

ЛЕКЦИЯ № 8

ОСНОВЫ ИММУНОБИОТЕХНОЛОГИИ

Для студентов, обучающихся по направлению подготовки «Биология» (профиль «Биохимия») при изучении дисциплины «Введение в биотехнологию»

1. Понятие об иммунопрофилактики

2. Классификация и характеристика
вакцин

3. Характеристика основных групп
вакцин

4. Частные технологии вакцин

5. Контроль качества вакцинных
препаратов

1. ПОНЯТИЕ ОБ ИММУНОПРОФИЛАКТИКЕ

ИММУНОПРОФИЛАКТИКА – комплекс противоэпидемических мероприятий, направленный на предупреждение инфекционных болезней, осуществляемый путем иммунизации восприимчивых контингентов населения.

Пастер Л. установил возможность направленного снижения вирулентности (аттенуации) микроорганизмов, при которой утрачивается способность вызывать заболевания, но сохраняется свойство вызывать неспецифическую невосприимчивость к соответствующей инфекционной болезни.

Гамалея Н.Ф. сформулировал одно из важнейших направлений прикладной иммунологии – создание и применение химических вакцин (микробных антигенов, полностью освобожденных от балластных веществ).

Согласно современной классификации к иммунобиологическим препаратам относятся:

- ✓ Препараты из живых и убитых микроорганизмов, а также микробных продуктов, используемых для профилактики или лечения заболеваний (вакцины, анатоксины, фаги, пробиотики, эубиотики).
- ✓ Иммуноглобулины, иммунные сыворотки или моноклональные антитела.
- ✓ Иммуномодуляторы для иммунокоррекции, лечения и профилактики иммунодефицитов разной этиологии (интерлейкины, интерфероны, гормоны тимуса, миелопептиды, фактор некроза опухолей, ростовые факторы, мурамилпептид, левамизол, циклоспорин, синтетические вещества супрессивного или иммуностимулирующего действия, адьюванты, антиметаболиты, гормоны).
- ✓ Диагностические препараты для выявления антител и антигенов, постановки кожных проб при аллергиях и иммунопатологических состояниях, определения сенсibilизированных иммунокомпетентных клеток, факторов неспецифической резистентности организма (комплемента, интерферон, лизоцим), индикации и идентификации микроорганизмов в объектах внешней среды, в санитарии и промышленной микробиологии.

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИННЫМ ПРЕПАРАТАМ

- ✓ высокая иммуногенность;
- ✓ ареактогенность;
- ✓ безвредность;
- ✓ минимальное сенсibiliзирующее действие.

Назначение профилактических и лечебных иммунобиологических препаратов с учетом их патогенетического действия состоит в:

- ✓ активации деятельности иммунной системы;
- ✓ подавлении (супрессии) иммунных процессов;
- ✓ нормализации работы отдельных звеньев иммунной системы.

Вакцинация способствует формированию у реципиента иммунитета к патогенным микроорганизмам и, тем самым, защищает его от инфекции. В ответ на пероральное или парентеральное введение вакцины в организме хозяина вырабатываются антитела к патогенному микроорганизму, которые при последующей инфекции приводят к его инаktivации, блокируют пролиферацию и позволяют развиваться заболеванию.

Различают **однократную** (корь, паротит, туберкулез) и **многократную** (полиомиелит, АКДС) **вакцинацию**. Кратность вакцинации свидетельствует о том, сколько раз необходимо ввести вакцину для формирования иммунитета.

ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРОИЗВОДСТВЕ ВАКЦИН

- ✓ Для получения вирусов животных и человека необходимы дорогостоящие культуры животных клеток.
- ✓ Титр вирусов животных и человека в культуре и скорость их размножения часто бывают очень низкими, что удорожает производство вакцин.
- ✓ Необходимо строго соблюдать меры безопасности, чтобы не допустить инфицирования персонала.
- ✓ При нарушении технологического процесса в некоторые партии вакцин могут попасть живые или недостаточно ослабленные вирулентные микроорганизмы, что может привести к неумышленному распространению инфекции.
- ✓ Атенуированные вакцины могут ревертировать к исходному штамму, поэтому необходимо постоянно контролировать их вирулентность.
- ✓ Некоторые заболевания нельзя предупредить с помощью традиционных вакцин.
- ✓ Большинство современных вакцин имеют ограниченный срок годности и сохраняют активность только при пониженной температуре, что затрудняет их использование в развивающихся странах.

ПРЕИМУЩЕСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ ВАКЦИН

- ✓ Патогенный микроорганизм модифицируют, делетируя гены, ответственные за вирулентность. При этом способность вызывать иммунный ответ сохраняется. Такой штамм можно использовать в качестве живой вакцины, т.к. выращивание в чистой культуре исключает возможность спонтанного восстановления гена.
- ✓ Создают живые патогенные системы переноса отдельных антигенных детерминант неродственного патогенного организма, способствующие развитию выраженного иммунного ответа на патогенный микроорганизм.
- ✓ В том случае, если патогенные микроорганизмы не растут в культуре, их можно изолировать, клонировать и экспрессировать в альтернативном хозяине (в кишечной палочке или линии клеток млекопитающих) гены тех белков, которые содержат основные антигенные детерминанты, и использовать их в качестве «субъединичных» вакцин.
- ✓ Некоторые патогенные микроорганизмы действуют опосредованно, вызывая развитие антииммунной реакции на инфицированные клетки организма-хозяина. Для таких заболеваний можно создать систему специфического уничтожения клеток-мишеней, сконструировав ген, кодирующий химерный белок, одна часть которого будет связываться с инфицированной клеткой, а другая – ее уничтожать. Данная система не является истинной вакциной, хотя она и действует только на инфицированные клетки, устраняя саму причину аутоиммунной реакции.

Поствакцинационный иммунитет – иммунитет, развивающийся после введения вакцины.

Факторы, влияющие на развитие иммунитета:

1. Зависящие от самой вакцины:

- а) чистота лекарственного препарата;
- б) время жизни антигена;
- в) доза;
- г) наличие протективных антигенов;
- д) кратность введения.

2. Зависящие от организма:

- а) состояние индивидуальной иммунной реактивности;
- б) возраст;
- в) наличие иммунодефицита;
- г) состояние организма в целом;
- д) генетическая предрасположенность.

3. Зависящие от внешней среды:

- а) питание;
- б) условия труда и быта;
- в) климат;
- г) физико-химические факторы среды.

2. КЛАССИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ВАКЦИН

ВАКЦИНЫ – это обширный класс препаратов, несущих антигенные признаки одного или нескольких возбудителей инфекционных заболеваний, предназначенных для создания активного искусственного иммунитета с целью профилактики и лечения соответствующего инфекционного заболевания человека или животного.

Действующим началом вакцины является **иммуноген**, т.е. корпускулярная или растворенная субстанция, несущая на себе химические структуры, аналогичные компонентам возбудителя заболевания, ответственным за выработку иммунитета.

КЛАССИФИКАЦИЯ ВАКЦИН

ВАКЦИНЫ			
КЛАССИЧЕСКИЕ			СОВРЕМЕННЫЕ
ЖИВЫЕ ВАКЦИНЫ	УБИТЫЕ (КОРПУСКУЛЯРНЫЕ) ВАКЦИНЫ	ХИМИЧЕСКИЕ ВАКЦИНЫ ✓ химически извлеченные молекулярные антигены микроорганизма; ✓ анатоксины	ИСКУССТВЕННЫЕ АНТИГЕНЫ ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫЕ ВАКЦИНЫ КОМПОНЕНТНЫЕ ВАКЦИНЫ РИБОСОМАЛЬНЫЕ ВАКЦИНЫ ДНК-ВАКЦИНЫ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИЕ ВАКЦИНЫ

2. КЛАССИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ВАКЦИН

КЛАССИФИКАЦИЯ ВАКЦИН ПО ПРИРОДЕ И ПРИНЦИПАМ ИЗГОТОВЛЕНИЯ

Живые	Неживые (убитые, инактивированные)	
	Корпускулярные	Молекулярные
Аттенуированные Дивергентные Генно-инженерные (векторные)	Цельноклеточные Цельновирионные Субклеточные Субвирионные	Биосинтетические Химически синтезированные Генно-инженерные

КОМПОНЕНТЫ ВАКЦИН

Основу вакцины составляют **протективные антигены**, представляющие собой лишь небольшую часть бактериальной клетки или вируса, обеспечивающие развитие специфического иммунного ответа.

Протективные антигены могут являться белками, гликопротеидами, липополисахаридами-белковыми комплексами, могут быть связаны с микробными клетками (коклюшная палочка, стрептококки и др.), секретироваться ими (бактериальные токсины), а у вирусов располагаются преимущественно в поверхностных слоях суперкапсида вириона.

В состав вакцины, кроме основного действующего начала, могут входить и другие компоненты – **сорбент, консервант, наполнитель, стабилизатор** и **неспецифические примеси** (белки субстрата культивирования вирусных вакцин, следовое количество антибиотика и белка сыворотки животных, используемые при культивировании клеточных культур). В производстве вакцин используются только стабилизаторы и наполнители, допущенные для введения в организм человека.

ЖИВЫЕ ВАКЦИНЫ

ЖИВЫЕ ВАКЦИНЫ – иммунопрофилактические препараты, состоящие из наследственно измененных форм возбудителей инфекционных болезней (бактерий, риккетсий и вирусов). Штаммы, используемые в таких вакцинах с ослабленной вирулентностью, называют **аттенуированными**.

Живые вакцины являются корпускулярными.

Реакцию организма на введение живой вакцины следует оценивать не как болезнь, а как вакцинальный процесс.

Живые вакцины получают путем искусственного аттенуирования, отбирая естественные авирулентные штаммы или с помощью генетической инженерии на уровне хромосом.

Методы получения аттенуированных штаммов:

1. Использование селекции спонтанно возникших мутантов (дивергентных линий) с ослабленной вирулентностью (чумная, полиомиелитная и др.).

2. Воздействие на геном возбудителя разными методами:

✓ длительное культивирование в неблагоприятных условиях (вакцины БЦЖ, против сибирской язвы и др.);

✓ пассирование возбудителя на невосприимчивых животных, т.е. адаптация к новому хозяину (антирабическая вакцина);

✓ воздействие мутагеном.

3. Искусственное получение генетических рекомбинантов, обладающих сниженной вирулентностью, но сохранивших иммуногенность.

Основное требование к живым вакцинам, – отсутствие в инокуляционном материале вирулентных микроорганизмов.

ПРЕИМУЩЕСТВА ЖИВЫХ ВАКЦИН

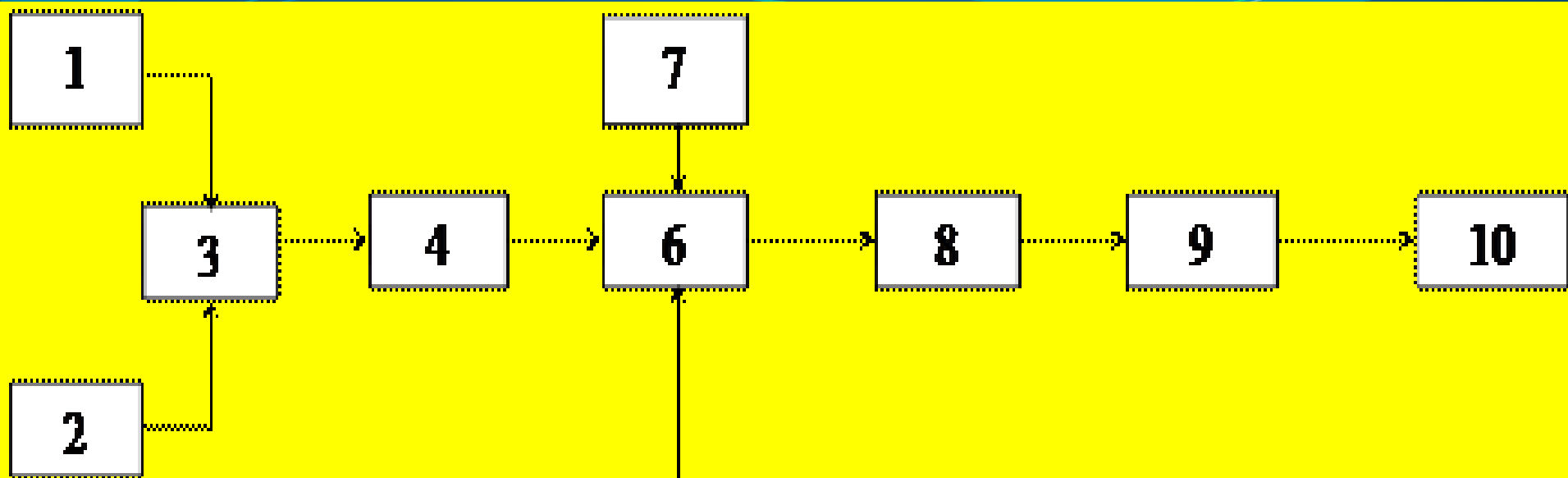
- ✓ по механизму действия на организм они напоминают «дикий» штамм;
- ✓ они могут приживаться в организме и длительно сохранять иммунитет (для коревой вакцины вакцинация в 12 мес. и ревакцинация в 6 лет), вытесняя «дикий» штамм;
- ✓ для вакцинации они используются небольших дозах, поэтому вакцинацию легко проводить организационно.

НЕДОСТАТКИ ЖИВЫХ ВАКЦИН

- ✓ живая вакцина корпускулярная, т.е. содержит 99 % балласта, поэтому обычно достаточно реактогенная;
- ✓ Живая вакцина способна вызывать мутации (хромосомные aberrации) клеток организма, что особенно опасно в отношении половых клеток;
- ✓ живые вакцины содержат вирусы-загрязнители (контаминанты), что особенно опасно в отношении обезьяньего СПИДа и онковирусов;
- ✓ живые вакцины трудно дозируются и поддаются биоконтролю;
- ✓ живые вакцины чувствительны к действию высоких температур и требуют неукоснительного соблюдения холодовой цепи;
- ✓ возможность реверсии вирулентных форм, что может стать причиной заболевания вакцинируемого.

3. ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ГРУПП ВАКЦИН

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЖИВОЙ СУХОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РОЖИ СВИНЕЙ



1 – вакцинный штамм ВР-2

2 – культивирование матровой расплодки на мясо-пептонном бульоне во флаконах

3 – пересев во флаконы с полужидким мясопептонным бульоном

4 – посевная культура

5 – патронный микрофильтр типа КФО-1 («Карлсон Форд», Англия) с фильтрующим материалом, состоящим из композита целлюлозы с минеральными волокнами

6 – биореактор

7 – смешивание культуральной жидкости со средой высушивания на основе фосфатно-буферного раствора (из расчета 1:4)

8 – бактериальную суспензию передают в емкость для расфасовки, выдерживают при температуре $(6\pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 1–3 сут. до получения результатов контроля чистоты культуры

9 – бактериальную суспензию передают на фасовку во флаконы, **10** – лиофилизация бактериальной суспензии

3. ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ГРУПП ВАКЦИН

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЖИВОЙ СУХОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РОЖИ СВИНЕЙ

Продуцент. Эталонный сухой стандартный заражающий штамм *Erysipelothrix rhusiopathiae* ВР-2 при производстве вакцины против рожи свиней выращивают на среде на основе перевара Хоттингера и печеночного экстракта, содержащей следующие компоненты: пептон, сухой дрожжевой экстракт, NaCl, KH_2PO_4 , твин-80, глюкозу, нормальную сыворотку крупного рогатого скота, L-аргинин.

Посевной материал. Для промышленного культивирования используют вакцинный штамм ВР-2, культивирование которого осуществляется на мясо-пептонном бульоне (МПБ) во флаконах, после пересевают во флаконы с полужидким МПБ, затем культуру пересевают в бутылки (3 л). Посевную культуру засевают в простерилизованный биореактор, в который предварительно подают среду на основе перевара Хоттингера.

Ферментация. Глубинное культивирование проводят при температуре $36 \pm 0,5$ °С в течение 20–22 ч при постоянном перемешивании.

Постферментационная стадия. Среду высушивания перемешивают с культуральной жидкостью в соотношении 1:4 при 200–300 об/мин в течение 15 мин. Затем бактериальную суспензию перекачивают в емкость для расфасовки, выдерживают при температуре 6 ± 2 °С в течение 1–3 сут. После ее передают на фасовку во флаконы вместимостью 20 мл, и – на лиофилизацию.

Упаковка и маркировка. Бактериальную культуру вакцинного штамма ВР-2, соединенную в отношении 1:1 – 1:4 со средой высушивания, расфасовывают в стерильные флаконы вместимостью 20 мл, установленные в кассеты, укупоривают пробками, подвергают лиофилизации. Окончательное укупоривание флаконов осуществляется в атмосфере азота. После этого флаконы с вакциной закатывают колпачками. На флаконы с вакциной должны быть наклеены этикетки с указанием наименования предприятия-изготовителя, наименования препарата, № серии и контроля, дозы препарата, даты изготовления, срока годности.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЖИВОЙ СУХОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РОЖИ СВИНЕЙ

Наименование показателя	Характеристика и норма
Внешний вид	Сухая мелкопористая масса
Цвет	Беловато-желтый
Наличие посторонних примесей, плесени, следов оттаивания, трещин флаконов	Не допускается
Растворимость	Вакцина должна полностью растворяться в физиологическом растворе в течение 1–3 мин.
Массовая доля влаги, %	1,6–4,0
Контаминация посторонней микрофлорой и типичность роста	Вакцина не должна быть контаминирована посторонней микрофлорой. При посевах на мясо-пептонном агаре через 24–48 ч вакцинный штамм должен расти с образованием бесцветных, гладких, прозрачных колоний на мясо-пептонном бульоне через 24 ч – равномерное помутнение.
Количество доз во флаконах	25, 50, 100, 150 и 200 доз в одном флаконе из расчета 200 млн. в 1 мл микробных клеток в одной иммунизирующей дозе
Безвредность	Вакцина должна быть безвредной
Иммуногенная активность	Вакцина должна быть иммуногенной

ИНАКТИВИРОВАННЫЕ (УБИТЫЕ) ВАКЦИНЫ

ИНАКТИВИРОВАННЫЕ (УБИТЫЕ) ВАКЦИНЫ получают путем химического или физического воздействия на микроорганизмы с сохранением их физической структуры. Данные вакцины являются стабильными и безопасными, т.к. не могут вызвать реверсию вирулентности. Чаще всего они не требуют хранения на холоде, что обуславливает удобство их применения. Кроме того, к преимуществам этих вакцин относят: легкость дозирования, высокую степень очистки, возможность длительного хранения и низкую чувствительность к температурным колебаниям.

У этих вакцин имеются и недостатки: они стимулируют более слабый иммунный ответ в сравнении с живыми вакцинами, требуют применения нескольких доз. К их недостаткам также относятся: большое содержание балластных веществ (до 99 %), обуславливающих их реактогенность, поэтому их редко применяют. Кроме того, они могут содержать агент, используемый для умерщвления микробных клеток (фенол).

Инаktivирование клеток микроорганизмов при получении вакцин осуществляют преимущественно нагреванием при температуре 56 °С в течение 2 ч.

Процесс изготовления сухих корпускулярных вакцин состоит из стадий:

- ✓ Выбор штамма с полноценными свойствами и получение маточной культуры
- ✓ Выращивание биомассы
- ✓ Инаktivация микробной взвеси
- ✓ Стандартизация
- ✓ Лиофилизация

ХИМИЧЕСКИЕ (СУБЪЕДИНИЧНЫЕ) ВАКЦИНЫ

ХИМИЧЕСКИЕ (СУБЪЕДИНИЧНЫЕ) ВАКЦИНЫ создают из антигенных компонентов, извлеченных из микробной клетки. К ним относятся и вакцины, полученные из растворимых дериватов микробной клетки (токсинов).

Для создания этих вакцин необходимо знать не только локализацию и иммуногенные свойства антигенных детерминант вирусных белков, но и их первичную структуру.

Получение химических вакцин с помощью генно-инженерной технологии состоит из следующих этапов:

- ✓ синтез генов комплементарных ДНК и РНК вирусов, кодирующих выработку протективных антигенов;
- ✓ вычленение гена рестриктазами и эндонуклеазами;
- ✓ химико-ферментативный синтез искусственного гена, кодирующего протективный антиген или ряд протективных антигенных детерминант;
- ✓ встройка гена в экспрессирующий про- и эукариотический вектор (плазмиды, фаги);
- ✓ трансформация клеток-реципиентов и отбор клонов, продуцирующих протективный антиген, испытание рекомбинантных вирусов в качестве вакцины;
- ✓ культивирование клеток, продуцирующих протективные антигены, и конструирование вакцины.

Химические вакцины обладают следующими **преимуществами**: отсутствует опасность реверсии, они менее реактогенны, более стандартны, менее опасны побочным действием. В отличие от корпускулярных, химические вакцины вызывают защиту против определенных патогенных субстанций возбудителя, не содержат избыточного количества балластных структур. Кроме того, преимуществом этих вакцин является возможность создания на их основе многокомпонентных препаратов против многих инфекционных заболеваний.

По иммуногенности химические вакцины уступают живым и убитым. **Недостаток** этих вакцин заключается в том, что их действие направлено на предотвращение заключительного этапа инфекционного процесса.

К **этапам серийного производства химических вакцин** относятся:

1. Нарботка биомассы клеток возбудителя.
2. Выделение протективного антигена путем дезинтеграции клеток или экстракции с помощью органических растворителей.
3. Очистка антигена.
4. Стерилизация вакцины.
5. Стандартизация и контроль качества вакцины.

АНАТОКСИНЫ

АНАТОКСИНЫ – препараты, полученные из бактериальных экзотоксинов, полностью лишенные токсических свойств под действием физических и химических факторов, но сохраняющие антигенные и иммуногенные свойства.

Начальным этапом получения анатоксинов является подбор наиболее токсигенного штамма, который культивируют на жидкой среде для накопления в ней экзотоксина. После фильтрации клеток проводят обезвреживание токсина, обеспечивая сохранение антигенных детерминант.

Для обезвреживания токсинов применяют следующие методы:

- ✓ Длительное выдерживание (3–5 недель) токсина в 0,3–0,5 % растворе формалина при температуре 39–40 °С (метод Рамона).
- ✓ Использование окислителей (пероксид водорода, тиазиновые и фталеиновые красители) при облучении видимым светом.
- ✓ Обработка протеолитическим ферментами (трипсином, папаином, проназой) при температуре 40–60 °С с последующей гель-фильтрацией на колонках с сефадексом для удаления фермента из препарата.

Полученный анатоксин вводят в организм вместе с адъювантами (гель алюминия гидроксида или алюминия фосфата).

Анатоксины, применяющиеся для вакцинации: дифтерийный анатоксин, адсорбированный; столбнячный анатоксин, адсорбированный; стафилококковый анатоксин адсорбированный; ботулинический анатоксин; анатоксины возбудителей анаэробной инфекции.

АССОЦИИРОВАННЫЕ ВАКЦИНЫ

АССОЦИИРОВАННЫМИ ВАКЦИНАМИ называют вакцины, состоящие из однородных антигенов – только из анатоксинов или только из бактериальных корпускулярных антигенов. Смешанные ассоциированные вакцины включают антигены разной природы.

К данным вакцинам относится **вакцина АКДС** (адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина), содержащая антигены разной природы (инактивированные клетки возбудителя коклюша и два анатоксина – дифтерийный и столбнячный).

Технология вакцины АКДС предусматривает получение каждого из входящих антигенов отдельно: суспензию коклюшных микробов, очищенные и концентрированные дифтерийный и столбнячный анатоксины и гель гидроокиси алюминия. Соединение осуществляется в реакторе с мешалкой после внесения строго определенных количеств каждого компонента.

ВАКЦИНЫ ИЗ ИСКУССТВЕННЫХ АНТИГЕНОВ

При создании вакцин из искусственных антигенов осуществляется синтез аналогов природных антигенных детерминант, ответственных за индукцию активного иммунитета против определенных возбудителей. причем иммунологические свойства искусственных антигенных детерминант определяют два фактора: их расположение на поверхности молекулы и их конформационная структура.

Получение искусственных антигенов включает три стадии: выделения биологически активного антигена, расшифровку его молекулярной структуры и искусственный ресинтез химическим или генно-инженерным путем.

Задача при получении вакцин из искусственных антигенов состоит в том, чтобы выявить антиген, обеспечивающий иммунный ответ и научиться его синтезировать. Искусственные антигены могут быть синтезированы по принципу природных аналогов или получены генно-инженерным путем.

К **преимуществам синтетических антигенов** относят: безопасность, химическую чистоту, возможность синтеза в больших количествах и простоту хранения в сравнении с классическими вакцинами.

Этапы создания искусственных антигенов:

- ✓ Накопление биомассы микроорганизма
- ✓ Выделение высокоочищенного антигена белковой или полисахаридной природы
- ✓ Анализ первичной структуры молекулы антигена
- ✓ Разработка способа искусственного синтеза данной антигенной молекулы или фрагмента, отвечающего за антигенность
- ✓ Создание технологии наработки искусственного антигена

РИБОСОМАЛЬНЫЕ ВАКЦИНЫ

В 70–80-х гг. XX в. началась разработка вакцинных препаратов нового типа – препаратов, состоящих из рибосом соответствующего возбудителя, – **рибосомальных (субклеточных) вакцин**.

Выделенные из клетки рибосомы с матрицей в чистом виде и представляют собой вакцину (ИРС-19, Бронхомунал, Рибомунил).

Преимущества рибосомальных вакцин:

- ✓ бактериальные рибосомы не обладают токсичностью для животных и малоактивны для человека;
- ✓ обладают выраженной иммуногенностью;
- ✓ способны создавать перекрестный иммунитет к разным серотипам и серогруппам в пределах вида.

Вопрос о механизме действия рибосомальных вакцин остается не до конца выясненным. Одним из возможных объяснений является представление о действии комплекса РНК – антиген. В этом случае, иммунологическая специфичность определяется антигеном, а РНК оказывает воздействие на кооперацию клеток в иммунном ответе.

Этапы получения рибосомальных вакцин:

- ✓ Накопление биомассы микроорганизмов
- ✓ Разрушение бактериальных клеток
- ✓ Выделение рибосом путем ультрацентрифугирования
- ✓ Проверка иммунологической активности

ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫЕ ВАКЦИНЫ

ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫЕ ВАКЦИНЫ – препараты, полученные с помощью рекомбинантных микроорганизмов.

Стадии конструирования генно-инженерных вакцин:

- ✓ Выделение или получение гена, кодирующего протективный антиген
- ✓ Внесение гена в экспрессирующий вектор (плазмида, фаг)
- ✓ Введение вектора в перmissive клетку
- ✓ Клонирование вектора и отбор клонов, продуцирующих протективный антиген
- ✓ Испытание иммуногенной активности антигена
- ✓ Культивирование клеток, выделение протективного антигена
- ✓ Проверка иммуногенной активности

ВЕКТОРНЫЕ ВАКЦИНЫ

Получение вакцины на основе ДНК является одним из новых направлений в теории создания профилактических препаратов. Толчком к развитию этого направления явилось обнаружение у животных способности синтезировать белки вируса после введения им в мышцы плазмид, содержащих участки вирусной ДНК. При этом фрагменты белков вируса, чужеродных для мышей проявляются на внешней стороне клеточных мембран. Эти фрагменты белков распознаются рецепторами Т-лимфоцитов и формируется клон клеток-киллеров, направленных против клеток с белками вируса на клеточной мембране. В результате происходит вакцинация организма от вирусной инфекции. Метод называют **«генной вакцинацией»**. Его преимуществом является возможность вводить внутренний белок вируса, образующего комплекс с его ДНК, который в отличие от белков внешней оболочки вируса не изменяется.

Эти вакцины получают с помощью генной инженерии: ген вирулентного микроорганизма, отвечающий за синтез протективных антигенов, встраивают в геном безвредного микроорганизма, который при культивировании продуцирует и накапливает соответствующий антиген.

Получены положительные результаты применения векторных вакцин, в которых на носитель – живой рекомбинантный вирус осповакцины (вектор) наносятся поверхностные белки двух вирусов – гликопротеин D вируса простого герпеса и гемагглютинин вируса гриппа А. При этом происходит неограниченная репликация вектора и развивается адекватный иммунный ответ против вирусной инфекции обоих типов.

К **преимуществам** этих вакцин относится возможность создания поливалентных вакцинных препаратов на основе объединения участков ДНК разных патогенов «под эгидой» ДНК вируса осповакцины. Кроме того, открывается возможность одномоментной комплексной иммунизации против всех опасных инфекций данной местности.

Для получения этих вакцин ген, кодирующий продукцию иммуногенного протеина микроорганизма, встраивают в бактериальную плазмиду. Кроме данного гена, в нее встраивают генетические элементы, необходимые для его экспрессии в клетках эукариотов, в том числе и человека. Такую плазмиду вводят в культуру бактерий, чтобы получить большое количество копий. Затем плазмидную ДНК выделяют из бактерий и очищают. Очищенная молекула ДНК и служит вакциной.

3. ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ГРУПП ВАКЦИН

Введение ДНК-вакцины обеспечивает синтез чужеродных протеинов клетками вакцинируемого организма, приводящее к выработке иммунитета против соответствующего возбудителя. При этом плазмиды, содержащие соответствующий ген, не встраиваются в ДНК хромосом человека.

ДНК-вакцины можно вводить в солевом растворе парентеральным способом (внутримышечно, внутрикожно). При этом большая часть ДНК поступает в межклеточное пространство и только после этого включается в клетки. Применяют и другой метод введения вакцин с помощью генного пистолета. Для этого ДНК фиксируют на микроскопических золотых гранулах, затем с помощью устройства, приводимого в действие сжатым гелием, гранулы «выстреливают» непосредственно внутрь клеток.

Проведенные исследования подтвердили способность ДНК-вакцин формировать иммунитет в отношении разных возбудителей.

Преимущества векторных вакцин:

- ✓ Способствуют выработке антител к нативной молекуле вирусных протеинов
- ✓ Способствуют выработке цитотоксических Т-лимфоцитов
- ✓ Могут избирательно воздействовать на разные субпопуляции Т-лимфоцитов
- ✓ Способствуют формированию длительного иммунитета
- ✓ Устраняют риск инфицирования

Упрощение разработки и производства векторных вакцин:

- ✓ Простота получения ДНК патогенных микроорганизмов
- ✓ Возможность создания комбинированных вакцин
- ✓ Упрощение производства

Упрощение требований к условиям хранения: ДНК-вакцины стабильны. Они способны выдерживать колебания температур и влажности, поэтому генные вакцины не требуют создания холодовых цепочек.

3. ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ГРУПП ВАКЦИН

Ограничения ДНК-вакцин. Поскольку гены кодируют синтез белковых молекул, то ДНК-вакцины способствуют формированию иммунитета только в отношении протеиновых компонентов болезнетворных микроорганизмов. В этой связи, они не могут заменить вакцины, действие которых основано на использовании других антигенных молекул.

Другое ограничение связано с тем, что молекулы белков после синтеза часто претерпевают в клетке дальнейшие биохимические изменения. Эти процессы в клетках человека, животных и микроорганизмов могут протекать по-разному. В этой связи, существует вероятность того, что структура антигенного протеина, синтезированного в клетках человека, будет отличаться от структуры натурального иммуногенного вирусного протеина. Однако, результаты исследований пока не подтвердили этих опасений.

Кроме того, недостаточно изучены особенности перорального и интраназального введения ДНК-вакцин. Между тем, слизистые оболочки являются воротами инфекции для многих возбудителей заболеваний. Известно, что для ряда патогенных микроорганизмов наиболее эффективным методом иммунизации является инициация иммунного ответа в месте инфицирования.

Безопасность ДНК-вакцин. Существуют опасения, что молекула ДНК-плазмиды может встраиваться в ДНК хромосом человека, что приведет к мутации гена на этом участке. Однако, опыты на мышах свидетельствуют, что интеграция плазмиды в ДНК мышей наблюдается в 1000 раз реже, чем спонтанные мутации генов. Кроме того, известно, что иммунологическая толерантность может быть вызвана повторным введением низких доз антигена. При иммунизации посредством ДНК иммуногенный протеин также синтезируется в организме в небольшом количестве в течение длительного времени. Эта проблема требует более тщательного изучения. Однако, по-видимому, не является существенным препятствием в связи с возможностью регулирования количества вводимой ДНК и соответственно числа клеток, синтезирующих антигенный белок. Высказывалось предположение, что введение ДНК-вакцин может приводить к развитию аутоиммунных заболеваний в результате иммунной реакции, направленной против клеток организма человека, экспрессирующих антигенный протеин, или вследствие образования антител к чужеродной ДНК. Однако, проведенные исследования позволяют надеяться, что введение этих вакцин не повышает риск развития аутоиммунных реакций в сравнении с аттенуированными вирусными вакцинами.

ВАКЦИНЫ-АНТИГЕНЫ

Данные вакцины получают, клонируя гены возбудителя заболевания в кишечной палочке, дрожжах, клетках насекомых и млекопитающих.

Вакцины-антигены стабильны при хранении и перевозке, просты в изготовлении, в том числе и при крупномасштабном производстве, содержат минимальное количество белка, поэтому малоопасны как аллергены. Они гарантированы от остаточной инфекционности.

Проблемой является их низкая иммуногенность. Одной из ее причин может быть то, что вакцина не включает всех компонентов возбудителя, необходимых для создания иммунитета к нему. Так, вирус, покидая клетку, часто «одевается» ее мембраной. Компоненты этой мембраны, отсутствующие в генно-инженерном белке, могут обладать иммуногенными свойствами. К повышению иммуногенности этих вакцин ведет добавление адьювантов, иммобилизация вакцин на носителях или их включение в липосомы.

АНТИИДИОТИПИЧЕСКИЕ ВАКЦИНЫ

Антиидиотипические вакцины – препараты на основе антиидиотипических антител (АИА). Идиотип иммуноглобулина определяет его антигенную специфичность, обуславливая особенности структуры активного центра. Идиотип является вариантом антигенной детерминанты. Он отражает те особенности строения антитела, по которым молекулы белка, продуцирующиеся одним клоном клеток, отличается от белка того же класса, синтезирующегося другим клоном клеток одного и того же индивидуума. Пространственная конфигурация вариабельной области активных центров антител повторяют конфигурацию антигенной детерминанты. Эти антидетерминантные участки обладают антигенной специфичностью и определяют идиотип антитела. Против них вырабатываются антитела, называемые АИА. Если идиотип представляет собой отражение антигенного участка, то АИА являются его зеркальным отображением или «внутренним образом» антигена.

АИА-вакцины являются вакцинами без антигена, которые целесообразно использовать для формирования иммунитета к возбудителям, имеющим большое количество перекрестно реагирующих антигенов.

ПРОИЗВОДСТВО ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН

Накопление вирусного материала. В отличие от бактерий, вирусы растут только в клетках живых организмов. Выбор животного того или иного вида и возраста зависит от вида вируса. Инфекционный материал вводят лабораторным животным с учетом особенностей репликации и специфичности тропизма вируса:

- ✓ оральное и ректальное введение – для энтеровирусов;
- ✓ интраназальное и ингаляционное – для респираторных вирусов;
- ✓ перкутанное и кутанное – для дерматропных вирусов;
- ✓ интрацеребральное, субдуральное, люмбосакральное – для нейротропных вирусов;
- ✓ интрамускулярное, ингравенозное, интраперитональное, интраплевральное и т.п. – для вирусов со смешанным тропизмом.

При использовании в качестве живой системы куриных эмбрионов применяют разные пути их заражения вирусом: в полость амниона, хорионаллантоисную оболочку, полость аллантоиса, желточный мешок. Однако, куриные эмбрионы не универсальны – есть вирусы, которые в них не размножаются. В этой связи, для производства противовирусных вакцин в основном применяют культуры клеток.

Идентификация вируса. После накопления вирусов в клетках, следующим этапом является индикация, идентификация и определение титра вирусного материала. При заражении лабораторных животных и куриных эмбрионов вирус идентифицируют по специфическим патологическим изменениям, которые он вызывает в организме.

Выделение, очистка и концентрирование вирусного материала. Очистка вируса связана с отделением от него среды и клеточных компонентов, которые могут оказывать на организм побочное действие или провоцировать иммунные реакции, не связанные с защитным действием вакцины.

Первой стадией очистки вирусов является разрушение (механическое или химическое) инфицированных клеток для перевода вируса в культуральную среду.

Стадии очистки и концентрирования вирусов

1. Осветление клеточного лизата для удаления из культуральных жидкостей остатков клеток, упрощения очистки и для облегчения эффективной обработки вирусов инактивирующими агентами. Осветление осуществляется путем седиментации, фильтрации и центрифугирования.

2. Концентрирование и очистка вирусной суспензии путем преципитации, адсорбции или ультрафильтрации.

3. Полная очистка концентрированной суспензии с помощью седиментации, аффинной хроматографии, хроматографических методов.

Критерии оценки степени чистоты и гомогенности очищенного вирусного препарата:

- ✓ Наличие одного компонента на седиментационной диаграмме при проведении опытов в аналитической ультрацентрифуге свидетельствует о высокой степени очистки, а в некоторых случаях о монодисперсности препарата.
- ✓ Наличие одного компонента при исследовании препарата методом аналитического электрофореза свидетельствует об идентичности поверхностного заряда частиц растворенного вещества.
- ✓ Чистый вирусный препарат при исследовании в электронном микроскопе должен содержать только вирусные частицы при полном отсутствии неспецифических агрегатов балластных веществ.
- ✓ Исследование вирусного препарата путем центрифугирования в градиенте плотности позволяет обнаружить присутствие примесей, отличающихся по величине плавучей плотности от вирусного нуклеопротеида. Препараты ряда вирусов негомогенны по плотности (состоят из нескольких компонентов, отличающихся по содержанию нуклеиновой кислоты).

Контроль степени чистоты вирусного препарата с помощью иммунохимических или серологических методов. Для этого используется антисыворотка к выделенному вирусу и антисыворотка к антигенам здорового хозяина. При идеальной чистоте препарата антисыворотка к вирусу не будет реагировать с антигенами нормальной клетки и, наоборот, антисыворотка с нормальным антигеном не будет реагировать с вирусным препаратом, т.к. он не содержит антигенов нормальной здоровой клетки.

Определение концентрации очищенных вирусных препаратов с помощью электронно-микроскопических, иммунологических, биологических и спектрофотометрических методов, а также по сухому весу, по цветным реакциям на рибозу и дезоксирибозу или по содержанию фосфора.

СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА ЖИВЫХ И ИНАКТИВИРОВАННЫХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН



4. ЧАСТНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ВАКЦИН

В общем, выделенный, очищенный, сконцентрированный и проверенный аттенуированный вирусный материал – это и есть вакцина. Далее его консервируют в жидком состоянии или путем лиофильной сушки, расфасовывают во флаконы или ампулы.

Инактивация вирусного материала. Для инактивации применяют следующие агенты:

- ✓ формальдегид, глицидальдегид – для инактивации вирусов ящура, энцефалитов лошадей, чумы собак, трансмиссивных гастроэнтеритов;
- ✓ ацетилэтиленимин, этиленимин – для инактивации вирусов ящура;
- ✓ пропиолактон – для инактивации вирусов ящура, болезни Ньюкасла, бешенства, чумы собак;
- ✓ гидроксилламин – для инактивации вируса гриппа свиней, чумы птиц;
- ✓ кристалвиолет, ионы аммония чаще всего применяют в комбинации с другими инактивирующими антигенами;
- ✓ ультрафиолетовое облучение в сочетании с пропиолактоном – для получения вакцин на основе вирусов ящура и болезни Ньюкасла;
- ✓ рентгеновское и γ -облучение – для инактивации вируса гриппа;
- ✓ термическое воздействие на вирусы в целях уничтожения их инфекционности при сохранении иммуногенности.

Составление рецептуры и хранение противовирусных вакцин. Термин «рецептура» подразумевает исчерпывающее качественное и количественное описание химических компонентов, составляющих конечный продукт. В рецептуре должны указываться стабилизаторы, состава буфера, все дополнительные электролиты, а также информация по вопросам приготовления соответствующих композиций непосредственно перед их хранением и распределением между потребителями.

Многие вирусные вакцины производятся в жидком состоянии. Хотя, чаще всего при выработке стабильных вакцин используют их лиофильную сушку.

Контроль противовирусных препаратов. Все противовирусные вакцины подвергают контролю по следующим критериям: чистота, безвредность, реактогенность, безопасность, эффективность и стабильность при хранении.

Методы фракционирования вирусных антигенов

1. Солюбилизация:

- ✓ с помощью протеолитических ферментов;
- ✓ с помощью детергентов;
- ✓ с помощью органических растворителей.

2. Сепарация. Обработка вирусной суспензии соответствующим солюбилизирующим агентом приводит к разрушению вирусных частиц и выходу из них необходимых субъединиц. В результате получается смесь вирусных нуклеотидов и поверхностных субъединиц. Получить чистые субъединичные препараты можно только при разделении смеси. Одним из простейших методов отделения является адсорбция смеси гидроксидом алюминия.

После выявления и выделения индивидуальных протективных антигенов возбудителя приступают к конструированию субъединичной вакцины по определенной рецептуре.

Вакцины из расщепленного вириона (**сплит-вирусные вакцины**) получают путем обработки эфиром цельной вирусной частицы. Такая вакцина содержит в себе осколки разрушенных вирусных частиц со всеми антигенами вируса, включая балластные примеси.

Субъединичные вакцины обладают высокой иммуногенностью только при условии правильного их приготовления. Высокоочищенная субъединичная вакцина почти полностью свободна от посторонних белков клеточной или вирусной природы.

Субъединичные вакцины стандартизируют по массе белка на дозу и по специфичности иммунизирующего гликопротеида.

ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К «ИДЕАЛЬНЫМ» ВАКЦИНАМ

1. полная безвредность для привитых, а в случае живых вакцин – и для лиц, к которым вакцинный микроорганизм попадает в результате контактов с привитыми;
2. способность вызывать стойкий иммунитет после минимального количества введений (не более 3);
3. возможность введения в организм способом, исключающим парентеральные манипуляции (нанесением на слизистые оболочки);
4. стабильность, чтобы не допустить ухудшения свойств вакцины при транспортировке и хранении в условиях прививочного пункта;
5. умеренная стоимость, не препятствующая массовому применению вакцины.

КРИТЕРИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИН

Безопасность	Вакцины не должны быть причиной заболевания или смерти
Протективность	Вакцины должны защищать против заболевания, вызываемого "диким" штаммом патогена
Поддержание протективного иммунитета	Защитный эффект должен сохраняться в течение нескольких лет
Индукция нейтрализующих антител	Нейтрализующие антитела необходимы для предотвращения инфицирования таких клеток
Индукция протективных Т-клеток	Патогены, размножающиеся внутриклеточно, более эффективно контролируются с помощью Т-клеточно-опосредованного иммунитета
Практические соображения	Относительно низкая цена вакцины, легкость применения, широкий эффект

ЭТАПЫ КОНТРОЛЯ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ

В процессе производства вакцин контролируют:

- нативную взвесь на стерильность, иммуногенность, густоту;
- разведенную вакцину на стерильность и консистенцию.

При контроле готовых препаратов оценивают:

- растворимость (для сухой вакцины), гомогенность (при добавлении растворителя);
- стерильность;
- содержание фенола;
- безвредность;
- иммуногенность;
- переносимость;
- правильность этикетирования и упаковки.