам'яті (англ. – *memory B-cell*); PBC – плазматична В-клітина (англ. – *plasma B-cell*); LPBC – довгоживуча плазматична В-клітина (англ. – *long-lived plasma B-cell*); Th0 – «наївний» недиференційований CD4⁺ Т-хелпер; Th1 – Т-хелпер 1-го типу; Th2 – Т-хелпер 2-го типу; IFN-γ – інтерферон-γ (англ. – *interferon-γ*)

➤ Т-хелпери-1 (Th-1) переважно сприяють розвитку клітинної імунної відповіді, активуючи макрофаги (основний цитокін, що виділяється, – інтерферон-γ);

➤ Т-хелпери-2 (Th-2) беруть участь у протипаразитарному імунитеті та алергічних реакціях, продукують інтерлейкіни ІЛ-4,5,10.

➤ Т-хелпери (помічники) – Т-лімфоцити, головною функцією яких є посилення адаптивної імунної відповіді. Т-хелпери активують В-лімфоцити, моноцити, натуральні кілери та ін., презентуючи їм фрагменти чужорідних антигенів при прямому контакті, а також гуморально, виділяючи цитокіни.

Більшість дослідників вважають, що ад'юванти спричиняють комбіновану дію як на антиген, змінюючи його фізико-хімічні властивості і посилюючи імуногенність, так і безпосередньо на організм, викликаючи ряд неспецифічних реакцій. Вплив ад'ювантів на властивості антигена стосується зміни його структури, молекулярної маси, полімерності, розчинності та інших фізико-хімічних та імунохімічних властивостей. *Сьогодні відома значна кількість ад'ювантів, що відрізняються походженням (природні та синтетичні) та фізико-хімічними властивостями:*

1) мінеральні ад'юванти;

2) рослинні ад'юванти (наприклад, сапоніни). Ад'ювант QS21 виділений з південно-американського дерева *Quillaja Saponaria*. Імуностимулюючий комплекс ISCOM являє собою ад'ювантну фракцію *Quillaja Saponaria*, включену в частинки, що складаються з холестерину, фосфоліпідів і антигенів клітинних мембран. ISCOM вводили до складу вакцин проти вірусу грипу, вірусу папіломи людини, ВІЛ, збудника малярії, низки пухлин та ін. Показано, що вакцини, які містять ISCOM, найбільш ефективні при інтраназальному введенні та індуюють змішану Th-1 і Th-2-імунну відповідь;

3) масляні ад'юванти (ад'ювант Фрейнда, мінеральні олії, тваринні та рослинні олії);

4) цитокіни (наприклад, інтерлейкіни ІЛ-1 α та ІЛ-1 β) та пептиди;

5) мікробні ад'юванти (корпускулярні та субодиничні структури, білки, нуклеїнові кислоти, ліпіди, вуглеводи, ліпополісахарид-білкові комплекси);

6) синтетичні речовини (полінуклеотиди (полі-А:У, полі-Г:Ц та ін.), пептиди (мураміддипептид та його похідні, поліелектроліти – поліаніони, полікатиони));

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

Враховуючи викладене вище, стає зрозумілим значний інтерес, який виник в останнє десятиліття до ліпосом як до *drug delivery system* і перспективних ад'ювантних компонентів. Звертає на себе увагу той факт, що ліпосоми відповідають більшості вимог, що висуваються до ад'ювантів. Важливим є можливість отримання вакцин з ліпосомальними ад'ювантами, які можуть легко піддаватися стерилізуючій фільтрації, на відміну від мінеральних або жирових ад'ювантів. Це у свою чергу дозволяє проводити стерилізуючу фільтрацію на кожному етапі отримання вакцинних препаратів. Ліпосоми знижують токсичність інкапсульованих у них антигенів і мають високу біосумісність. Крім того, з'явилися дослідження, в яких у складі вакцин запропоновано використовувати комбінацію з кількох ад'ювантів: ліпосом, цитокінів, пептидів, імуностимулюючих комплексів.

5.5.1. Протівірусні вакцини у ліпосомальній формі

Вакцини для профілактики гепатиту. Отримані різними авторами дані свідчать про те, що якщо введені у водному розчині антигени призводять до негативної або дуже слабкої імунної відповіді, то їх інкапсулювання у ліпосоми призводить до високих титрів антитіл у сироватці крові. При підшкірній ін'єкції морським свинкам поверхневого антигена вірусного гепатиту В отримано високі титри антитіл, що захищають тварин від інфекції. Показано, що антиген вірусу гепатиту, включений до ліпосом, призводить до появи антитіл у 750 разів більших титрах, ніж при імунізації водним розчином антигена. Очищені препарати антигена вірусу гепатиту включали в ліпосоми, що складаються з яєчного фосфатидилхоліну (ЕРС, англ. – *egg phosphatidylcholine*), холестерину і додецилфосфату у співвідношенні 7 : 2 : 1. Таким чином, показано ад'ювантні властивості ліпосом.

Безсумнівний інтерес представляють дані про можливість зміни типу імунної реакції при введенні антигена у складі ліпосом. Як антиген використовували поверхневий пептид вірусу гепатиту В (HBsAg, англ. – *hepatitis B surface antigen*), введення якого мишам лінії C57BL приводив до імунної реакції Th-2-типу. Введення даного антигена в ліпосоми у присутності імуномодулятора показало сильну проліферативну реакцію Т-лімфоцитів. Т-лімфоцитна підгрупа була ідентифікована як Th-1-тип на

підставі цитокінного профілю, який свідчив про значне виділення інтерферону- γ (цитокін Th-1) та надзвичайно низький рівень IL-4 (цитокін Th-2). Контрольна група мишей лінії C57BL, імунізована пептидом з квасцями, показала дуже низький рівень проліферації Т-лімфоцитів, до того ж не відзначалося жодного збільшення виділення інтерферону- γ або IL-4. Таким чином, було встановлено, що реакція типу Th-1 відбувається у тварин, яким HBsAg вводили тільки у складі ліпосом.

НераХенTM – ліпосомальна вакцина для профілактики гепатиту В випускається фірмою *Lipoxen*. При застосуванні цієї вакцини рівень антитіл у 20 разів перевищує рівень специфічних антитіл порівняно з використанням неліпосомальної вакцин. У зв'язку з цим виникла реальна можливість зменшити профілактичну дозу вакцини і кількість ін'єкцій.

Авторами отримана ліпосомальна вакцина проти гепатиту В, в якій був інкапсульований рекомбінантний HBsAg розміром 22 нм. Ліпосоми отримували з диміристоїлфосфатидилхоліну (DMPC, англ. – *dimirystoylphosphocholine*) та диміристоїлфосфатидилгліцерину (DMPG, англ. – *dimyristoylphospoglycerol*) в молярному співвідношенні 9 : 1. При порівнянні ліпосомальної вакцини з вільним та адсорбованим на гелі гідроксиду алюмінію HbSAg встановлено, що ліпосомальна вакцина приводила до вищого рівня гуморальної відповіді (титру специфічних антитіл).

Epraxal® – вакцина для профілактики гепатиту А (виробництва *Crucell-Berna-Biotech*, Швейцарія). Препарат являє собою ліпосоми з диолеоїлфосфатидилхоліну (DOPC, англ. – *dioleoylphosphocholine*) і диолеоїлфосфатидилетаноламіну (DOPE, англ. – *dioleoylphoshhoethanolamine*) у співвідношенні 75 : 25, що містять вірус гепатиту А, інактивований формаліном, та гемаглютинін вірусу грипу. Вакцина продемонструвала високі імуногенні властивості та нешкідливість. При вивченні рівня захисних антитіл у крові імунізованих тварин методом імуноферментного аналізу виявлено, що сероконверсія на 14-ий та 28-ий день становила відповідно 97 % та 98 %. Після другої ін'єкції ліпосомальної вакцини рівень сероконверсії становив 100 %.

Фірма *Lipoxen* розробила першу в світі вакцину для профілактики гепатиту Е, яка містить рекомбінантний білок гепатиту Е в ліпосомах, отриманих за відомою технологією *Itixen*.

Вакцини для профілактики грипу. Грип та його ускладнення дають істотну захворюваність і смертність у людей похилого віку. У людей мо-

лодого віку імуногенність при вакцинації забезпечує 70–90 % захисту, а у літніх людей – близько 50 %. Запропонована тривалентна ліпосомальна вакцина, що містить по 15 мкг гемаглютиніну кожного вірусного штаму і 33 мкг ІЛ-2 людини. Проведено вивчення імуногенності та нешкідливості запропонованої ліпосомальної вакцини у порівнянні зі стандартною комерційною вакциною. Її вводили внутрішньом'язово літнім людям (середній вік – 80 років). При вивченні рівня захисних антитіл методом імуноферментного аналізу встановлено наявність захисного титру антитіл у 33 % людей при використанні стандартної вакцини та у 48 % при імунізації ліпосомальною. У цих дослідженнях показано однакову нешкідливість вакцин, а імуногенність була вищою у ліпосомальному препараті. Причому, антитіл до ІЛ-2 не виявлено. Не виявлено також збільшення рівня антифосфоліпідних антитіл у крові імунізованих людей.

Існуючі на сьогодні вакцини проти грипу є переважно препаратами з інактивованого вірусу. Існує три види вакцин:

- вакцина із цілісного вірусу;
- вакцина із фрагментованого вірусу;
- вакцина на основі окремих активних фрагментів вірусу грипу.

Для підвищення імуногенної активності даних вакцин використовують як різні ад'юванти (наприклад, MF59 – комбінований ад'ювант на основі сквалену), так і ліпосомальні форми. Вивчення нешкідливості та імуногенності комерційних протигрипозних вакцин проводили на двох групах хворих. Першій групі вводили вакцину, що містить гемаглютинін, виділений з вірусу, а другій групі – вакцину, отриману шляхом введення гемаглютиніну в ліпосомальну мембрану, що складається з природного РС. Для дослідження використовували тривалентну вакцину. Обидві вакцини викликали однакове достовірне підвищення середнього титру протигемаглютинінових антитіл проти всіх трьох компонентів вакцини через місяць після імунізації. Однак у групі осіб, імунізованих ліпосомальною вакциною, продемонстровано статистично достовірне підвищення титру проти штамів вірусу Сінгапур і Пекін більш ніж у чотири рази у порівнянні з вільною формою вакцини. Відсоток хворих, у яких титр при імунізації ліпосомальною вакциною досягав захисної величини, був також значно вищий. Особливе клінічне значення мав той факт, що у 68,4 % осіб, імунізованих ліпосомальною вакциною, досягався захисний рівень антитіл проти

всіх трьох компонентів вакцини, проти 38 % при вакцинації звичайною вакциною.

Численні дослідження ліпосомальних вакцин, що містять вірус грипу або його високоочищені компоненти, привели до створення комерційних ліпосомальних препаратів для профілактики грипу. Одним із таких препаратів є вакцина *Inflexal®V* виробництва *Crucell-Berna Biothech* (Швейцарія). Препарат є полівалентною ліпосомальною (віросомальною) інактивованою вакциною проти грипу (рис. 5.14), до складу якої входять поверхневі антигени трьох штамів вірусу грипу типів А і В. Віруси інактивують формальдегідом, після чого з вірусів виділяють і очищають антигени – гемаглютиніни та нейромінідази. В одній дозі міститься по 15 мкг гемаглютиніну кожного штаму. Препарат являє собою ліпосоми з DOPC і DOPE у співвідношенні 75 : 25.



Рисунок 5.14 – Схематичне зображення віросомальної вакцини проти грипу

Віруси грипу постійно змінюються, тому склад вакцин, що випускається у різні роки, може відрізнятися. Перевагою віросом є можливість імітації ними вірусних частинок. Механізм дії віросом можна описати так:

- фагоцитоз віросом імункомпетентними клітинами;
- презентація антигенів (гемаглютинін та нейрамідиназа), включених в ліпосому, імунній системі;
- активація CD4+ Т-хелперів для вироблення цитокінів;
- цитокіни стимулюють клітини для вироблення антитіл до антигенів вірусу грипу.

Захисний рівень антитіл у крові зазвичай досягається через 2–3 тижні після вакцинації. Тривалість поствакцинального імунітету становить 6–12 місяців.

Вірус простого герпесу-2 є найпоширенішим збудником герпесу статевих органів. Запропоновано ліпосомальну вакцину, що містить пептиди, виділені з вірусу герпесу. У модельних експериментах на мишах заражених вірусом герпесу (самки заражені інтравагінально, самці – інтра ректально) одноразове введення ліпосомальної вакцини приводило до 86–100 % виживання при інтравагінальному зараженні і 71–100 % при інтра ректальному. Різні за складом пептиди вірусу герпесу мали різну імуногенну активність.

Значним успіхом вакцинології можна вважати вакцину *Shingrix*®. *Shingrix*® – вакцина виробництва *GlaxoSmithKline* (Бельгія), спрямована на профілактику **оперізуючого лишая** і являє собою суспензію для внутрішньом'язового введення, що складається з ліофілізованого рекомбінантного антигена ліпопротеїну Е вірусу вітряної віспи, який при використанні відновлюється суспензією AS01, що виконує функцію імунологічного ад'юванта. Антиген являє собою очищену усічену форму глікопротеїну, експресованого в клітинах яєчників сирійського хом'ячка. Суспензія ад'юванту AS01 складається з 3-0-дезацил-4'-монофосфорилліпиду А з *Salmonella* (штам *Minnesota*) і молекули сапоніну (QS21), очищеного з екстракту *Quillaja saponaria* (мильне дерево). Обидва компоненти введені до складу ліпосоми, що складається з DOPC та холестерину у фосфатному буфері (рис.5.15).

Вакцина випускається у двох флаконах: в одному знаходиться суспензія ад'юванту (50 мкг монофосфорилліпиду А; 50 мкг QS21, 1 мг DOPC, 0,25 мг холестерину, 0,160 мг натрію дигідрофосфату, 0,54 мг калію дигідрофосфату), у другому – ліофілізований антиген у кількості 50 мкг. Умови зберігання препарату – 2–8 °С. Як допоміжні компоненти використовували 20 мг сахарози (стабілізатор), 4,385 натрію хлориду і 0,08 мг полісорбату-80. Перед використанням суспензія ад'юванта вводиться у флакон з антигеном (після приготування суміш може зберігатися протягом 6 годин при 2–8 °С). Вакцина продемонструвала високі протективні властивості при захисті від оперізуючого лишая.

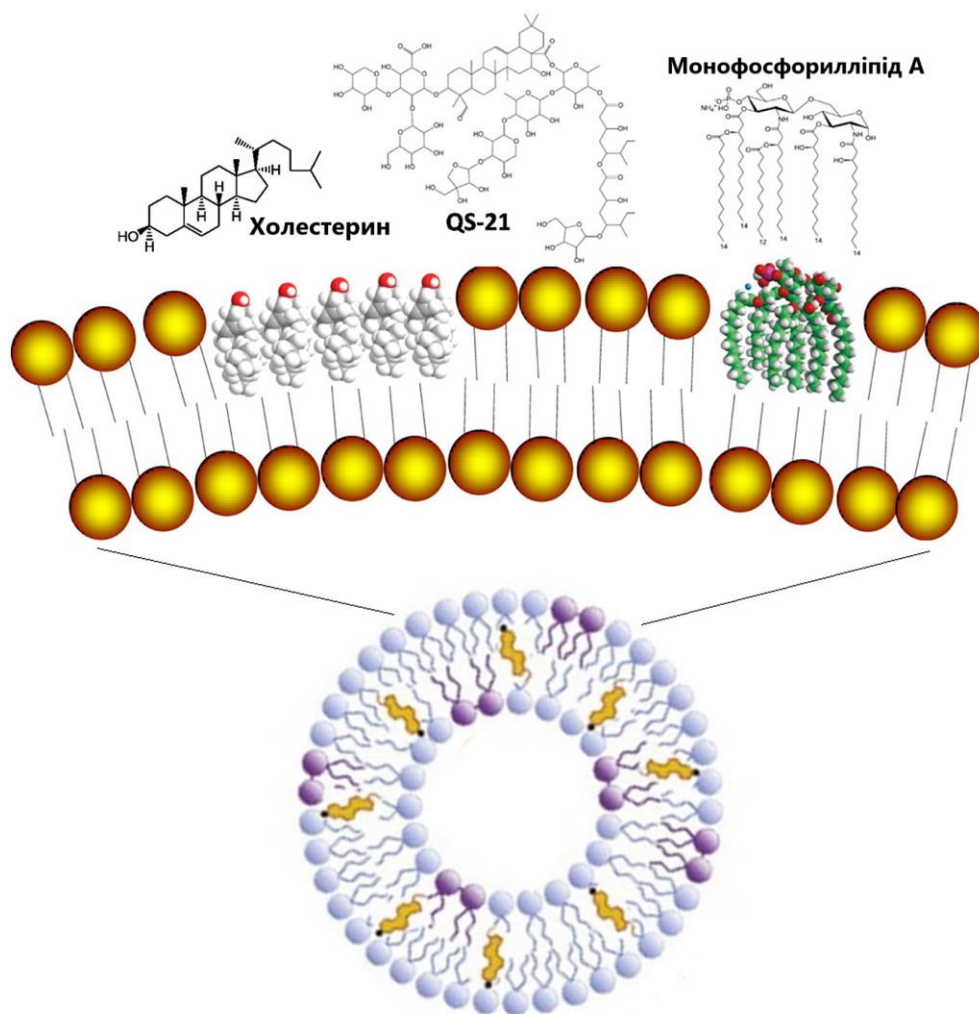


Рисунок 5.15 – Схематичне зображення вакцини на основі ад'юванту AS01, наприклад, Shingrix® – вірусної вакцини проти оперізуючого лишая, Mosquirix® – бактеріальної вакцини проти малярії

5.5.2. Антибактеріальні вакцини у ліпосомальній формі

Вакцини, що містять токсини та анатоксини. Анатоксин, або токсойд – це бактеріальний токсин, інактивований шляхом спеціальної обробки (наприклад, формаліном), але який зберіг антигенні властивості.

Внутрішньовенне введення водного розчину дифтерійного анатоксину сенсibilізованим мишам призводило до загибелі 70 % тварин протягом 1 хвилини, а у 30 % мишей спостерігалися симптоми важкої форми сироваткової хвороби. Тварини, імунізовані анатоксином, інкапсульованим у ліпосоми, вижили, і у них були відсутні симптоми сироваткової хвороби. У сенсibilізованих дифтерійним анатоксином тварин після підшкірного введення ліпосомального антигена не спостерігався феномен Артуса.

Проведено дослідження імуногенності *анатоксинів Clostridium oedematiens* (збудник газової гангрени), інкапсульованих у ліпосоми різного складу. Найбільше виживання спостерігалось в групі тварин, імунізованих ліпосомами, до складу яких входили ЕРС, кардіоліпін, виділений з серця великої рогатої худоби, а також фосфатидилсерин і сфінгом'єлін, виділені з мозку великої рогатої худоби. Оскільки ліпосоми з РС і кардіоліпіну більш активні, ніж ліпосоми з РС, то ймовірно, що їхня більша імуногенність пов'язана з присутністю кислого фосфоліпіду – однієї з небагатьох антигенних ліпідних речовин.

Очищений *правцевий анатоксин* кон'югували з ліпосомами за допомогою глутарового альдегіду. При внутрішньочеревному введенні отриманого препарату мишам лінії BALB/c встановлено, що імунізація приводить до виникнення високого рівня протиправцевих імуноглобулінів G. Одночасно показано, що вміст специфічних протиправцевих імуноглобулінів класу E був дуже незначним. Отримані сироватки містили титр захисних антитіл, оскільки введення летальних доз токсину у дозі 100 dlm (лат. – *dosis letalis minima*) повністю захищало тварин від загибелі. Імунізація тварин вільним розчином правцевого анатоксину або анатоксину, сорбованого на гелі гідроокису алюмінію, викликали утворення імуноглобулінів як класу G, так і класу E. Крім того, повторна імунізація мишей ліпосомальною формою правцевого анатоксину після первинної імунізації приводила до появи переважно імуноглобуліну G. При ліофілізації ліпосомальної форми антигена, імуногенність препарату зберігалася протягом 6 місяців при температурі зберігання 37 °C.

На мишах лінії BALB/c вивчали вплив різних ліпосом, що складаються з фосфоліпідів і холестерину, взятих у еквімолярних співвідношеннях, на імуногенні властивості інкапсульованого правцевого анатоксину. Антитіла визначалися за допомогою імуноферментного методу. В результаті встановлено, що ад'ювантні властивості ліпосом найбільш виражені при співвідношенні фосфоліпідів до правцевого анатоксину 2050 : 1 по масі; збільшення співвідношення між білковою фракцією та ліпосомальною призводило до значного зниження титрів. Рівень антитіл не змінюється при використанні ліпосом, що складаються з фосфоліпідів з температурою фазового переходу «гель/рідина» від 32 до 41,5 °C. При вивченні впливу ад'ювантних властивостей ліпосом на імуногенність правцевого анатоксину використовували два методи включення до складу ліпосом:

метод дегідратації/регідратації та метод ковалентного зв'язування. Автори не встановили відмінностей у дії препаратів на гуморальну імунну відповідь. Відзначено, що 82,3 % антигена зв'язується з ліпосомами незалежно від їхнього заряду – нейтрального, негативного чи позитивного. Виявлено відмінності у зв'язуванні з антигеном ліпосом, що містять жирні кислоти різного ступеня насиченості.

Проведено вивчення *комбінованої ліпосомальної вакцини, що містить дифтерійний та правцевий анатоксини*. Ліпосоми були отримані ультразвуковою обробкою суміші ліпідів, що складається з соєвого РС і холестерину. В 1 мл вакцини міститься по 5 Lf (англ. – *limits of flocculation*; флокулююча одиниця) кожного анатоксину. Мишам BALB/c препарат вводили підшкірно. Максимальне включення анатоксинів в ліпосоми спостерігалось при співвідношенні РС : холестерин – 7 : 3, дифтерійного анатоксину 39,8 % і правцевого анатоксину 38,7 %. Антитіла в крові тварин визначали імуноферментним аналізом на 15-й, 30-й і 45-й день. Встановлено, що комбіноване використання анатоксинів призводить до вищого рівня антитіл до правцевого антигена в порівнянні з моновакциною у ліпосомальній формі, що містить правцевий анатоксин. У рівні антитіл дифтерійного анатоксину різниці не виявлено.

Встановлено, що *холерний токсин та його В-субодиниця* підвищували імунну відповідь до антигенів при спільному проникненні через слизову оболонку. При оральному введенні антигенів, що знаходяться на поверхні малих ліпосом із РС спостерігалось збільшення імунної відповіді. Для вивчення протективних властивостей холерних вакцин добровольцям перорально вводили трикомпонентну ліпосомальну холерну вакцину. Як контроль пацієнтам вводили вільну форму трикомпонентної вакцини. Обидві вакцини забезпечували 100 %-ву імуногенність, що було підтверджено захисним титром антитіл у крові пацієнтів. Водночас, вакциновані люди, які отримали антигени в ліпосомальній формі, продемонстрували більшу швидкість антигенспецифічної реакції антитіл, ніж пацієнти, що отримували вільну форму вакцини. На можливість використання холерної ліпосомальної вакцини вказує ряд робіт, в яких як антиген використовували інактивовані теплом цілісні клітини збудника холерни. Використання ліпосомальної вакцини приводило до гальмування процесу колонієутворення на слизовій оболонці у щурів.

Вакцини, що містять ліпід А. Безсумнівно дуже перспективним є використання ліпосом як контейнерів для ад'ювантів різної структури. Одним з таких ад'ювантів є ліпід А, що являє собою ліпополісахарид, виділений з грамнегативних бактерій. Висока ад'ювантна активність ліпиду А встановлена за останні 20 років численними дослідженнями. Однак застосування вакцин, у складі яких як ад'ювант використовується ліпід А, гальмується його високою пірогенною активністю (рис. 5.16).

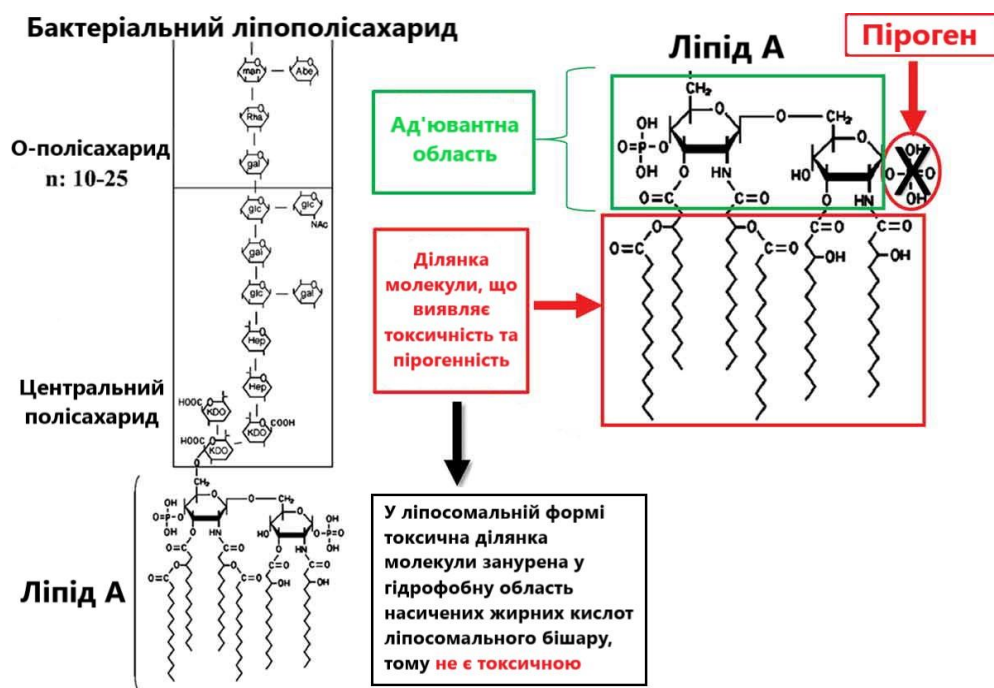


Рисунок 5.16 – Структурно-функціональні зв'язки ліпиду А, отриманого з грамнегативного бактеріального ліпополісахариду

Введення ліпиду А до складу ліпосом значно зменшує пірогенність ліпополісахариду. Наприклад, ліпід А, виділений з *Salmonella minnesota* R595 та інкапсульований в ліпосоми, виявляв меншу пірогенність порівняно з вільною формою ліпиду А. Так, непірогенна доза ліпиду А у вільному стані становила 0,32 мкг/кг маси кролика, а в ліпосомальній формі вдавалося вводити 8,1 мкг/кг маси кролика без прояву пірогенної реакції. Автори провели вивчення імуногенності ліпосомального антигена малярійного плазмодія на мавпах, в якому як ад'ювант використовували непірогенний ліпосомальний ліпід А. Отримана комерційна ліпосомальна вакцина проти малярії Mosquirix®. Ця рекомбінантна ліпосомальна вакцина проти малярії на основі білка була схвалена у жовтні 2021 року ВООЗ (розробник – Армійський НДІ Волтера Ріда (США), виробник –

GlaxoSmithKline (Бельгія)). Ефективність захисту від малярійного плазмодія становить від 26 до 50 % для немовлят та дітей молодшого віку.

Для отримання антигена використовувалися гени центральної повторюваної області і Т-клітинного епітопу прееритроцитарного циркумспорозойтного білка (CSP, англ. – *circumsporozoite protein*) малярійного паразиту *Plasmodium falciparum*, кон'югованого з поверхневим антигеном S вірусу гепатиту (HBsAg) (рис. 5.17).

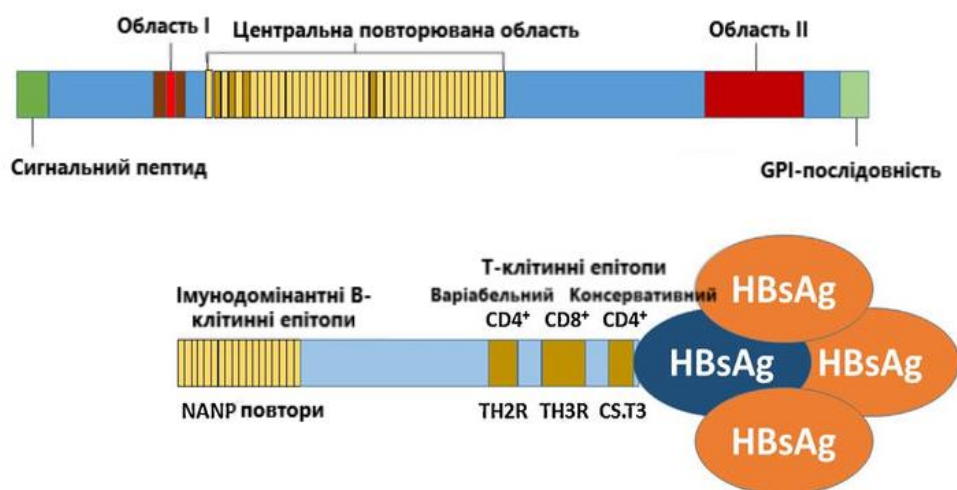


Рисунок 5.17 – Структура рекомбінантного білку вакцини *Mosquirix*®

Разом ці два білкових компоненти збираються в розчинні вірусоподібні частинки, схожі на зовнішню оболонку вірусу гепатиту В. На основі ліпосом з ад'ювантом AS01 інфекція попереджається на рахунок індукції гуморального та клітинного імунітету з високими титрами антитіл, які не дозволяють паразиту *P. falciparum* заражати печінку людини.

Ад'ювант AS01 у ліпосомальній формі складається з ряду сполук (рис. 2.4):

- ✓ монофосфорил-ліпиду А, який діє як агоніст рецептора TLR-4, активуючи Th1 для продукції цитокінів, інтерферону- γ , IL-2 та TNF- α , які пов'язані з опосередкованим фагоцитозом, захистом від внутрішніх інфекційних агентів;

- ✓ QS21 (екстракт *Quillaja saponaria*, фракція 21), яка ініціює активацію дендритних клітин для індукції імунних відгалужень опосередкованих Т-клітинами.

До складу ліпосом входить DOPC, холестерин, натрієві та калієві фосфатні солі, сахароза, полісорбат 80.

Вакцини, що містять пептиди різної структури. Ад'ювантну активність мають мікобактеріальні пептидоглікани, зокрема, мураміддипептид (MDP, англ. – *muramyl dipeptide*), його аналоги та стерео-ізомери. MDP – мінімальна структурна одиниця пептидоглікана, що входить до складу стінки грампозитивних і грамнегативних бактерій (рис. 5.18).

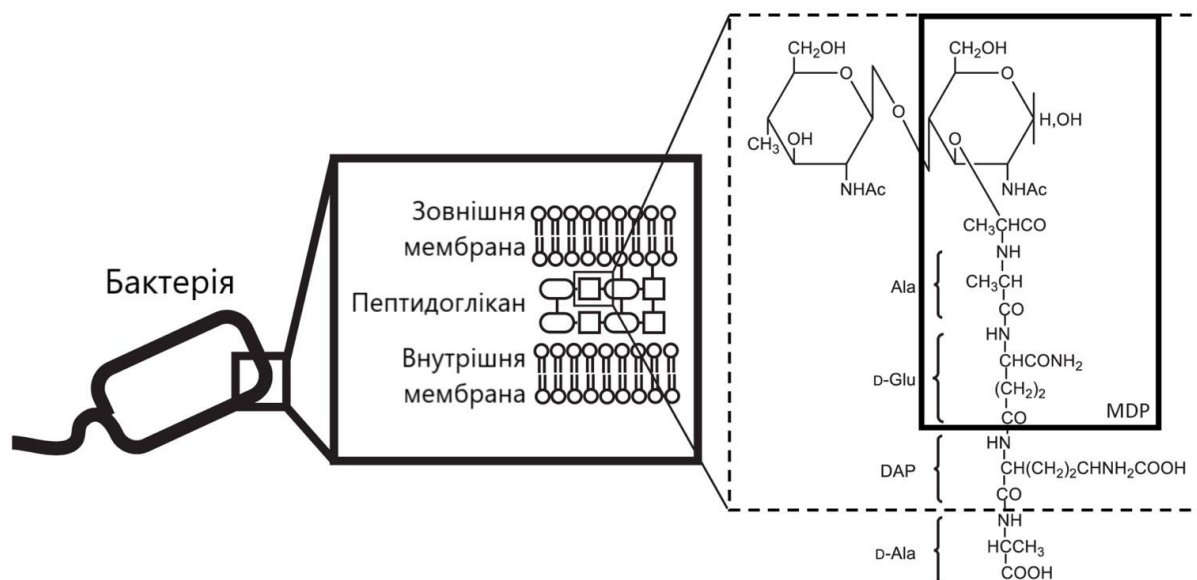


Рисунок 5.18 – Структура мураміддипептиду та його локалізація у бактеріальній клітині

MDP здатний активувати системи вродженого та адаптивного імунітету. За багатьма властивостями MDP у складі ліпосом дозволяє значно підвищити імунну відповідь і знизити його негативні властивості. Рядом авторів запропоновано використовувати MDP та його похідні – C18-MDP, C12-MDP, які є кон'югатами MDP з жирними кислотами, для підвищення антигенної активності низки антигенів при імунізації тварин. Показано, що введення C18-MDP є достатньо ефективним для створення захисного імунітету у мавп проти *P. falciparum*. Для дослідження ролі макрофагів при індукції утворення антитіл на антигени стафілококу застосовувалися ліпосоми, що містять C12-MDP. Миші, які отримували ліпосоми з C12-MDP, за два дні до ін'єкції α -токсину золотистого стафілококу демонстрували збільшення утворення протистафілококового анти- α -токсину імуноглобуліну (імуноглобуліни M та G). Встановлено, що похідні MDP або комплекс MDP з фосфатидилетаноламіном (PE, англ. – *phosphatidylethanolamine*) є ефективними агентами для активації макрофагів, спрямованих проти клітин пухлин або вірусів. Ліпосомальний ком-

плекс MDP/PE, призначений для внутрішньовенного введення, знаходився на I-ій фазі вивчення. Необхідно відзначити, що на відміну від ліпосомальної форми ліпиду А, ліпосомальний комплекс MDP/PE є токсичним та пірогенним, що затримує його застосування як ад'юванта для вакцин у медицині.

Мавп імунізували проти малярійного паразита *P. falciparum*. Дві ін'єкції антигеном, включеним у ліпосоми спільно з 6-0-стероїл-N-ацетилмураміл-D-аланіл-D-ізоглутаміном, захищали всіх тварин при зараженні летальною дозою збудника.

Проведено оцінку імуногенності *ліпосомальних вакцин з антигенними пептидами, отриманими з глікопротеїну вірусу лімфоцитарного хоріомеїнігїту*. Інкапсульовані в ліпосоми пептиди мали високу імуногенність при підшкірному введенні і викликали захисний протівірусний імунітет. Після підшкірної ін'єкції ліпосоми утворювали «депо» антигена, що полегшувало тривале завантаження антигена дендритними клітинами практично тільки в місцеві лімфовузли. Імуногенність ліпосомальної пептидної вакцини ще більше підвищувалася при введенні в ліпосомальний імуностимулюючих олігонукліотидів, що призводило до значного активування дендритних клітин. Запропонована ліпосомальна пептидна вакцина викликала захисний протипухлинний імунітет. Враховуючи, що реакції протипухлинних і протівірусних Т-клітин викликаються переважно дендритними клітинами, що транспортують антиген з периферії в організовані лімфоїдні тканини, можна припустити, що активація дендритів ліпосомальними пептидними вакцинами свідчить про їх високу імуногенність і можливість створення захисної протівірусної та протипухлинної імунної реакції.

Безперечно, перспективним є використання *ліпосомальних вакцин, які містять патогенні пептиди*, за допомогою яких можна запобігти аутоімунним захворюванням без неспецифічного пригнічення реакцій Т-клітин, як це було показано при підшкірному введенні мишам ліпосом, що містять пептид К-2, який відповідає залишкам 201–216 бичачого інтерферорецептора ритеноїд-зв'язуючого білка.

Інтерес представляє *ліпосомальна вакцина, що містить пептид, виділений з пилей Pseudomonas aeruginosa (синегнійна паличка), як В-епітоп*. У ліпосоми також включали очищений гемаглютинін з вірусу грипу, як Th-епітоп, а також ад'ювант. Отримано імунну відповідь у вигляді проду-

кції специфічних антитіл, здатних захистити від інфекції, викликаной *P. aeruginosa*.

Ліпосоми як імунологічні ад'юванти були використані для отримання антитіл, специфічних до поліпептиду. Ліпосоми були приготовлені з суміші ЕРС, холестерину, доцетилфосфату та α -токоферолу у молярних співвідношеннях 4 : 3 : 0,1 : 0,5 і мали негативний заряд. У ліпосоми поміщали негативно заряджений поліпептид, який внаслідок заряду не комплексувався з ліпосомою і знаходився всередині ліпідної структури. Найкращі результати отримані при внутрішньовенній або внутрішньочеревній імунізації.

Вакцини, що містять антигени мікобактерій туберкульозу. У культуральному фільтраті *Mycobacterium tuberculosis* знаходиться ранній секреторний антиген ESAT-6 з молекулярною масою 6 кДа. Цей білок кодується областю геному RD1 *M. tuberculosis*, втраченою в процесі тривалого культивування у вакцинному штамі БЦЖ (скор. від Бацила Кальмета-Герена, фр. – *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG)) (рис. 5.19).

Результати доклінічних досліджень протективних властивостей антигена ESAT-6 у вигляді пептидних і ДНК вакцин, а також у складі бактеріальних векторів на основі БЦЖ і *S. typhimurium* показали, що внаслідок недостатньої імуногенності білка ESAT-6 формування захисного ефекту імунізації визначається способом його введення та доставки в організм.

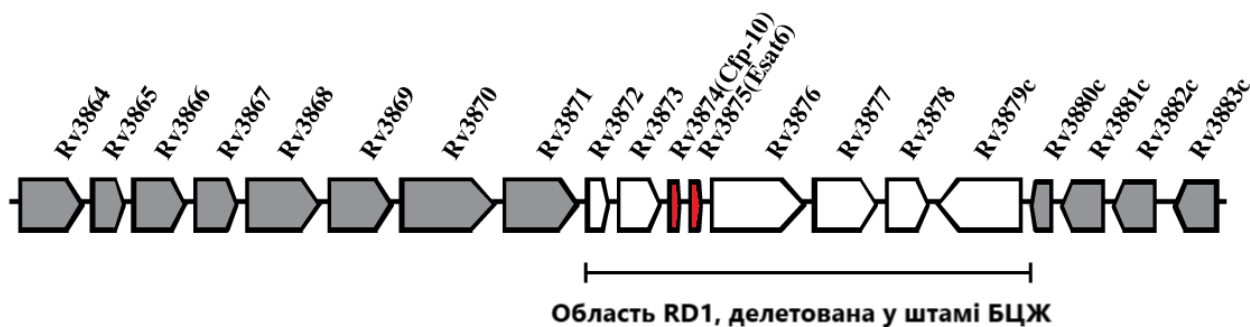


Рисунок 5.19 – Делетована у вакцинному штамі БЦЖ область геному *M. tuberculosis* RD1, яка кодує секреторні білки ESAT-6 (англ. – *early secreted antigenic target*) и CFP-10 (англ. – *culture filtrate protein*), що відповідають за вірулентність мікобактерій

Субодиничні вакцини складаються з очищеного білка та ад'ювантів. Крім антигена ESAT-6 в субодиничних вакцин запропоновано використовувати й інші очищені білки – 85B та 85A. Обнадійливі результати отри-

мані під час створення грипозних векторів, що експресують антиген ESAT-6. Одержання атенуйованих рекомбінантних штамів вірусу грипу А, що експресує ранній секреторний мікобактеріальний антиген ESAT-6 у модельних експериментах із зараження мишей туберкульозною інфекцією (2-кратна інтраназальна імунізація), продемонструвало кращий захисний ефект у порівнянні з класичною БЦЖ.

Запропоновано ліпосомальну вакцину для лікування та попередження туберкульозу. Авторами запропоновано використовувати як антигени поліпептиди, виділені з вірулентних *M. tuberculosis* штаму MTB-C NCTC 13536: HSP70 (70 кДа); Ag85B (30 кДа); CFP 10 (10 кДа); ESAT-6M (6 кДа); LpqNM (19 кДа), інкапсульовані у ліпосоми розмірами 80–120 нм. До складу ліпосомальної композиції також були введені ліпіди *M. tuberculosis* штаму MTB-C. Ліпіди були представлені гліколіпідами, наприклад, ліпоарабіномананом. Продукт ліофілізують у присутності 5 % сахарози як кріопротектора. Ліпосоми було отримано з використанням соєвого РС. Ліпосомальна вакцина при введенні мишам призводила до значного збільшення клітинної імунної відповіді *in vivo*. Наприклад, рівень імунної відповіді при використанні як антигена очищеного білкового похідного в ліпосомальній вакцині перевищував титри антитіл у 4–8 разів, а при використанні вакцини з Ag85B – у 8–14 разів порівняно з неліпосомальними антигенами. Вакцина також індукувала поліантигенну гуморальну відповідь, яка забезпечувала високий протективний ефект. Причому автори показали збільшення протективного ефекту при використанні ліпосомальної вакцини, що містить сахарозу в 1,5 рази більше, ніж при використанні препарату без сахарози. При введенні вакцини у дозі 50 мкг з сахарозою імунна відповідь була ідентична введенню 200 мкг без сахарози. Таким чином, запропонований ліпосомальний препарат, призначений для лікування або попередження туберкульозу, за рахунок введення людині разової інокулюючої дози 25–50 мкг фрагментів клітинної стінки *M. tuberculosis* штаму MTB-C у ліпосомальній формі, що містить ліпіди штаму та природні фосfolіпіди. Ліпіди, виділені зі штаму БЦЖ, зв'язані зі злитим білком антигена Ag85B-ESAT-6 в катіонних ліпосом, індукував значні рівні інтерферону- γ і титри відповідних антитіл (IgG2A), характерні для імунної Т-хелперної відповіді (Th1).

Катіонний ліпід диметилоктадециламоній активно використовувався для отримання протитуберкульозних субодиничних ліпосомальних вакцин.

Вакцини, що містять бактеріальні полісахариди. Запропоновано методи отримання ліпосомальних вакцин для профілактики правцевої, гемофільної, менінгокової, стрептокової інфекції.

Ліпосоми отримували з ЕРС зі ступенем чистоти 90 % або соєвого гідратованого РС зі ступенем чистоти 98 %. Оптимальний розмір ліпосом становив 80–300 нм. Як полісахарид використовували капсульний полісахарид *Haemophilus influenzae*. Структура капсульного полісахариду, який грає важливу роль у вірулентності бактерій *H. influenzae*, встановлена як 3-В-D-рибофунарозил-(1-1)-D-рибітол-5-фосфат. Авторами були отримані ліпосоми, що містять капсульний полісахарид і білкові антигени ряду бактерій: дифтерійний анатоксин, правцевий анатоксин, білок менінгококу, що використовуються для виробництва комерційних вакцин. Отримані авторами ліпосомальні вакцини при підшкірному введенні мишам продемонстрували високий рівень специфічних захисних антитіл.

Рибосомальні вакцини. Рибосоми – органели, які продукують білок по матриці іРНК. Виділені рибосоми з матрицею в чистому вигляді і являють собою рибосомальну вакцину.

Рибосомальні вакцини являють собою рибосомальну фракцію, виділену з мікроорганізмів, яка має імуногенні властивості: здатність індукувати синтез антитіл і захищати людину і тварин від зараження відповідними мікроорганізмами. Протективна активність рибосомальних вакцин може бути пов'язана з адсорбованими на рибосомах молекулами бактеріальних антигенів. У зв'язку з цим введення рибосомальних антигенів у ліпосоми дозволяє підвищити ефективність вакцини. Відомо, що рибосомальні вакцини ефективні в імунопрофілактиці низки інфекційних захворювань. Вивчена здатність рибосом, виділених зі штаму *Streptococcus sobrinus* 6715 (посилює розвиток карієсу на зубах) і включених в ліпосоми на основі фосфоліпідів і холестерину, індукувати синтез специфічних антитіл IgA у слині щурів. Показано, що рівень IgA проти рибосом і цілісних клітин *S. sobrinus* 6715 був у імунізованих щурів значно вищий, ніж у контрольних тварин. Була також різко знижена колонізація *S. sobrinus* 6715 у ротовій порожнині. Автори запропонували використовувати ліпосомальні рибосомальні вакцини для захисту від карієсу. Так, наприклад, при вве-

денні 12,5 мкг ліпосомальної вакцини виявлено значні титри захисних антитіл, а введення чистої вакцини без ліпосом в дозі 250 мкг не продемонструвало імуногенності.

Запропонована вакцина, в якій як антиген використані рибосоми *Candida albicans* (збудник кандидозу). Ліпосоми отримували з DMPC і DMPG у молярному співвідношенні 9 : 1. Як ад'ювант використовували ліпід А. Проведено вивчення ліпосомальної вакцини, що містить рибосоми, у порівнянні з вакциною із ад'ювантом Фрейнда (один з найбільш поширених ад'ювантів, що містить убиті туберкульозні мікобактерії, суспендовані у масляній фазі водної емульсії) на мишах. Рівень імунної відповіді був вищим. Автори запропонували використовувати отриману вакцину для імунізації людей.

Вакцини, що містять компоненти бактеріальної клітини. З метою підвищення імуногенності антигенів, що вводяться через слизову оболонку, автори включали гемаглютинін *Bordetella pertussis* (збудник кашлюка) в ліпосоми, що містять як модельний антиген глутатіон-S-трансферазу *Schistosoma mansoni* (кишечний паразит). Неінбредних мишей двічі інтраназально імунізували ліпосомальним препаратом, що містить постійну дозу глутатіон-S-трансферази і зростаючі дози гемаглютиніну. Додавання 3 мкг гемаглютиніну до ліпосом викликало більш ніж 10-кратне підвищення титру антитіл до глутатіон-S-трансферази. Присутність гемаглютиніну не змінювало гуморальної відповіді у тварин, а їх сироватки містили імуноглобуліни G (IgG1, IgG2a та IgG2b). Однак лише за наявності гемаглютиніну в зазначеній дозі спостерігалася поява антитіл до глутатіон-S-трансферази класу IgGA. Ці результати показують, що гемаглютинін має потенціал підвищення імуногенності антигенів, введених в ліпосоми.

Основний білок зовнішньої оболонки гонококу – протеїн I – був включений в ліпосоми, що складаються або з суміші DPPC і DOPC у співвідношенні 1 : 1, або з DPPC та DOPE у співвідношенні 1 : 1. Авторами виявлено, що практично весь білок був включений в ліпідний бішар, причому, істотних відмінностей у ступені включення залежно від ліпідного складу не виявлено, причому близько 80 % білка було орієнтовано назовні, що нагадувало структуру бактеріальної мембрани гонококу. Середній діаметр везикул становив близько 0,5 мкм, але за рахунок додаткової екструзії міг бути помітно зменшений без втрати включення в бішар білка.

Проведені дослідження зв'язування ліпосом як з моноклональними антитілами проти даного білка, так і з антитілами, отриманими шляхом імунізації кроликів, продемонстрували досить близькі результати. Склад ліпосом також не визначав здатності до зв'язування. Досліджувалася імунозахисна дія білка, виділеного з фільтрату культури, з молекулярною масою 30 кД. Як ад'ювант були використані ліофілізовані ліпосоми з РС. Імунізація тварин приводила як до клітинних (проліферація Т-клітин і секреція цитокінів), так і до гуморальних реакцій. Враховували виживання та кількість живих мікобактерій в органах: селезінці, печінці, легенях. Результати авторів переконливо показують, що ліпосоми є ідеальною системою доставки вакцин, яка може нести на собі секреторний білок мікобактерій туберкульозу. Ліпосоми отримували з суміші фосфоліпідів, холестерину, дицетилфосфату в молярних співвідношеннях 2 : 1,5 : 0,22. Фосфоліпіди у більшості випадків були представлені DMPC. В ліпосоми включали ліпід А. Імунізація кроликів зазначеним комплексом приводила до вищого титру антитіл проти ліпиду А, ніж при імунізації чистим ліпідом А.

Очищений антиген Fi *Yersinia pestis* (збудник бубонної чуми), прикріплений до поверхні ліпосом, при внутрішньочеревному введенні мишам стимулював високі титри антитіл у сироватці, а також викликав захисну реакцію при зараженні мишей через слизову оболонку мікробними клітинами в дозі 10^5 *Y. pestis*. Захисна реакція у тварин досягається вже при одноразовій імунізації.

Зі стимульованих мітогенів лімфоцитів щурів отримували безклітинні супернатанти культур, багаті фактором, що активує макрофаги (MAF, англ. – *macrophage activating factor*). MAF – стимулює макрофаги цитотоксичності до пухлин, секреції цитокінів або видалення патогенів. Отримані супернатанти інкапсулювали в ліпосоми різного розміру та ліпідного складу і порівнювали їх здатність надавати нормальним мишачим макрофагам цитотоксичність до пухлинних клітин з аналогічною здатністю неінкапсульованого MAF, який додавали у позаклітинне середовище. Нормальні макрофаги мишей ліній C57BL16, C3H/He, оброблені MAF у ліпосомальній формі, проявляли значні цитотоксичні властивості *in vitro* проти сингенних і алогенних пухлинних клітин, але не вбивали непухлинні клітини. Показано, що ліпосомальні MAF роблять макрофаги токсичними для пухлин у 20 000 разів меншій концентрації, ніж вільний MAF.

На можливість використання ліпосомальних вакцин вказують автори, що вивчають ліпосоми як потенційні імуностимулятори. Мишей імунізували *антигеном, виділеним з фільтрату культури криптокока* та емульгованим у повному ад'юванті Фрейнда. Другу групу тварин імунізували цим самим антигеном, інкапсульованим у ліпосоми на основі РС. Імуногенні властивості препаратів оцінювали за реакцією гіперчутливості уповільненого типу та за здатністю захищати тварин від внутрішньовенного введення живої культури криптококів у кількості 10^5 . Пригнічення розвитку культури оцінювалося через 7 днів шляхом підрахунку криптококових колонієутворюючих клітин у легенях, селезінці, печінці та головному мозку інфікованих мишей. Отримані результати підтвердили захисний ефект ліпосомальної форми антигена. Однак при імунізації антигеном, емульгованим у повному ад'юванті Фрейнда, захисний ефект був більш вираженим. Незважаючи на отримані результати, автори оцінюють використання ліпосомальної форми антигена як дуже перспективної при створенні ліпосомальних вакцин.

5.5.3. Протипухлинні вакцини у ліпосомальній формі

На поверхні багатьох клітин в організмі існує молекула, що називається *Муцин-1* (MUC-1, англ. – *Mucin-1*).

MUC-1 – це білок, який експресується на поверхні епітеліальних клітин і є продуктом гіперекспресії у багатьох злоякісних пухлинах. Велика кількість MUC-1 характерна для багатьох ракових клітин. Аномалії в MUC-1 зафіксовані при раку молочної залози, передміхурової залози, яєчників, підшлункової залози та колотерального раку. Дослідження показали, що можна відрізнити антигени MUC-1, які є специфічними для клітин пухлини і нормальних тканин (рис. 5.20). Вакцина вводиться підшкірно у 4 ділянки тіла. До складу препарату входить імуноад'ювант монофосфориλλіпід А – неспецифічний стимулятор, що забезпечує більш інтенсивну взаємодію вакцини з клітинами імунної системи. Безпечність ліпиду А була підтверджена у клінічних дослідженнях. Так, наприклад, монофосфориλλіпід А як допоміжну речовину введено у комерційну вакцину проти папіломи – Церварікс® (виробник *GlaxoSmithKline*, Бельгія). Обидва компоненти включені в ліпосоми (MUC-1 та ліпід А). Препарат добре перено-

ситься, і при використанні в дозах від 20 до 200 мкг виживання хворих становить від 5,4 до 14,6 місяців.

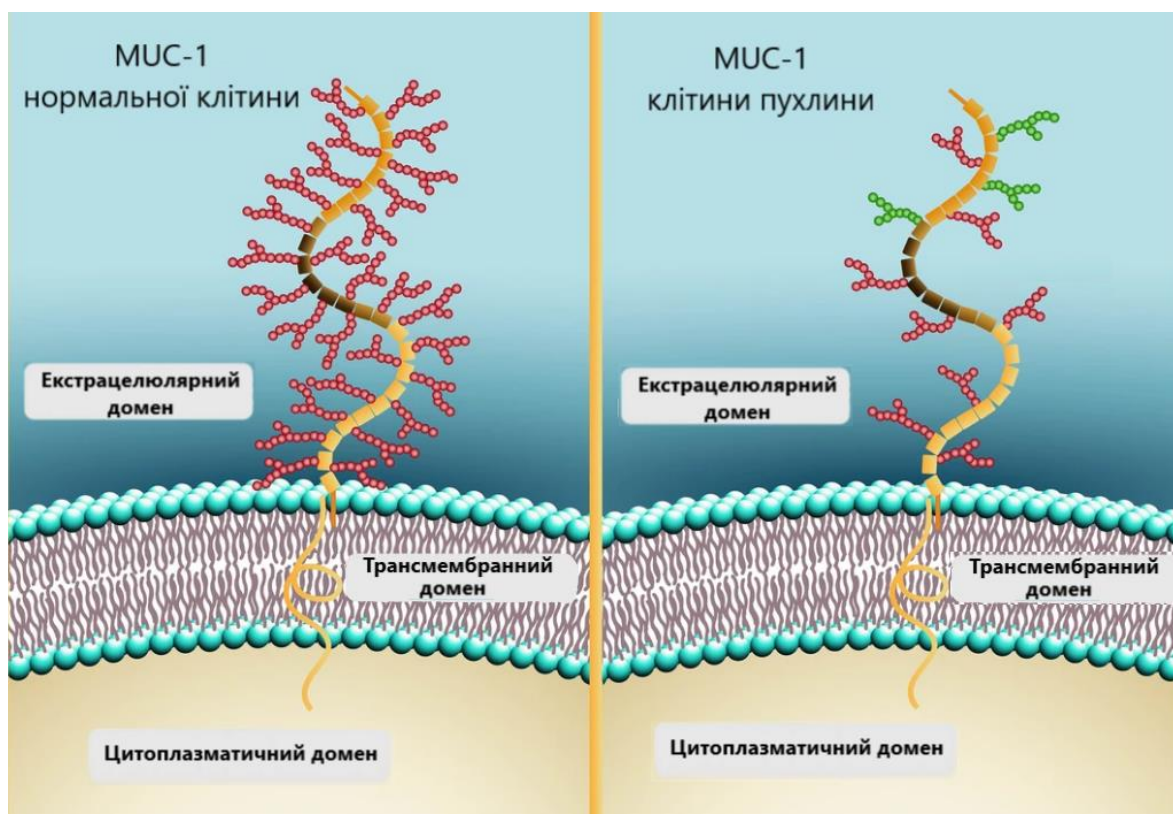


Рисунок 5.20 – Структура MUC-1 у нормальній та пухлинній клітині: MUC-1 гіперглікозилюваний у нормальних клітинах, а повторювана амінокислотна послідовність (чорна частина) прихована вуглеводними залишками, тоді як у ракових клітинах змінюється кількісний та якісний склад вуглеводів

Слід зазначити, що у 94 % хворих на рак простати слизоутворюючий MUC-1 являє собою глікопротеїн, який пов'язаний зі злоякісною трансформацією та стійкістю до цитотоксичних агентів. Він індукує клітинну імунну відповідь, яка може забезпечити опосередковане імунне знищення пухлини. Вакцина продемонструвала нешкідливість та ефективність при раку простати.

Ряд ракових клітин, включаючи клітини раку легень, містять збільшену кількість пептиду MUC-1 (ці клітини – мішень для терапії).

Розпочато 3-й етап клінічного вивчення недрібноклітинного раку легень. Недрібноклітинний рак легень становить приблизно 75 % всіх ракових захворювань легень. Створена ліпосомальна вакцина проти цього виду раку – L-BLP-25 (*Stimuvax*®). Доклінічне вивчення показало, що L-BLP-25 генерує потужні типи цитотоксичних Т-хелперів (Th1) для боро-

тьби з MUC-1, має протипухлинну активність як *in vivo*, так і *in vitro* (рис. 5.21). Клінічні дослідження показали, що вакцина покращує медіану виживання хворих на недрібноклітинний рак легень і забезпечує клінічно значущі покращення в профілі пухлини і якості життя імунізованих хворих. Клінічні випробування L-BLP-25 проводяться компанією *Merck Serono Oncothyreon* (фаза IIb/III).

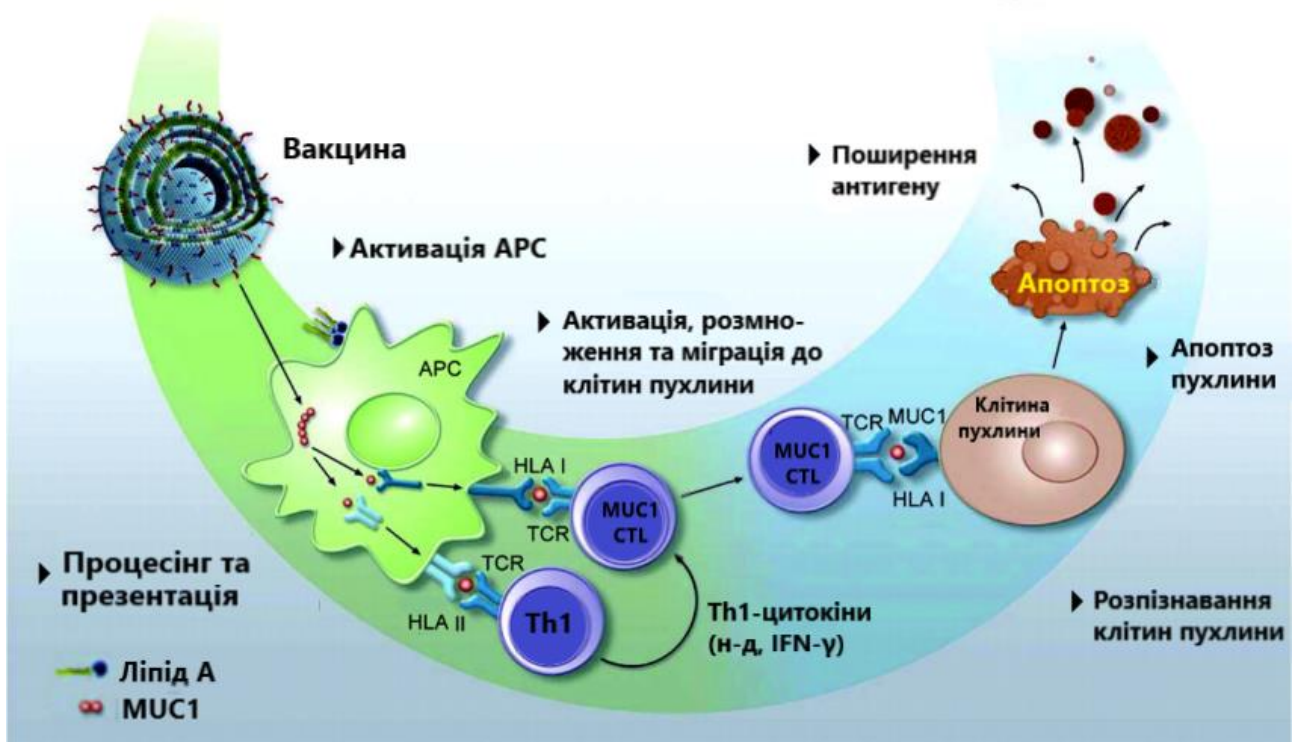


Рисунок 5.22 – Прогнозований механізм дії вакцини L-BLP-25.

Скорочення: APC – антигенпрезентуюча клітина (англ. – *antigen-presenting cell*); MUC1 – Муцин-1 (англ. – *Mucin-1*); MUC1 CTL – MUC1-специфічний цитотоксичний Т-лімфоцит (англ. – *cytotoxic T-lymphocyte*); TCR – Т-клітинний рецептор (англ. – *T-cell receptor*); Th1 – Т-хелпер 1-го типу; IFN-γ – інтерферон-γ (англ. – *interferon-γ*); HLA – лейкоцитарний антиген людини (англ. – *human leukocyte antigen*)

Клінічні випробування L-BLP-25 проведено на 171 пацієнті віком від 17 до 41 року з недрібноклітинним раком легень. Встановлено відсутність токсичної дії препарату. Більше 54 % хворих були живі понад 24 місяці. Виявлено клінічні переваги ліпосомальної вакцини. Побічні ефекти, що спостерігались при застосуванні L-BLP-25: почервоніння, больові відчуття в області ін'єкції, кашель, втома, задишка.

Для імунізації мишей використовували клітини мишачої аденокарциноми GZH1, в які був трансформований людський антиген MUC-1, включений в ліпосоми. Така імунізація забезпечує повний захист тварин як при підшкірній, так і при внутрішньовенній імунізації пухлинними клітинами.

Особливий інтерес представляють ліпосомальні вакцини, що містять гліколіпіди – *гангліозиди* (Gang, англ. – *ganglioside*). Роль Gang у клітині постійно вивчається. У ссавців Gang є невід’ємним компонентом зовнішнього шару плазматичної мембрани, в якій вони взаємодіють з іншими сфінголіпідами, холестерином, трансмембранними білками, включаючи рецепори і переносники сигналів. Встановлено, що Gang є ключовими молекулами у плазматичній мембрані, що беруть участь у процесі адгезії, проліферації та розпізнаванні клітин. Gang локалізуються переважно на поверхні мембран клітин і відіграють важливу роль у міжклітинних взаємодіях, у тому числі в імунологічних процесах. Відомо, що в пухлинній клітині порушено обмін Gang. Деякі з них можуть використовуватися як маркери (GD₂, GD₃, GM₃) та антигени пухлин людини та тварин. Встановлено, що Gang є високоефективними антигенами для отримання моноклональних антитіл та профілактичних вакцин. Відомо, що Gang відіграють важливу роль у процесах клітинного диференціювання, рецепції деяких гормонів, бактеріальних токсинів. Gang можуть використовуватися як основа для отримання діагностичних систем та лікарських форм. У ряді пухлин нейроектодермального походження показана неоекспресія Gang, які, на думку ряду авторів, відіграють ключову роль у інфільтрації пухлинних клітин та утворенні метастазів, що робить Gang привабливими молекулами-мішенями для імунотерапії раку.

З використанням різних методів очищення, включаючи хроматографічні, були отримані високоочищені фракції Gang мозку великої рогатої худоби (ідентифіковані GM₂, GT_{1b}, GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}) і селезінки (GT_{1b}, GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}). Із еритроцитів коней отримано Gang GM₃-NeuGc, з якого шляхом хімічної модифікації був отриманий Gang GM₃-NeuAc. Вперше встановлено, що до складу олігосахаридної частини Gang GM₃-NeuGc з еритроцитів коней входить залишок N-гліколілнейрамінової кислоти, а церамід містить переважно сфінгозин 20 : 1 і жирну кислоту 24 : 0 . Вважається, що структура визначає фармакологічну активність екзогенного Gang. Отримані нами індивідуальні Gang були досліджені на різних біоло-

гічних моделях: при частковій гепатоектомії у щурів виявлено, що Gang GM₃ з еритроцитів коней посилює проліферацію гепатоцитів при індукованому гепатиті, при цьому здатність GM₃ збільшувати включення [3H]тимідину в ДНК не залежала від типу залишку нейрамінової кислоти: N-ацетилнейрамінова (NeuNAc) чи N-гліколілнейрамінова (NeuNGc). Введення щурам з частковою гепатоектомією Gang GM₃-NeuGc приводило до двукратного збільшення специфічної радіоактивності ДНК у порівнянні з контролем. Вплив GM₃ був специфічним, оскільки сумарні Gang мозку великої рогатої худоби, що містять GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b}, GQ, демонстрували відсутність впливу на проліферацію клітин, а ліпіди еритроцитів, з яких був видалений Gang GM₃, не впливали на проліферативну активність клітин.

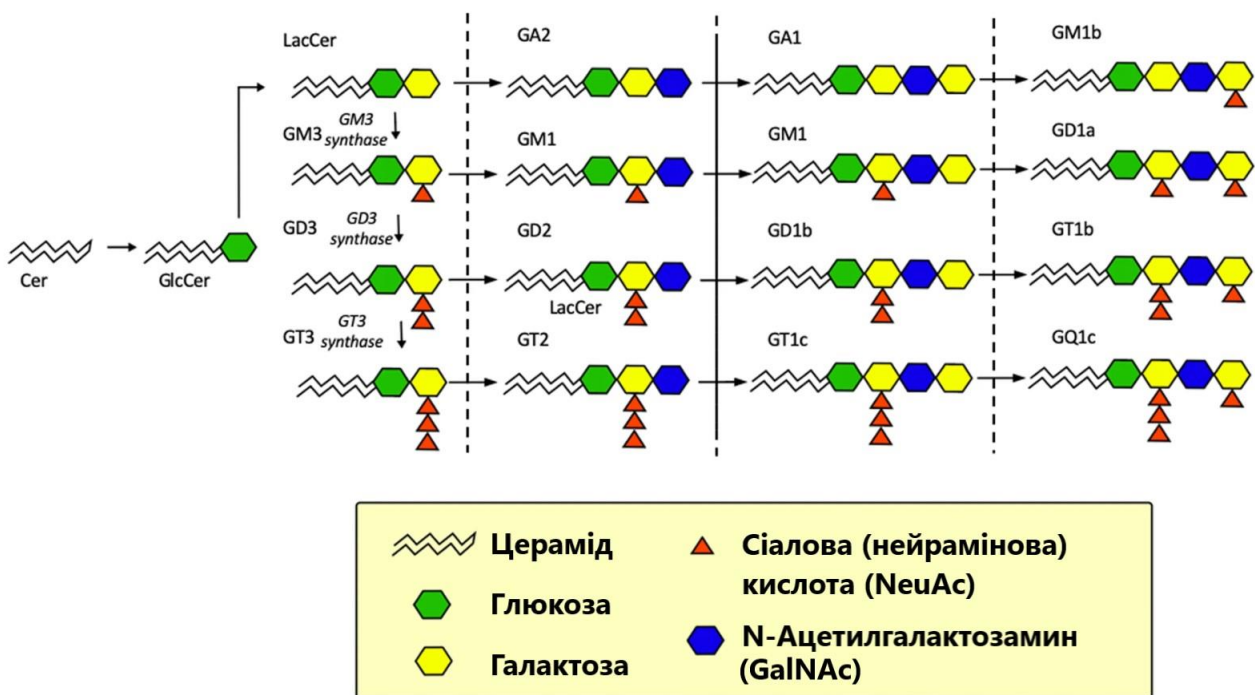


Рисунок 5.23 – Схематичне зображення структури та шляху біосинтезу гангліозидів

Досліджено вплив Gang та фосфоліпідів на чутливість пухлинних клітин до цитостатичної та мембранотоксичної дії селезінкових ефektorів. Клітини-мішені обробляли розчином Gang та фосфоліпідними ліпосомами. Обробка клітин-мішеней фосфатидилетаноламіном (PE, англ. – *phosphatidylethanolamine*) викликала підвищення їх чутливості в мембранотоксичному тесті при концентрації ліпиду 200 і 20 мкг/мл. При цих же концентраціях спостерігалось підвищення чутливості пухлинних клітин і

в цитостатичних тестах. Кардіоліпін та ЕРС як у мембранотоксичному, так і в цитостатичному тесті не підвищували чутливості клітин-мішеней до селезінкових ефекторів. Обробка клітин-мішеней препаратами мозкових Gang приводила до вираженого зниження їхньої чутливості до спленоцитів. Використання комбінації ЕРС/мозкові Gang призводило до різкого підвищення чутливості клітин-мішеней до клітин-ефекторів. Цей ефект залежав від дози Gang. Комбінація РЕ/мозкові Gang підвищували чутливість клітин-мішеней до спленоцитів у мембранотоксичному тесті меншою мірою, ніж комбінація ЕРС/мозкові Gang. У цитотоксичному тесті підвищення чутливості клітин-мішеней при використанні комбінації РЕ/Gang було менш виражено, ніж при використанні одного РЕ. Встановлено, що сам по собі ЕРС, введений в мембрану пухлинної клітини-мішені, не впливає на її чутливість до цитотоксичної та мембранотоксичної дії селезінкових ефекторів, а суміш Gang мозку знижує чутливість клітин-мішеней. Вперше показано, що введення в мембрану клітин-мішеней ЕРС та суміші мозкових Gang істотно підвищує їх чутливість до цитотоксичної та мембранотоксичної дії селезінкових ефекторів. Gang мозку знижують, а тимусні підвищують чутливість пухлинної клітини до мембранотоксичної дії селезінкових ефекторів. Підвищення чутливості передусім обумовлено введенням у мембрану ненасичених жирних кислот і, частково, різницею у структурі полярних головок Gang. Можна припустити, що в цій роботі підвищення чутливості пухлинних клітин до цитотоксичної та мембранотоксичної дії селезінкових ефекторів також пов'язано передусім зі зміною її мембрани під впливом ненасичених жирних кислот ЕРС, а також істотною умовою впливу ефекторів клітин-мішеней є властивості вуглеводних головок Gang мозку, вбудованих у мембрану клітин.

Успішні протиракові вакцини націлені на активацію цитотоксичних Т-клітин і, отже, повинні містити потужний антиген і ад'ювант. Було показано, що націлювання антигена на макрофаги CD169 селезінки викликає стійкі відповіді CD8 Т-клітин за допомогою перенесення антигена. Цікаво, що макрофаги CD169 також можуть активізувати природні Т-кілери 1 типу, активуючи їх через ліганди, такі як α -галактозилцерамід (α GalCer, англ. – *α -galactosylceramide*). α GalCer є природним ад'ювантом за рахунок активації дендритних клітин. Автори включали Gang GM₃ і α GalCer у ліпосоми, що містять білок овальбумін (OVA), для досягнення націлювання на CD169. Системна доставка ліпосом з GM₃- α GalCer-OVA приводила до

специфічного захоплення CD169 макрофагами селезінки та стимулювання високої продукції інтерферону природними Т-кілерами. Таким чином, ліпосоми з антигеном GM₃-αGalCer, є платформою для створення вакцин. Дослідження проведено на мишах лінії C57BL/6. Ліпосоми отримували методом екструзії із ліпідної плівки, отриманої з ЕРС, яєчного фосфатидилгліцерину і холестерину при співвідношенні (3,8 : 1 : 2,5). У хлороформний розчин перед упарюванням додавали 3 мол.% Gang GM₃, 30 мкг αGalCer. Після випарювання хлороформу плівку гідратували у розчині ОВА з концентрацією 1 мг/мл. Використовуючи екструзію отримували наночастинки розміром близько 200 нм. Ліпосоми зберігали при 4 °С протягом 2 місяців.

Наведені у цьому розділі матеріали демонструють використання ліпосомальних форм вакцин для профілактики бактеріальних, вірусних, паразитарних та грибкових інфекцій. Встановлено, що ліпосоми різного складу є ефективною системою доставки і презентації різних антигенів. Крім доставки, ліпосоми виконують функцію ад'ювантів і можуть використовуватися для створення вакцин. При отриманні ліпосомальних конструкцій для створення вакцини особливу увагу необхідно приділяти розміру і заряду наночастинок, ламелярній структурі, ліпідному складу ліпосом: насиченості жирних кислот і температурі фазового переходу. Як було показано, розмір ліпосом впливає на презентацію антигена, що у свою чергу може змінювати імунну відповідь організму. На зв'язування антигена з поверхнею ліпосом або інкапсуляцію антигена може впливати поверхневий заряд наночастинок. Так, наприклад, для створення вакцин надається перевага катіонним ліпосомам, оскільки вони ефективніше взаємодіють з аніонною мембраною клітин імунної системи. Також необхідно враховувати, що заряд, склад ліпосом та структура взаємодії наночастинок/антиген може визначати ступінь інкапсуляції антигена та зниження внаслідок цього імунної відповіді організму. Крім того, необхідно враховувати, що аніонні антигени будуть ефективніше взаємодіяти з катіонними ліпідами. До складу ліпосом входять природні та синтетичні фосфоліпіди. Склад ліпідів у ліпосомах може визначати плинність мембрани за рахунок використання ліпідів з різною температурою фазового переходу. Ліпіди з вищою температурою фазового переходу можуть збільшувати жорсткість мембрани наночастинок. У ряді випадків у ліпосомах присутній холестерин, який здатний змінювати їх плинність і посилювати гумо-

ральну імунну відповідь. Необхідно зазначити, що ад'юванти відіграють важливу роль в активації та дозріванні антиген-презентуючих клітин для можливої активації Т і В-клітин. В даний час відомо ряд ліпосомальних вакцин, які використовуються в клініці для попередження захворювань різної етіології, і десятки препаратів знаходяться на стадіях доклінічного та клінічного вивчення.

5.6. Вакцина для профілактики гепатиту А

Вірус гепатиту А є пікорнавірусом (типова структура див. рис. 4.10). Вірус не має оболонки та містить одноланцюгову (+) РНК, упаковану в білкову оболонку. Було виявлено лише один серотип вірусу, але є кілька генотипів. В ділянці, що кодує капсид вірусу гепатиту А, висококонсервативні кластери рідкісних кодонів обмежують антигенну мінливість.

Гепатит А продовжує залишатися одним з найчастіше реєстрованих інфекційних захворювань, що поширюються по всьому світу, і продовження виникнення великих спалахів серед населення вказує на те, що гепатит А залишається серйозною проблемою охорони здоров'я. Доступність вакцини проти гепатиту А дає можливість суттєво знизити захворюваність та потенційно ліквідувати інфекцію.

Вакцини проти гепатиту А – це препарати, які запобігають захворюванню на гепатит А. Вакцини ефективні приблизно в 95 % випадків, а імунітет зберігається не менше 20-ти років, а можливо і все життя людини. При призначенні імунізації рекомендується приймати дві дози, починаючи з однорічного віку. Вакцину вводять внутрішньом'язово. Перші вакцини проти гепатиту А були схвалені у 1991 р. в Європі та у 1995 р. у США. Ці вакцини включені до Списку основних лікарських засобів ВО-ОЗ. Розроблено кілька інактивованих та живих атенуйованих вакцин проти гепатиту А. Через високу захисну ефективність, імуногенність та безпечність перевага надається інактивованим вакцинам.

В даний час відома низка комерційних вакцин для профілактики гепатиту А (табл. 5.6): *HavrixTM*, *Avaxim*, *Epaxal®*, *Healive®*, *Vaqta®*, *Biovac®A*.

Таблиця 5.6 – Характеристика вакцин проти гепатиту А

Назва вакцини, виробник	Штам вірусу	Культура клітин	Склад 1 дози вакцини	Описа вакцини
<i>HavrixTM</i> , Glaxo-SmithKline Biologicals S.A., Бельгія	HM-175	MRC-5	750 антигенних одиниць (ELISA); доп.речовини: алюміній – 0,5 мг, формальдегід – 0,5 мкг	Суспензія інактивованого формальдегідом вірусу гепатиту А, сорбована на гідроксиді алюмінію
<i>Avaxim-160</i> , Sanofi Pasteur, Франція	GMB	MRC-5	160 антигенних одиниць; доп.речовини: алюміній – 0,3 мг, формальдегід – 0,5 мкг, феноксіетанол – 2,5 мкг	Суспензія інактивованого формальдегідом вірусу гепатиту А, сорбована на гідроксиді алюмінію
<i>Healive®</i> , Sinovac, Китай	TZ84	BEAS-2B	250 антигенних одиниць (ELISA); доп.речовини: алюміній – 0,3 мг, формальдегід – 0,5 мкг,	Суспензія інактивованого формальдегідом вірусу гепатиту А, сорбована на гідроксиді алюмінію
<i>Vaqta®</i> , Merck Sharp & Dohme, США	CR326F	MRC-5	25 антигенних одиниць (ELISA); доп.речовини: алюміній – 0,45 мг.	Суспензія інактивованого формальдегідом вірусу гепатиту А, сорбована на алюмінію гідроксифосфату сульфаті
<i>Epaxal®</i> , Crucell-Berna-Biotech, Швейцарія	RG-SB	MRC-5	24 антигенних одиниць (ELISA); DOPC:DOPE – 75:25, гемагглютинін вірусу грипу А – 10 мкг	Ліпосомальна форма (віросома) вакцини проти вірусу гепатиту А (інактований формаліном)
<i>Biovac®A</i> , Zhejiang Pukang Biotechnology, Індія	H2	MRC-5	6,5 мкг CCID50	Атенуйований живий ліофілізований вірус
<i>TwinrixTM</i> , Glaxo-SmithKline Biologicals S.A., Бельгія	HM-175	MRC-5	360 антигенних одиниць (ELISA); HBs-Ag-рекомбінантний 10 мкг, доп.речовини: алюміній – 0,45 мг	Суспензія інактивованого формальдегідом вірусу гепатиту А та HBs-Ag (рекомбінантний), сорбована на алюмінію гідроксиді та алюмінію фосфаті

Примітка. MRC-5 – культура диплоїдних клітин фібробластів людини, BEAS-2B – культура диплоїдних клітин бронхів людини; DOPC – диолеїлфосфатидилхоліну; DOPE – диолеїлфосфатидилетаноламін; очищають хроматографією, інактивують формальдегідом і при необхідності сорбують на алюмінієвих сполуках.

Як видно з таблиці 5.6, вірус, адаптований до клітинної культури, розмножується в клітинах фібробластів людини, зазвичай у клітинах MRC-5 (лінія культури диплоїдних клітин, яка складається з фібробластів, отриманих з тканини легень 14-тижневого абортowanego плода чоловічої статі). Вірус очищують від клітинних лізатів за допомогою ультрафільтрації та ексклюзійної гель-хроматографії або іншими методами, інактивують формаліном і абсорбують на ад'юванті – гідроксиді алюмінію. У порівнянні з виробництвом живих атенуйованих вакцин для виробництва інактивованих вакцин потрібна значно більша кількість антигена вірусу гепатиту А. Таким чином, виробництво інактивованих вакцин проти гепатиту А зазвичай ускладнюється приготуванням великих кількостей вірусних антигенів у звичайних культурах у стаціонарних колбах або ролерних флаконах.

Техніка культури клітин-мікроносіїв була вперше розроблена наприкінці 1960-х років та успішно застосовувалася для виробництва вакцин проти сказу, поліомієліту та інших вірусних вакцин. Однією з безперечних переваг культури клітин-мікроносіїв є здатність забезпечувати високий вихід продукту, що може допомогти вирішити проблему нестачі вірусних антигенів для інактивованих вакцин проти гепатиту А. Ця вакцина не виробляється з використанням технології мікроносіїв через непридатність клітин MRC-5 до росту на мікроносіях. Для продукції антигена вірусу гепатиту А в системі мікроносіїв необхідно встановити клітини, які підходять для виробництва на мікроносіях. Наприклад, клітини *Vero* добре ростуть на мікроносіях, однак вірус гепатиту А складно адаптувати для росту у цих клітинах. У зв'язку з цим, в комерційних вакцинах використовується культура MRC-5.

Протягом останніх років з'являються повідомлення про можливість використання клітин *Vero* для отримання антигенів вірусу гепатиту А при використанні мікроносіїв, наприклад *Cytodex-1* (*Pharmacia Fine Chemicals*, Швеція). Вирощування проводили в 7 л біореакторі з робочим об'ємом 4 л. Величина розчиненого кисню регулювалася подачею повітряної суміші з різним співвідношенням O_2 , N_2 , CO_2 та повітря. Значення рН коригували за допомогою $NaHCO_3$. Клітини *Vero* вирощували на середовищі МЕМ з додаванням 100 од/мл пеніциліну, 10 ммоль/л глюкози, 5 ммоль/л глутаміну, 100 мл/л бичачої сироватки. Для вирощування на клітинах *Vero* використовували штам W вірусу гепатиту А. Підготовку вірусу здійсню-

вали таким чином: клітини *Vero* висівали в колби у концентрації, що забезпечує утворення конфлюентного моношару через 4–5 днів; клітини моношару обробляли трипсином і збирали для приготування клітинної суспензії в колбі при перемішуванні; суспензію клітин інокулювали штамом W вірусу гепатиту А і інкубували при 35 °С при перемішуванні 30 об/хв протягом 6 год; отриману культуру переносили у біореактор. Культуру в біореакторі розділяли на дві стадії, включаючи проліферацію клітин та культуру вірусу. Заражені клітини *Vero* висівали в біореактор об'ємом 7 л при вихідній щільності 1×10^5 клітин/мл. На стадії проліферації клітин створювали такі умови: рН – $7,2 \pm 0,2$, температура – $37 \pm 0,2$ °С, розчинений O_2 – 40 % насичення повітрям, швидкість перемішування – 40 об/хв. Після досягнення щільності клітин 1×10^6 клітин/мл починали стадію культивування вірусу і замінювали середовище на підтримуюче. Умови культивування були змінені на такі: рН – $7,2 \pm 0,2$, температура – $35 \pm 0,2$ °С, розчинений O_2 – 25 % насичення повітрям, швидкість перемішування 50 об/хв. Починали перфузію і доводили її швидкість до 20 мл/год (перфузія – це спосіб культивування, який забезпечує безперервний потік поживного середовища через зону його споживання). Після 28-денного культивування інфіковані клітини піддавали аналізу та збирали для отримання антигена вірусу гепатиту А. Цікаво, що антиген вірусу гепатиту А не був виявлений на стадії проліферації клітин та на ранній стадії культивування вірусу. Через 160 год антиген вірусу гепатиту А був виявлений з титром 1:8 і досяг максимуму 1:64 через 570 год. Таким чином, наприкінці культивування вірусу авторами одержано 4 л вірусної суспензії з титром 1:64. Автори дійшли висновку, що процес отримання вірусу гепатиту А на клітинах *Vero*, вирощених на мікроносіях в біореакторі, є ефективним і практичним способом отримання вірусних антигенів гепатиту А для виробництва вакцин. Показано, що цей підхід дає більший вихід клітин та антигенів вірусу гепатиту А порівняно зі статичною культурою.

Багато досліджень спрямовані на створення *технологій отримання антигенів вірусу гепатиту А з метою підвищення виходу цільового продукту*. Наявні сьогодні адаптовані до клітин штами вірусу гепатиту А демонструють дуже повільний фенотип реплікації, що перешкоджає доступній продукції антигена. Дослідники намагаються створити різні високопродуктивні штами вірусу. Було виділено штам, що характеризується швидким ростом і виникненням мутацій у ділянці внутрішньої посадки рибо-

соми (IRES, англ. – *internal ribosome entry site*) у поєднанні зі зміною кодонового складу. IRES – регуляторна ділянка мРНК еукаріотів та їх вірусів, яка забезпечує кеп-незалежну, або внутрішню ініціацію трансляції. При такому механізмі ініціації рибосома зв'язується з мРНК безпосередньо в ділянці IRES, які найчастіше розташовуються в 5'-нетрансльованій області недалеко від сайту ініціації трансляції, оминаючи стадії розпізнавання кепа та сканування.

Характеристика активності IRES цього швидкозростаючого штаму (NM175-HP; HP) порівняно з його батьківським штамом (NM175; L0) оцінювалася на двох клітинних субстратах, які використовуються у виробництві вакцин (клітини MRC-5 і Vero), у порівнянні з лінією клітин FRhK-4 (клітини нирки плоду макаки резус), де здійснювалася її селекція. IRES, отриманий з HP, був значно активніший, ніж IRES, отриманий з L0, у всіх тестованих клітинах, при цьому обидві IRES були активнішими в клітинах FRhK-4. Ефективність трансляції IRES, отриманого з HP, також була набагато вищою, ніж IRES, отриманого з L0, особливо в генах з фоном використання кодонів HP. Ці результати корелюють з більшою продукцією вірусу за короткий час для HP у порівнянні зі L0 у будь-якій із трьох протестованих клітинних ліній, а також для обох штамів у клітинах FRhK-4 у порівнянні з клітинами Vero та MRC-5. Додавання вортманіну (хімічна сполука біологічного походження, фураностероїдний метаболіт гриба *Penicillium funiculosum*; протигрибковий препарат, специфічний інгібітор клітинних фосфоінозитид-3-кіназ; використовується в клітинній біології як інгібітор рецептор-опосередкованого ендоцитозу) призводило до збільшення кількості інфекційних вірусів та антигена в супернатанті клітин, інфікованих FRhK-4, незалежно від штаму. Нарешті, реплікація обох штамів у клоні клітин FRhK-4, адаптованих для росту із синтетичною сироваткою, була оптимальною, але штам HP знову показав вищі виходи.

Технологія отримання інактивованої вакцини для профілактики гепатиту А наведена далі. У цій технологічній схемі наведені основні етапи виробництва вакцини проти гепатиту А на культурі клітин MRC-5. Послідовність наведених стадій виділення та очищення вірусних частинок може здійснюватися в різних комбінаціях, але завжди включає стадію розщеплення трипсином або іншою протеазою.

Реактори для вирощування культури клітин та вірусу для отримання вакцин. З метою розширення виробництва вакцини та спрощення мас-

штабування виробничого процесу ряд авторів пропонують два методи культивування клітин: а) системи вирощування NCF – *NuncTM Cell Factory systems*; б) реактори зі статичною поверхнею (SSR, *Static Surface Reactor*), наприклад, *Costar Cube* або *Static mixer*.

Процедура отримання посівного матеріалу вірусу гепатиту А у системі NCF включає культивування моношарів клітин MRC-5 на матрацах площею 6000 см². Клітини MRC-5 вирощують до конфлюентних моношарів, а потім інфікують вірусом. Після інфікування клітини інкубують протягом 28 днів із щотижневою заміною середовища, яке містить 2–10 % (об/об) фетальної телячої сироватки, що забезпечує достатню продукцію вірусу. Наприкінці цього циклу надосадна рідина містить велику кількість інфекційного вірусу, наприклад, 10^{7,3} TCID₅₀/мл, який збирають безпосередньо з NCF, без лізису клітин, і використовують як джерело посівного матеріалу вірусу.

Таким чином, великі кількості інфекційного вірусу, необхідні для виробництва, одержують великомасштабним методом, який є більш відтворюваним і простішим за ролерні бутлі або колби, або за механічний збір клітин. Цей підхід дозволяє покращити масштабування технологічного процесу для отримання більшої кількості атенуйованого вірусу гепатиту А. Автори пропонують заміну стандартних ролерних бутлів, які часто використовуються, на NCF. Основною одиницею NCF є ємність (лоток) із культуральною площею 600 см², виготовлений з полістиролу, обробленого для оптимального прикріплення та розповсюдження клітин. NCF-блок складається з 10 ідентичних культуральних одиниць (лотків) із загальною площею поверхні 6000 см². У двох кутах блоку є спеціально розроблені отвори, що утворюють вертикальні труби, які з'єднують лотки у кілька шарів. Ці вертикальні трубки закінчуються двома адаптерами для повітряних фільтрів та спеціально розробленим тефлоновим з'єднувачем. Всі вироби стерилізовані опроміненням і поставляються виробником готовими до використання. Середовище для клітин MRC-5 у NCF аналогічне середовищу, використовуваному в ролерних бутлях. Клітини вирощують у статичній культурі, при цьому клітини прикріплюються до твердого субстрату, покритого рідким середовищем, а постачання клітинам поживних речовин та кисню здійснюється за допомогою дифузії. Використання NCF підвищує відтворюваність операцій, імітуючи умови, що використовують-

ся під час виробництва ролерних бутлів. Тим не менш, методи збору культури та подальшої обробки відрізняються.

NCF лише частково вирішили проблему збільшення масштабу, тому авторами запропоновано використання SSR-реакторів, щоб отримати якомога більшу площу поверхні для кожного реактора, забезпечуючи належний контроль навколишнього середовища у всьому біореакторі. Перший варіант SSR складається з листів полістиролу щільно упакованих у пластиковий куб, який піддається стерилізації. Всього в одному кубі доступно 85 000 см² корисної поверхні для вирощування (порівняно з 6000 см² для 10-лоткового NSF). У другому варіанті в реакторі присутні металеві, керамічні, скляні або пластмасові статичні перемішуючі елементи утворюють щільно упаковану поверхню росту; ці елементи можуть бути виготовлені і розташовані так, щоб забезпечити велику площу поверхні в одному реакторі для великих виробничих процесів. Вірус гепатиту А успішно культивували в обох типах реакторів. SSR має контур циркуляції, який забезпечує рециркуляцію середовища та поповнення поживних речовин через аератор, щоб контролювати рН та рівні розчиненого газу в середовищі, задовольняють потребу культури в кисні та забезпечують перфузію середовища. Ця оптимізація неможлива в ролерних бутлях або в NCF.

1. *Культивування клітин та вірусу гепатиту А.* Клітини MRC-5 вирощували партіями в лотках NCF з площею 6000 см² при 37 °C протягом 7 днів з використанням середовища William's Medium E з додаванням 10 % фетальної телячої сироватки та сульфату неоміцину. На 7-ий день клітини повторно підживлювали свіжим середовищем, що містить достатню кількість вірусу для зараження культури, і переносили в середовище з температурою 32 °C. Далі культуру інкубували при 32 °C протягом 21 доби з щотижневим підживленням.

2. *Виділення та очищення вірусу.* Ця стадія може бути реалізована кількома шляхами та комбінаціями методів. Ми наводимо два способи:

а) *Трипсинізація, концентрування вірусу гепатиту, гель-фільтрація.* Вірус гепатиту А, культивованій на клітинах MRC-5, збирають після промивання шару клітин для видалення сироватки, яка використовується в поживному середовищі. Проводять заморожування/відтаювання, після чого додають детергент (твін 20) для отримання вірусу з клітинного дебрису. Клітинний дебрис видаляють фільтрацією через мембрану 0,22 мкм. Фільтрат піддають ультрафільтрації. Отриманий концентрат можна освітлити

центрифугуванням при 5–10 тис. g протягом 1–2 год. Концентрат, який містить вірус гепатиту А, обробляють очищеним трипсином, виділеним із підшлункової залози свині. Використовуваний трипсин піддають подвійній кристалізації і зберігають у замороженому вигляді перед використанням. Перед додаванням трипсину концентрат попередньо нагрівають до 37 °С при постійному перемішуванні. Потім додають трипсин у співвідношенні 440 МО на 1 мл концентрату і суміш обережно перемішують протягом 2–2,5 год при 37 °С. Після обробки трипсином продукт може бути негайно оброблений за температури навколишнього середовища на ультрафільтраційній установці для зменшення об'єму. Використовувана мембрана є регенованою целюлозою з номінальною межею відсікання 30 кДа, максимально до 8 мл трипсинованого продукту обробляється на 1 см² мембрани при трансмембранному тиску від 0,2 до 0,6 бар для досягнення фактору концентрації від 8 до 12. Наступним етапом є гель-фільтрації з метою відокремлення білків від інтактного вірусу гепатиту А. При проведенні гель-проникаючої хроматографії після обробки трипсином необхідно також адаптувати умови для видалення залишкового трипсину. Як розділяючий гель використовується *Permeation Sepharose 4BFF*. Вірус елюється при меншому об'ємі утримування, ніж дрібніші білкові фрагменти, які вимиваються з колонки пізніше.

З метою очищення від вмісту ДНК, як походить від клітин MRC-5, проводять аніонообмінну хроматографію. Отриманий на попередній хроматографічній стадії збір вірусовмісних фракцій доводять до 0,3 М NaCl і потім змішують з іонообмінною смолою при легкому перемішуванні протягом 1–1,5 год при кімнатній температурі. Після фіксації ДНК гель видаляють фільтрацією. Нефіксовану суспензію вірусу гепатиту А розбавляють для коригування концентрації NaCl до 150 мМ. Як варіант, іонообмінну стадію очищення також можна проводити хроматографією на колонці. Кінцевий очищений продукт стерильно фільтрують через фільтри з розміром пор 0,22 мкм.

б) Лізис клітин Тритоном X-100, обробка ендонуклеазою, хроматографічне очищення, осадження ПЕГ. Вірус гепатиту А збирали з NCF шляхом обробки клітин лізуючим буфером, що містить 0,1 % Triton X-100, 10 мМ TRIS, 1 мМ MgCl₂, рН 7,5. Отриманий лізат об'єднували і заморожували в очікуванні подальшої обробки. Збір, отриманий за допомогою Тритона X-100, концентрували діалізацією з подальшою обробкою абсор-

бентом XAD для видалення залишкового тритону до концентрації не більше 10 мкг/мл. Потім вірус гепатиту А осаджували поліетиленгліколем (ПЕГ), екстрагували сумішшю хлороформ : ізоаміловий спирт. Баластну ДНК видаляли за допомогою колонки з ДНК-фільтром з наступною аніонообмінною та ексклюзійною хроматографією. Спосіб одержання вірусу з використанням NCF і Triton X-100 не вплинув на імуногенність очищеної інактивованої формаліном вакцини проти гепатиту А.

З метою удосконалення технологічної схеми очищення вірусу було запропоновано обробку лізату клітин (отриманого тритоном X-100) ендонуклеазою з подальшим очищенням аніонообмінною хроматографією для концентрування вірусу. Ця модифікація усунула необхідність у стадії концентрації/діафільтрації, обробці сорбентом XAD та колонці з ДНК-фільтром. Неспецифічна ендонуклеаза – бенсоназа (*Benzonase*), виділена з *Serratia marcescens* і клонована в *Escherichia coli*, активна як щодо РНК, так і щодо ДНК. Ця ендонуклеаза являє собою димерний білок з 2 дисульфідними зв'язками і здатна руйнувати всі форми ДНК і РНК (одноланцюгові, дволанцюгові, лінійні та кільцеві). Фермент виробляється компанією *Nycomed Pharma A/S* (Данія) у вигляді високоочищеного, добре охарактеризованого рекомбінантного білка. Ця ендонуклеаза була обрана тому, що вона має дуже високу специфічну активність, і її можна додавати безпосередньо до неочищеного лізату клітин в дуже малих кількостях (10 мкг/л). Для вимірювання повноти видалення ферменту в процесі очищення були розроблені методи тестування з використанням вестерн-блоту для визначення специфічного білка (бенсонази) і кінетичного аналізу ферментативної активності.

Після обробки бенсоназою вірус гепатиту А концентрували на аніонообмінній колонці шляхом завантаження при низькій іонній силі та поетапного елюювання 0,35–0,5 М хлориду натрію у фосфатному буфері. На цьому етапі вірус гепатиту А концентрується у 30 разів, а концентрація тритон знижується до рівня, нижче межі виявлення. Більша частина (більше 90 %) доданої ендонуклеази вимивався з промивними та проточними фракціями на стадії сорбції аніонообмінної хроматографії. Рівень ферменту після хроматографії знижується у продукті більш ніж у 100 разів.

Для подальшого очищення використовували метод осадження ПЕГ та екстракція хлороформом. Вірус гепатиту А після концентрації/діафільтрації та обробки сорбентом або сконцентрований вірус,

елюйований з аніонообмінної, осаджують ПЕГ. За належних умов цей етап є високоселективним, і основний баласт залишається розчинним і видаляється разом із фракцією надосадової рідини. Осад ПЕГ, який містить вірус, ресуспендують і екстрагують сумішшю хлороформ : ізоаміловий спирт у співвідношенні 24:1 для видалення розчинних ліпідів та білків, денатурованих хлороформом, які залишаються на межі розділення між водною та органічною фазами. Для отримання високоочищеного вірусу водний екстракт зі стадії екстракції хлороформом завантажують в аніонообмінну колонку з низьким вмістом солей і елюють градієнтом NaCl до 1,0 М. На заключному етапі ексклюзійної хроматографії одержують високоочищений препарат вірусу.

3. *Інактивація вірусу формальдегідом.* Для інактивації вірусу можливе використання двох методик обробки формаліном:

а) Інактивація вірусу гепатиту А формаліном може проводитися з додаванням формальдегіду 93 мкг/мл (формалін у розведенні 1:4000) при 37 °С при концентраціях антигена, близьких до рівнів дозування. В цих умовах інактивація вірусу відповідає кінетиці розпаду першого порядку з періодом напіврозпаду приблизно 2 год, що відповідає втраті приблизно 3,5 lg TCID₅₀ (50 % інфекційної дози культури тканини) на день. Зниження інфекційності вірусу на 7 lg було досягнуто приблизно за 2 дні, але час інактивації було збільшено до двадцяти днів, щоб забезпечити запас безпечності, при якому вірус повністю інактивований.

б) Ряд експериментів підтвердив, що збільшення концентрації формальдегіду збільшує швидкість інактивації, вимірювану втратою TCID₅₀. Швидкість інактивації змінювалася пропорційно до концентрації формальдегіду, як і очікувалося для кінетики інактивації псевдопершого порядку. Тестування культури тканини на 200 еквівалентах дози підтвердило повну інактивацію при інкубації вірус з 370 мкг/мл формальдегіду (формалін 1:1000) при 37 °С протягом 5 днів. Таким чином, ці модифіковані умови інактивації забезпечували ту ж межу безпеки, що і у варіанті (а). Це було підтверджено авторами на 3-х експериментальних інактиваціях, проведених в ідентичних умовах з подальшою адсорбцією гідроксиду алюмінію для отримання вакцини для клінічних випробувань. Швидкість інактивації приблизно в чотири рази перевищувала швидкість, що спостерігалася раніше за нижчих концентрацій формальдегіду. Зразки цих двох вакцин, адсорбованих на гідроксиді алюмінію, тестували на імуногенність на

мишах, при цьому ED₅₀ для кожної з них була така сама, як у попередніх вакцин (менше 2 нг).

4. *Очищення продукту від формаліну* діафільтрацією через мембрани з порогом відсікання 30 кДа. Протягом 48 годин після закінчення інактивації продукт діафільтрують та концентрують для зниження вмісту формальдегіду та попередньої адсорбції на солях алюмінію (переважно гідроксиді алюмінію або фосфаті алюмінію). Перед використанням система ультрафільтрації дезінфікують 0,1 Н розчином NaOH протягом щонайменше 30 хв. Потім установку ретельно промивають буфером для діафільтрації, а мембрани обробляють буфером, що містить амінокислоти і протигрибковий засіб. На кінцевій стадії систему ретельно промивають буфером для діафільтрації.

5. *Стерилізуюча фільтрація вірусу* через мембрани з розміром пор 0,22 мкм.

6. *Адсорбція вірусу гепатиту А на гідроксиді алюмінію* проводиться шляхом осадження інактивованого формаліном вірусу гідроксидом алюмінію. Формальдегід та залишкові солі видаляли із супернатантом із суспензії та заміною його фізіологічним розчином.

На рис. 5.24 наведено основні стадії одержання вакцини для профілактики гепатиту А, інактивованої формальдегідом.

Підсумовуючи, необхідно відзначити, що розвиток імунобіотехнології дозволив створити велику кількість вакцин для профілактики гепатиту А і гепатиту В зі створенням комбінованих вакцин, в яких одночасно присутній рекомбінантний антиген гепатиту В (HBs-Ag) та інактивовані антигени вірусу гепатиту А. Особливий інтерес представляє вакцина проти гепатиту А на основі віросом (ліпосом). При виробництві вакцин проти гепатиту А, використовуються найсучасніші технології в галузі клітинних культур та біотехнології, які зробили можливим рутинне виробництво цих вакцин в промислових масштабах. Розробка та масштабування процесу привели до створення добре охарактеризованого процесу виробництва вакцин з відповідними внутрішньовиробничими засобами контролю для забезпечення стабільності та відтворюваності, чітко визначеного продукту.



Рисунок 5.24 – Схема отримання інактивованої вакцини проти гепатиту А

Використання вакцин проти гепатиту, а також покращення санітарно-гігієнічних умов приводить до того, що захворюваність на гепатит А знижується, а середній вік інфікування в усьому світі збільшується. Найпомітніше зниження було виявлено в деяких країнах із середнім рівнем доходу, де було введено вакцинацію проти гепатиту А. Вакцинацію проти гепатиту А визнано ефективною у боротьбі зі спалахами цього захворювання в ряді країн.

Запитання для самоконтролю

1. Які види вакцин проти вірусу сказу Вам відомі? Які штами вірусу сказу та культури клітин використовують для виробництва вакцин?
2. Назвіть основні етапи технології одержання інактивованої вакцини проти сказу.
3. Які види вакцин проти вірусу SARS-CoV-2 Вам відомі?
4. Який принцип роботи вакцини на основі мРНК? Які ліпідні компоненти входять до складу ліпідних наночастинок для створення мРНК вакцин? У чому полягає функція кожного з них?
5. Назвіть основні етапи технології одержання інактивованої вакцини проти SARS-CoV-2.
6. Які вимоги висуваються до ад'ювантів вакцин?
7. Яку роль відіграють ад'юванти у формуванні імунної відповіді?
8. Які рекомбінантні продукти використовують у складі ліпосомальних вакцин? Які переваги ліпосомальних рекомбінантних вакцин?
9. Що спільного між вірусною частинкою та ліпосомою?
10. Які переваги мають ліпосомальні вакцини у порівнянні з вакцинами класичного складу?
11. Назвіть основні етапи технології одержання інактивованої вакцини проти гепатиту А.

Список джерел інформації до розділу 5

1. Волянський А. Ю Особливості SARS-COV-2 інфекції та напрями створення терапевтичних та вакцинних препаратів / А. Ю. Волянський, Т. В. Давидова, М. В. Кучма та ін. // Аналі Мечниковського Інституту. – 2020. – Т. 4. – С. 7–20.
2. Дзюблик І. В. Нові коронавіруси людини та захворювання органів дихання / І. В. Дзюблик, О. В. Кукало // Український пульмонологічний журнал. – 2015. – № 4. – С. 53–59.

3. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1-3.
4. Краснопольский Ю. М. Биотехнология иммунобиологических препаратов: монография / Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская. – Харьков : Фармитек, 2008. – 312 с.
5. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов : учеб. пособ. / Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2009. – 351 с.
6. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ. Часть I : учеб. пособ. / Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2012. – 303 с.
7. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ. Часть II : учеб. пособ. / Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2013. – 192 с.
8. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: аспекты фармацевтической химии : учеб. пособ. / Ю. М. Краснопольский, О. В. Звягинцева. – Харьков : НТУ "ХПИ", 2018. – 247 с.
9. Краснопольський Ю. М. Фармацевтична біотехнологія: Біотехнології виробництва готових лікарських форм : навч. посіб. / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : ТОВ «ДРУКАРНЯ МАДРИД», 2020. – 279 с.
10. Краснопольський Ю. М. Фармацевтична біотехнологія: сьогодення та майбутнє : навч. посіб. / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : ТОВ «Друкарня Мадрид», 2022. – 151 с.
11. Краснопольський Ю. М. Створення систем доставки антигенів та ліків на основі штучних і природних ліпідних наночастинок: ліпосоми та екзосоми : монографія / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : Друкарня Мадрид, 2023. – 179 с.
12. Чернишева Л. І. Імунопрофілактика інфекційних хвороб: навч.-метод. посіб. / Л. І. Чернишева, Ф. І. Лаптії, А. Н. Волока та ін. – Київ : «Медицина», 2022. – 336 с.
13. Abdoli A. Human Papillomavirus Type16- L1 VLP Production in Insect Cells / A. Abdoli, H. Soleimanjahi, F. Fotouhi et al. // Iranian journal of basic medical sciences. – 2013. – V. 16(8). – P. 891–895.
14. Alving C. R. Army liposome formulation (ALF) family of vaccine adjuvants / C. R. Alving, K. K. Peachmen, G. Matyas et al. // Expert Review of Vaccines.

- 2020. – Vol. 19, No. 3. – P. 279–292. – <https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1745636>
15. Ambrosch F. Immunogenicity and protectivity of a new liposomal hepatitis A vaccine / F. Ambrosch, G. Wiedermann, S. Jonas et al. // *Vaccine*. – 1997. – V. 15(11). – P. 1209–1213. – [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(97\)00015-7](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(97)00015-7)
 16. Armstrong M. E. Development of the formalin-inactivated hepatitis A vaccine, VAQTA from the live attenuated virus strain CR326F / M. E. Armstrong, P. A. Giesa, J. P. Davide et al. // *Journal of hepatology*. – 1993. – V. 18(2). – P. S20–S26. – [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(05\)80373-3](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(05)80373-3)
 17. Bakker M. Immunogenicity, effectiveness and safety Ashzef S. High level expression of surface glucoprotein of rabies virus tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice / S. Ashzef, P. K. Singh, D. K. Yadav // *Journal of Biotechnology*. – 2005. – Vol. 119. – P. 1–14. – <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.06.009>
 18. Avila-Perez G. Reverse Genetic Approaches for the Generation of Recombinant Zika Virus / G. Avila-Perez, A. Nogales, V. Martin et al. // *Viruses*. – 2018. – Vol. 10, No. 11. – ID 597. – <https://doi.org/10.3390/v10110597>
 19. of combined hepatitis A and B vaccine: a systematic literature review / M. Bakker, E. M. Bunge, C. Marano et al. // *Expert review of vaccines*. – 2016. – V. 15(7). – P. 829–851. <https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1150182>
 20. Barra F. New prophylactics human papilloma virus (HPV) vaccines against cervical cancer / F. Barra, U. Leone Roberti Maggiore, G. Bogani et al. // *Journal of obstetrics and gynaecology*. – 2019. – V. 39(1). – P. 1–10. <https://doi.org/10.1080/01443615.2018.1493441>
 21. Buschmann M. D. Nanomaterial delivery systems for mRNA vaccines / M. D. Buschmann, M. J. Carrasco, S. Alishetty et al. // *Vaccines*. – 2021. – Vol. 9, No. 65. – P. 2–18. – <https://doi.org/10.3390/vaccines9010065>
 22. Chavarria-Miró G. Advances for the Hepatitis A Virus Antigen Production Using a Virus Strain With Codon Frequency Optimization Adjustments in Specific Locations / G. Chavarria-Miró, de, M. Castellarnau, C. Fuentes et al. // *Frontiers in microbiology*. – 2021. – V. 12. – ID 642267. – <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.642267>
 23. Chen Y.-C. Nanotechnologies Applied in Biomedical Vaccines / Y.-C. Chen, H.-F. Cheng, Y.-C. Yang, M.-K. Yeh // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2017. – Vol. 5. – P. 57–72. – <https://doi.org/10.17265/2328-2150/2017.02.001>
 24. Cutillo G. Physiology of gangliosides and the role of antiganglioside antibodies in human diseases / G. Cutillo, A. H. Saariaho, S. Meri // *Cellular & molecular immunology*. – 2020. – Vol. 17, No.4. – P. 313–322. – <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0388-9>

25. Dadar M. Advances in Designing and Developing Vaccines, Drugs and Therapeutic Approaches to Counter Human Papilloma Virus / M. Dadar, S. Chakraborty, K. Dhama et al. // *Frontiers in immunology*. – 2018. – V, 9. – ID 2478. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02478>
26. D'Hondt E. Hepatitis A vaccine / E. D'Hondt; SmithKline Beecham Biologicals S.A. – Patent US 6991929 B1. – 2006.
27. Dietzschold B. Induction of protective immunity against rabies by immunization with a rabies virus ribonucleoprotein / B. Dietzschold, H. H. Wang, C. E. Rupprecht et al. // *PNAS*. – 1987. – V. 84, No. 24. – P. 9165–9169. – <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9165>
28. Dusny C. The MOX promoter in *Hansenula polymorpha* is ultrasensitive to glucose-mediated carbon catabolite repression / C. Dusny, A. Schmid // *FEMS yeast research*. – 2016. – V. 16(6). – ID fow067. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow067>
29. Ebola Zaire Vaccine (rVSVΔG-ZEBOV-GP, live). EMA assessment report. – European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2019. – 117 p.
30. Fooks A. R. Rabies / Fooks A.R., Cliquet F., Finke S. et al. // *Nature Reviews Disease Primers*. – 2017. – Vol. 3. – ID 17091. – <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.91>
31. Ganguly N. Role of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence / N. Ganguly, I. Siddiqui, P. Sharma // *Tuberculosis*. – 2008. – Vol. 88, No. 6. – P. 510–517. – <https://doi.org/10.1016/j.tube.2008.05.002>
32. Giesen V. 30 years of rabies vaccination with Rabipur: a summary of clinical data and global experience / V. Giesen, D. Gniel, C. Malerczyk // *Expert Review of Vaccines*. – 2015. – Vol. 14, No. 3. – P. 351–367. – <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.1011134>
33. Global health sector strategy on viral hepatitis 2016–2021. – Geneva: World Health Organization, 2016. – 56 p.
34. Grabovska J. Liposomal nanovaccine containing α -galactosylceramide and ganglioside GM3 stimulates robust CD8 + T cell responses via CD169 + macrophages and cDC1 / J. Grabovska, D. A. Stolk, H. J. Twihaar et al. // *Vaccines*. – 2021. – Vol. 9, No. 1. – ID 56. – <https://doi.org/10.3390/vaccines9010056>
35. Gregoriadis G. Liposomes and mRNA: Two technologies together create a COVID-19 vaccine / G. Gregoriadis // *Medicine in drug Discovery*. – 2021. – Vol. 12. – ID 100104. – <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2021.100104>
36. Hassert K. J. Optimization of lipid nanoparticles for intramuscular administration of mRNA vaccines / K. J. Hassert, K. E. Benenato, E. Jacquinet // *Molecu-*

- lar Therapy Nucleic Acids. – 2019. – V. 15. – P. 1–11. – <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.01.013>
37. Herzog C. Eleven years of Inflexal V-a virosomal adjuvanted influenza vaccine / C. Herzog, K. Hartmann, V. Künzi et al. // Vaccine. – 2009. – Vo. 27, No. 33. – P. 4381–4387. – <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.05.029>
 38. Hong H. C. An mRNA vaccine against SARS-CoV-2: Liophilized, liposome based vaccine candidate EG-Covid induced high levels of virus neutralizing antibodies : preprint / H. C. Hong, K. S. Kim, S. A. Park et al. – bioRxiv, 2021. – URL: <https://doi.org/10.1101/2021.03.22.436375>
 39. Huang Y. Structural and functional properties Cov-2 spike protein: potencial antiviral drug development for Covid-19 / Y. Huang, C. Yang, F. Xu et al. // Acta Pharmacologica Sinica. – 2020. – Vol. 41, No. 7. – P. 1141–1149. – <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
 40. Jackson L.A. An mRNA Vaccine against SARS-COV-2 – preliminary report / L. A. Jackson, E. J. Anderson, N. G. Rouphael et al. // The new England Journal of Medicine. – 2020. – Vol. 383. – P. 1920–1931. – <https://doi.org/10.1056/nejmoa2022483>
 41. Jiménez-Hernández S. Y. Biological, morphological, and molecular characterization of the baculovirus PlxyMNPV_LBIV-11, and its virulence towards *Plutella xylostella*, *Trichoplusia ni*, and *Spodoptera frugiperda* larvae / S. Y. Jiménez-Hernández, J. C. Rangel-Núñez, J. E. Ibarra, M. C. Del Rincón-Castro // Archives of microbiology. – 2022. – V. 204(10). – ID 598. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03222-z>
 42. Kaslow D. C. RTS,S: Toward a first landmark on the Malaria Vaccine Technology Roadmap / D. C. Kaslow, S. Biernaux // Vaccine. – 2015. – Vol. 33, No. 52. – P. 7425–7432. – <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.061>
 43. Kim H.-S. High efficiency method for purifyng human papillavirus like particles / H.-S. Kim. – Patent CA 2880420. Republic of Korea. – 2018.
 44. Kim I. J. Efficacy of an inactivated Zika vaccine against virus infection during pregnancy in mice and marmosets / I. J. Kim, P. A. Lanthier, M. J. Clark et al. // NPJ Vaccines. – 2022. – Vol.7, No.1. – ID 9. – <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00426-0>
 45. Krasnopolsky Yu. M. Biotechnological research in the creation and production of antirabic vaccines / Yu. M. Krasnopolsky, D. M. Pylypenko // Bionecnologia Acta. – 2021. – Vol. 14, No. 4. – P. 28–37. – <https://doi.org/10.15407.biotech14.04.028>
 46. Miao L. Enhanced immune response to rabies viruses by the use of a liposome adjuvantin vaccines / L. Miao, V. Yang, M. Yan et al. // Virus Immunology. – 2017. – Vol. 30, No. 10. – P. 727–733. – <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0093>

47. Norling K. Studying the influence of the physicochemical properties of lipid nanoparticles for mucosal vaccine delivery / K. Norling. – Guthenberg, 2017. – P. 1–64.
48. Ogawa C. Muramyl dipeptide and its derivatives: peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy / C. Ogawa, Y. J. Liu, K. S. Kobayashi // Current bioactive compounds. – 2011. – Vol. 7, No. 3. – P. 180–197. – <https://doi.org/10.2174/157340711796817913>
49. Pardi N. Recent advances in mRNA vaccine technology / N. Pardi, M. J. Hogan, D. Weissman // Current Opinion Immunology. – 2020. – Vol. 65, No. 1. – P. 14–20. – <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.01.008>
50. Peetermans J. Production, quality control and characterization of an inactivated hepatitis A vaccine / J. Peetermans // Vaccine. – 1992. – V. 10(1). – P. S99–S101. – [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(92\)90557-z](https://doi.org/10.1016/0264-410x(92)90557-z)
51. Plotkin S. A. Vaccine production in human diploid cell strains / S. A. Plotkin. American Journal of Epidemiology. – 1971. – Vol. 94, No. 3. – P. 303–306. – <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a121323>
52. Plotkin S. A. Correlates of protection induced by vaccination / S. A. Plotkin // Clinical and vaccine. – 2010. – V. 17(7). – P. 1055–1065. – <https://doi.org/10.1128/CVI.00131-10>
53. Provost P. J. New findings in live, attenuated hepatitis A vaccine development / P. J. Provost, R. P. Bishop, R. J. Gerety et al. // Journal of medical virology. – 1986. – V. 20(2). – P. 165–175. – <https://doi.org/10.1002/jmv.1890200208>
54. Requirements for Hepatitis A Vaccines (inactivated) // WHO Technical Report Series. – 1995. – No. 858. – P. 36–60.
55. Santos I. A. Antivirals Against Coronaviruses: Candidate Drugs for SARS-CoV-2 Treatment? / I. A. Santos, V. R. Grosche, F. Bergamin et al. // Frontiers in microbiology. – 2020. – Vol. 11. – ID 1818. – <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01818>
56. Schiller J. T. Next generation prophylactic human papillomavirus vaccines / J. T. Schiller, M. Müller // The Lancet. Oncology. – 2015. – V. 16(5). – P. e217–e225. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71179-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71179-9)
57. Schnell M. J. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain / M. J. Schnell, J. P. McGettigan, C. Wirblich, A. Papaneri // Nature Reviews Microbiology. – 2010. – Vol. 8, No. 1. – P. 51–61. – <https://doi.org/10.1038/nrmicro2260>
58. Serrano L. O. Liposome vaccine formulations as prophylactic agents: design considerations for modern vaccine / L. O. Serrano, D. J. Bukhart // Journal of Nanobiotechnology. – 2017. – Vol. 15. – ID 83. – <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0319-9>

59. Shao S. Method for enhancing immunogenicity epitope peptide of HPV antigen, virus like particle, and method preparing HPV vaccine / S. Shao, S. Li, R. Jang et al. – Patent US 20170166612 A1. – 2018.
60. Sitrin R. D. Hepatitis A virus vaccine / B. Junker, J. A. Lewis, C. N. Oliver et al; MERCK & CO. INC. – Patent EP 0583142 A2. – 1994.
61. Sun M. B. A novel process for production of hepatitis A virus in Vero cells grown on microcarriers in bioreactor / M. B. Sun, Y. J. Jiang, W. D. Li et al. // World journal of gastroenterology. – 2004. – V. 10(17). – P. 2571–2573. – <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i17.2571>
62. Tebas P. Safety and Immunogenicity of an Anti-Zika Virus DNA Vaccine / Tebas P., Roberts C.C., Muthumani K. et al. // The New England journal of medicine. – 2021. – Vol.385, No.12. – ID e35. – <https://doi.org/10.1056/nejmoa1708120>
63. Twihaar M. N. Optimization of a GM3-containing liposomal vaccine that delivers antigen to CD169+ splenic macrophages / M. N. Twihaar, C. Colomol, J. Grabovska et al. // Journal of Immunotherapy Cancer. – 2020. – Vol. 8, No. 3. – ID A506. – <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121138>
64. Vafaei R. Comparison of mucin-1 in human breast cancer and canine mammary gland tumor: a review study / R. Vafaei, M. Samadi, A. Hosseinzadeh et al. // Cancer cell international. – 2022. – Vol. 22, No. 14. – <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02398-6>
65. Van Hoecke C. Concomitant vaccination against hepatitis A and typhoid fever / Van C. Hoecke, E. Lebacq, J. Beran et al. // Journal of travel medicine. – 1998. – V. 5(3). – P. 116–120. – <https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.1998.tb00483.x>
66. Wang N. Liposomes used as a vaccine adjuvant-delivery system: From basics to clinical immunization / N. Wang, M. Chen, T. Wang // Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. – 2019. – Vol. 303. P, 130–150. – <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.04.025>
67. WHO Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs. Technical Report Series. Annex 2 / World Health Organization, 2007. – Vol. 941. – P. 83–132.
68. WHO Expert Consultation on rabies. Technical report series / World Health Organization, 2018. – Vol. 931. – P. 1–88.
69. Wu J. Y. Review of 10 years of marketing experience with Chinese domestic inactivated hepatitis A vaccine Healive® / J. Y. Wu, Y. Liu, J. T. Chen et al. // Human vaccines & immunotherapeutics. – 2012. – V. 8(12). – P. 1836–1844. – <https://doi.org/10.4161/hv.21909>
70. Yamamoto V. COVID-19: review of a 21st century pandemic from etiology to neuropsychiatric implications / V. Yamamoto, J. Bolanos, J. Fiallos, et al. //

- Journal of Alzheimer's Disease. – 2020. – Vol. 77, No. 2. – P. 459–504. – <https://doi.org/10.3233/jad-200831>
71. Yin X. G. Synthesis and evaluation of liposome anti-GM3 cancer vaccine candidates covalently and noncovalently adjuvanted by α -GalCer / X. G. Yin, J. Lu, J. Wang et al. // Journal of Medicinal Chemistry. – 2021. – Vol. 64, No. 4. – P. 1951–1965. – <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01186>
 72. Yousefi Z. An Update on Human Papilloma Virus Vaccines: History, Types, Protection, and Efficacy / Z. Yousefi, H. Aria, F. Ghaedrahmati et al. // Frontiers in immunology. – 2022. – V. 12. – ID 805695. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.805695>
 73. Yuki Y. Oral MucoRice-CTB vaccine is safe and immunogenic in healthy US adults / Y. Yuki, M. Nojima, K. Kashima et al. // Vaccine. – 2022. – V. 40(24). – P. 3372–3379. – <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.04.051>
 74. Zafferani M. Amilorides inhibit SARS-CoV-2 replication in vitro by targeting RNA structures : preprint // M. Zafferani, C. Haddad, L. Luo et al. – bioRxiv, 2020. – URL: <https://doi.org/10.1101/2020.12.05.409821>
 75. Zhang L. Hepatitis A vaccination / L. Zhang // Human vaccines & immunotherapeutics. – 2020. – V. 16(7). – P. 1565–1573. – <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1769389>
 76. Zhang Y. N. A novel rabies vaccine based in infectious propagating particles derived from hybrid VEEV- Rabies replicon / Y. N. Zhang, C. Chen, C. L. Deng et al. // EBioMedicine. – 2019. – Vol. 56. – ID 102819. – <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102819>
 77. Zhu S. Rabies control and treatment: from prophylaxis strategies with curative potential / S. Zhu, C. Cuo // Viruses. – 2016. – V.8, No.11. – P. 279–290. – <https://doi.org/10.3390/v8110279>
 78. Zhu S. Reverse genetics of rabies virus. New strategies to attenuate virus virulence for vaccine development / S. Zhu, H. Li, C. Wang // Journal of NeuroVirology. – 2015. – Vol. 21. – P. 335–345. – <https://doi.org/10.1007/s13365-015-0350-2>

Навчальне видання

КРАСНОПОЛЬСЬКИЙ Юрій Михайлович, доктор фармацевтичних наук, професор,
Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут»
ПИЛИПЕНКО Дар'я Михайлівна, PhD з біотехнологій та біоінженерії,
Державний біотехнологічний університет

ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ ЧАСТИНА I. ВАКЦИНИ

Підручник
для студентів спеціальності
«Біотехнології та біоінженерія»

Відповідальний за випуск проф. *Близнюк О. М.*
Роботу до видання рекомендував проф. *Циганков О. В.*

В авторській редакції

План 2024 р., поз. 156

Підп. до друку 30.01.25. Формат 60×84 1/16. Папір офсетний
Друк цифровий. Гарнітура Times New Roman. Ум. друк. арк. 25,53
Наклад 50 прим. Зам. № 000048. Ціна договірна

Видавничий центр НТУ «ХПІ»

Свідоцтво про державну реєстрацію ДК № 5478 від 21.08.2017 р.
61002, Харків, вул. Кирпичова, 2

Виготовлювач ТОВ «Друкарня Мадрид»
61024, м. Харків, вул. Гуданова, 18.
Тел.: 0800 33 67 62

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи:
Серія ДК, № 4399 від 27.08.2012 р.