

# **МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ**

## **Лекция 18**

### **Инфекционная иммунология (Ч4)**

## ВАКЦИНЫ. ИММУННЫЕ СЫВОРОТКИ. ИММУНОГЛОБУЛИНЫ

- Одним из важнейших направлений прикладной микробиологии является создание эффективных препаратов для иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных заболеваний. Среди таких препаратов различают:
- 1) вакцины и анатоксины— препараты для индукции в организме специфического иммунного ответа с формированием активного противои инфекционного иммунитета за счет мобилизации механизмов иммунологической памяти;
- иммунные сыворотки и иммуноглобулины — препараты, содержащие готовые специфические антитела (иммуноглобулины), введение которых в организм приводит к немедленному приобретению пассивного гуморального иммунитета, способного защитить организм от интоксикации или инфекции

## Вакцины

- Название «вакцины» было дано Л. Пастером всем прививочным препаратам, полученным из микроорганизмов и их продуктов. Э. Дженнером была получена первая живая вакцина, содержащая вирус коровьей оспы (*vaccinus* - коровий), идентичный по антигенным свойствам вирусу натуральной оспы человека, но маловирулентный. Для человека. Таким образом, первый вакцинный штамм был заимствован из природы. Заслугой Л. Пастера была разработка принципов направленного получения вакцинных штаммов-селекция спонтанных мутантов с пониженной вирулентностью и сохранными иммуногенными свойствами путем культивирования их в определенных условиях или пассирования через организм устойчивых к данной инфекции животных.

# Вакцины

Группа вакцин по способам приготовления	Бактериальные вакцины	Вирусные вакцины
Живая (аттенуированная)	Туберкулезная — BCG Чумная Сибиреязвенная Туляремийная Бруцеллезная	Коревая Антирабическая Оспенная Паротитная Полиомиелитная I, II и III типов Против желтой лихорадки
Инактивированная	Лептоспирозная Коклюшная Гонококковая Бруцеллезная	Гриппозная Против клещевого энцефалита
Анатоксин	Стафилококковый Дифтерийный (АД) Столбнячный (АС) Секстаанатоксин Комбинированные препараты: дифтерийно-столбнячный (АДС); - коклюшно-дифтерийно-столбнячный (АКДС)	

# Вакцины

<b>Группа вакцин по способам приготовления</b>	<b>Бактериальные вакцины</b>	<b>Вирусные вакцины</b>
Химическая (субъединичная)	Сыпнотифозная Холерная (холероген + О-антиген) Менингококковая	Гриппозная и др.
Рекомбинантная		Гриппозная и др.
Генноинженерная		Против гепатита В
Антиидиотипическая	В стадии разработки	
Липосомальная	В стадии разработки	

## Вакцины

Исходя из этих принципов были получены вакцины первого поколения: против бешенства, туберкулеза, чумы, туляремии, сибирской язвы, полиомиелита, кори, паротита и др. Живые вакцины создают, как правило, напряженный иммунитет, сходный с постинфекционным. В большинстве случаев достаточно бывает однократной вакцинации живой вакциной, так как вакцинный штамм может размножиться и персистировать в организме. Применение живых вакцин опасно для людей (особенно детей) с врожденными или приобретенными иммунодефицитными состояниями, на фоне которых возбудители с пониженной вирулентностью могут вызвать тяжелые инфекционные осложнения. Убитые вакцины готовят из микроорганизмов, обладающих максимально выраженной иммуногенностью, инактивированных прогреванием, УФ-лучами или химическими веществами (формалином, фенолом, спиртом и др.) в условиях, исключающих денатурацию антигенов. Примерами убитых вакцин могут служить вакцины против коклюша, лептоспироза, клещевого энцефалита.

## Вакцины

Следует учитывать, что аттенуированный, или убитый, возбудитель, с точки зрения современной иммунологии, — это множество различных антигенных детерминант, из которых «протективностью», т.е. способностью индуцировать защитный иммунитет, обладают очень немногие. В связи с этим целесообразно усовершенствование вакцин путем использования компонентов бактериальных клеток и вирионов, обладающих наиболее выраженным протективным действием, и очистки вакцинных препаратов от токсичных или алергизирующих компонентов. Выделение из бактериальных клеток компонентов, соответствующих протективным антигенам, позволило получить вакцины второго поколения — химические. По сравнению с убитыми и живыми вакцинами химические вакцины менее реактогенны. Примером может служить холерная вакцина, которая состоит из двух компонентов: холерогена-анатоксина и ЛПС, извлеченного из холерных вибрионов. Аналогами бактериальных химических вакцин являются вирусные субъединичные (расщепленные) вакцины, содержащие лишь некоторые наиболее иммуногенные компоненты вирионов

## Вакцины

Примером является противогриппозная вакцина, включающая гемагглютинин и нейраминидазу, т.е. именно те антигены, против которых вырабатываются вируснейтрализующие антитела. Субъединичные вакцины оказались наименее реактогенными, но и наименее иммуногенными.

Для повышения иммуногенности химических и субъединичных вакцин к ним добавляют разного рода адъюванты (*adjuvans* — помогающий, поддерживающий): гидроксид алюминия, алюминиево-калиевые квасцы, фосфат алюминия и др. Те же адъюванты добавляют для повышения иммуногенности и к препаратам анатоксинов. Анатоксины получают путем обработки токсинов формалином (0,3% раствор) при температуре 37°C в течение 30 дней. При этом токсин утрачивает ядовитость, но сохраняет способность индуцировать синтез антитоксических антител. Анатоксинами широко пользуются для выработки активного антитоксического иммунитета при специфической профилактике столбняка, дифтерии и других инфекций, возбудители которых продуцируют экзотоксины



## Вакцины

Достижения современной фундаментальной иммунологии и молекулярной биологии позволяют получить в чистом виде антигенные детерминанты (эпитопы). Правда, изолированная антигенная детерминанта иммуногенностью не обладает. Поэтому создание вакцин новых поколений требует конъюгации антигенных детерминант с молекулой-носителем. В качестве носителей можно использовать как природные белки, так и синтетические полиэлектролиты. Конструирование таких искусственных вакцин позволяет соединить несколько эпитопов разной специфичности с общим носителем, ввести в такой комплекс необходимую адьювантную группировку. Другой принцип используется при создании вакцин следующего поколения - генноинженерных: на основе картирования геномов микроорганизмов гены, контролирующие нужные антигенные детерминанты, переносят в геном других микроорганизмов и клонируют в них, добиваясь экспрессии этих генов в новых условиях.

## Вакцины

Вакцинация должна обеспечивать доставку антигенных эпитопов к иммунокомпетентным клеткам, при этом необходимо исключить возможность изменения их структуры под действием ферментов. Одно из перспективных решений этой проблемы связано с использованием липосом — микроскопических пузырьков, состоящих из двуслойных фосфолипидных мембран. Благодаря их сходству с клеточными мембранами липосомы не токсичны для организма, а заключенное в них вещество защищено от разбавления и деградации в крови. Липосомы способны адсорбироваться на клетках, причем их содержимое медленно поступает внутрь клетки. Фагоцитирующие клетки могут захватывать липосомы путем эндоцитоза с последующей деградацией их мембран. Антигены, включенные в состав поверхностной мембраны липосом, приобретают свойства адъюванта — способность вызывать сильный иммунный ответ.

## Вакцины

Другие антигены можно вводить в содержимое липосом. В эксперименте такие «липосомные» вакцины вызывали тысячекратное усиление иммунного ответа.

Часть вакцин используется для обязательной плановой вакцинации детского населения: противотуберкулезная вакцина BCG, полиомиелитная вакцина, коревая, паротитная, АКДС (адсорбированная вакцина против коклюша, дифтерии и столбняка).

Другие вакцины обязательны для введения определенным контингентам в определенных районах (например, вакцина против клещевого энцефалита) или при опасности профессиональных контактов с возбудителем (например, вакцины против зооантропонозных инфекций). По эпидемиологическим показаниям начинают применять вакцины, предназначенные для предупреждения распространения эпидемий, например эпидемии гриппа.

## Вакцины

При необходимости проведения массовой вакцинации населения по эпидемиологическим показаниям в настоящее время применяют безыгольный струйный иньектор. В основе безыгольного метода введения препарата лежит способность тонкой струи жидкости, выходящей под большим давлением, пробивать кожу и проникать на определенную глубину. Преимуществами такого метода являются: высокая производительность и экономичность, техническая простота соблюдения стерильности, исключение возможности передачи так называемых шприцевых инфекций (гепатит В, СПИД) и безболезненность. Общими требованиями к вакцинным препаратам являются: высокая иммуногенность (способность обеспечивать надежную противоиnфекционную защиту), ареактогенность (отсутствие выраженных побочных реакций), безвредность и минимальное сенсibiliзирующее действие.

## Вакцины

При необходимости проведения массовой вакцинации населения по эпидемиологическим показаниям в настоящее время применяют безыгольный струйный инъектор. В основе безыгольного метода введения препарата лежит способность тонкой струи жидкости, выходящей под большим давлением, пробивать кожу и проникать на определенную глубину. Преимуществами такого метода являются: высокая производительность и экономичность, техническая простота соблюдения стерильности, исключение возможности передачи так называемых шприцевых инфекций (гепатит В, СПИД) и безболезненность. Общими требованиями к вакцинным препаратам являются: высокая иммуногенность (способность обеспечивать надежную противоифекционную защиту), ареактогенность (отсутствие выраженных побочных реакций), безвредность и минимальное сенсibiliзирующее действие.

## Вакцины

До настоящего времени далеко не все вакцинные препараты отвечают этим требованиям. Применение многих вакцинных препаратов у определенной части вакцинированных людей сопровождается побочными реакциями и осложнениями. Частично осложнения являются следствием антигенной перегрузки, особенно у детей 1-го года жизни. В течение 1-го года жизни ребенок, как правило, получает 4-5 вакцинных препаратов. В течение первых 10 лет жизни «календарь прививок» создает высокую антигенную нагрузку на иммунную систему детского организма. Результатом может быть сенсбилизация, сопровождающаяся развитием гетероаллергии. Некоторые живые вакцины (против бешенства, против желтой лихорадки) у детей с иммунодефицитными состояниями оказываются энцефалитогенными. Осложнения при плановой вакцинации могут быть связаны с несоблюдением противопоказаний. К числу отдаленных осложнений вакцинации можно отнести развитие аутоиммунных заболеваний за счет действия перекрестно реагирующих антигенов в составе некоторых вакцин.

## Вакцины

Значительно более ограничено применение вакцин с целью иммунотерапии, в основном при инфекциях с хроническим, затяжным течением. С этой целью применяют, например, убитые вакцины: стафилококковую, гонококковую, бруцеллезную. В одних случаях курс вакцинотерапии может оказывать иммуностимулирующее, в других - десенсибилизирующее действие.

## Иммунные сыворотки и иммуноглобулины

Иммунные сыворотки и получаемые из них иммуноглобулины — биологические препараты, содержащие антитела. Они предназначены для создания пассивного антитоксического, антибактериального или противовирусного иммунитета у человека, нуждающегося в защите от инфекции или других потенциально-опасных веществ, обладающих антигенными свойствами. Иммунные сыворотки и иммуноглобулины используются как средства серопрофилактики и серотерапии. В первом случае сывороточные препараты вводятся до возможного заражения или непосредственно после него, пока еще не появились признаки заболевания, а пациент не обладает собственными антителами, способными защитить его от заражения. Во втором случае препараты вводятся для лечения — нейтрализации токсинов или вирусов, усиления антимикробной защиты. Лечебные препараты используются в тех случаях, когда имеются основания считать, что организм не способен обеспечить собственную защиту. Действие препаратов, создающих пассивный иммунитет, начинается быстро — сразу после введения, однако срок действия ограничен периодом их сохранения в организме. Кроме того, введенные антитела препятствуют развитию активного иммунитета против возбудителя.



## Иммунные сыворотки и иммуноглобулины

Все сывороточные препараты делятся на две группы: **гетерологичные**, полученные из крови животных, и **гомологичные**, полученные из крови человека. Эти различия имеют принципиальное значение, так как гетерологичные препараты являются для организма человека чужеродными антигенами, их применение сопровождается развитием антител, которые могут не только нейтрализовать действие препарата, но вызвать в организме тяжелые аллергические и иммунокомплексные реакции.

Гетерологичные иммунные сыворотки получают из крови животных (чаще лошадей), подвергнутых интенсивной иммунизации анатоксином или другим антигеном (гипериммунизации). В настоящее время неочищенные сыворотки практически не применяют: их подвергают очистке от балластных веществ обработкой ферментами, диализом («Диаферм»), либо другими методами. Предпочтительнее использование глобулиновых фракций, которые содержат не более 20% всех белков, содержащихся в сыворотке. Однако гетерологичные глобулины иммуногенны для человека, как и цельные сыворотки.

# Иммунные сыворотки и иммуноглобулины



Сывороточные препараты

## Иммунные сыворотки и иммуноглобулины

Преимущество гетерологичных препаратов в том, что интенсивная иммунизация животных позволяет достичь высокой концентрации антител, кроме того, нет ограничений в подборе продуцентов, тогда как иммунизация доноров связана с большими трудностями.

Высокая иммуногенность препаратов, полученных из крови животных, ограничивает их применение и требует особого внимания при использовании. Перед их применением следует осведомиться, вводили ли подобные вещества пациенту ранее, нет ли у него повышенной чувствительности к другим антигенам. При этом необходимо иметь в виду, что повышенная чувствительность может возникнуть и без введения препаратов за счет действия других антигенов, имеющих сходство с его белком. Во всех случаях необходим предварительный контроль чувствительности к данному препарату.

## Иммунные сыворотки и иммуноглобулины

За полчаса до внутримышечного или подкожного введения необходимой дозы пациенту делают внутрикожную пробу путем введения 0,1 мл разведенного 1:100 препарата и только при полном отсутствии местной или общей реакции вводят полную дозу препарата. К сывороткам и иммуноглобулинам, предназначенным для введения человеку, прилагается ампула разведенного препарата, предназначенная для предварительного контроля чувствительности к нему. В случае выявления чувствительности вместо гетерологичных препаратов могут быть использованы иммуноглобулины человека.

Препараты иммуноглобулинов, полученные из человеческой крови, для человека не иммуногенны, и в этом их преимущество перед гетерологичными сыворотками и глобулинами.

## Иммунные сыворотки и иммуноглобулины

Иммуноглобулины человека готовят из донорской или плацентарной крови, предварительно смешивают сыворотки, полученные из крови разных лиц, и поэтому концентрация в них антител невелика. Кроме антител, ради которых готовят препараты иммуноглобулинов, они содержат другие антитела, находящиеся в крови человека. Поэтому противокоревой иммуноглобулин используют и для профилактики гепатита, коклюша, менингита и других инфекционных заболеваний. Для получения препаратов иммуноглобулинов с повышенным содержанием антител производят предварительный отбор сырья — сывороток крови содержащих соответствующие антитела, а также используют сыворотки реконвалесцентов или доноров, подвергнутых иммунизации. Такие препараты маркируются отдельно и используются для групп особого риска: новорожденных, тяжелобольных и других.

## Иммунные сыворотки и иммуноглобулины

Иммуноглобулины человека готовят из донорской или плацентарной крови, предварительно смешивают сыворотки, полученные из крови разных лиц, и поэтому концентрация в них антител невелика. Кроме антител, ради которых готовят препараты иммуноглобулинов, они содержат другие антитела, находящиеся в крови человека. Поэтому противокоревой иммуноглобулин используют и для профилактики гепатита, коклюша, менингита и других инфекционных заболеваний. Для получения препаратов иммуноглобулинов с повышенным содержанием антител производят предварительный отбор сырья — сывороток крови содержащих соответствующие антитела, а также используют сыворотки реконвалесцентов или доноров, подвергнутых иммунизации. Такие препараты маркируются отдельно и используются для групп особого риска: новорожденных, тяжелобольных и других.

## Иммунные сыворотки и иммуноглобулины

Существующие методы приготовления глобулинов полностью исключают возможность присутствия в них вирусов, в том числе и ВИЧ (вируса иммунодефицита человека), но они могут содержать агрегированные в процессе приготовления реактогенные белки. Поэтому препараты иммуноглобулинов вводят только в мышцу, подкожно или наносят на слизистые. Иммуноглобулины, предназначенные для внутривенного введения, подвергают дополнительной обработке с целью удаления агрегатов и снижения реактогенности.

В качестве профилактических и лечебных препаратов могут использоваться «чистые.антитела» - иммуноглобулины, полученные сорбцией антител на антигенных сорбентах. Однако такие антитела не получили широкого использования из-за сложности технологии приготовления и относительной нестабильности препаратов.

## Иммунные сыворотки и иммуноглобулины

Среди перспективных препаратов на будущее необходимо назвать моноклональные антитела, обладающие высокой специфичностью действия. Получаемые в настоящее время моноклональные антитела - гетерологичные (чаще всего мышинные) иммуноглобулины, и к ним приложимо то, что было сказано выше относительно чужеродных препаратов. Однако моноклональные антитела - препараты, почти на 100% состоящие из специфических антител, что позволяет их вводить в малых и, следовательно, в низкоиммуногенных дозах. В настоящее время разработана технология создания гибридных молекул антител, состоящих из вариабельного (антигенсвязывающего) домена мышинового иммуноглобулина и остальной части молекулы от человеческого иммуноглобулина. Такие препараты для человека практически не иммуногенны.



## Иммунные сыворотки и иммуноглобулины

Моноклональные антитела могут использоваться не только как биологически активные вещества, воздействующие прямо на клетки и молекулы, обладающие соответствующими антигенами. Они могут использоваться как средство доставки других активных субстратов. Так, моноклональные антитела к антигенам опухоли могут быть конъюгированы с цитотоксическими лекарственными препаратами и использоваться в качестве «почтальонов», доставляющих лекарство непосредственно к опухоли.

Для использования большинства иммунологических и серологических методов исследования необходимо иметь стандартные препараты антител. Основные требования к этим препаратам - специфичность, стабильность, достаточное содержание антител. Сложность получения таких препаратов путем иммунизации животных связана с гетерогенностью получаемых при этом антител. Каждый природный антиген многокомпонентен, и к каждому его эпитопу формируются отдельные клоны антителообразующих клеток, что обуславливает большое разнообразие продуцируемых антител. Более того, к одной антигенной детерминанте может образоваться множество вариантов молекул антител. Таким образом, антитела, получаемые от разных особей одного вида, иммунизированных одним антигенным препаратом, не полностью идентичны.

Получить абсолютно однородные антитела можно, только используя клетки — антителопродуценты одного клона — потомков одной специализированной клетки. Решить задачу, используя специально отобранные лимфоциты иммунного человека или животного, невозможно, поскольку срок жизни каждого клона клеток ограничен и количество продуцируемых антител очень невелико. Положение коренным образом изменилось после того, как Г. Кёлер и Ц. Милштейн осуществили гибридизацию антителообразующих клеток, полученных от животного, с культивируемыми в пробирке клетками злокачественной опухоли — В-клеточной плазматомы. Полученные при этом гибридные клетки обладали свойствами обеих родительских клеток: способностью продуцировать антитела и способностью к неограниченному размножению вне организма.

Таким образом, были получены теоретически «бессмертные» клоны гибридных клеток (*гибридомы*), способные к образованию неограниченного количества однородных продуктов одного клона клеток — моноклональных антител.

Процедура получения гибридных клеток и моноклональных антител сводится к следующему. Животное (чаще мышь) иммунизируют нужным антигенным материалом. После того как началась продукция антител, удаляют селезенку, и из нее извлекают клетки, среди которых имеются антителообразующие В-лимфоциты. Все клетки смешивают со специально отобранными клетками культуры В-миеломы, дефектными по ферменту метаболизирующему гипоксантин. К смеси клеток добавляют вещество, повреждающее оболочки клеток и способствующее их слиянию между собой (полиэтиленгликоль, лизолецитин или вирус Сендай). В результате образуются разнообразные гибридные клетки, а часть клеток остается негибридизированной. Для того чтобы выделить только гибридные клетки, полученную смесь культивируют на специальной среде ГАТ (содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин), в которой не могут жить родительские клетки. В среде остаются живыми только гибридные клетки, но с разными свойствами, так как в селезенке иммунизированного животного наряду с антителообразующими клетками, которые было необходимо получить, содержится много других лимфоцитов.

Поэтому следующим этапом является отбор гибридных клеток, способных продуцировать необходимые антитела. Для этого взвесь полученных клеток разбавляют питательной средой и помещают в лунки специальных панелей так, чтобы в каждую лунку попало по одной клетке. Через определенное время определяют антитела, образовавшиеся в каждой лунке, и находят те клетки, которые можно использовать как родоначальников клона гибридных клеток. Отобранные гибридные клетки можно культивировать *in vitro* или *in vivo*, получая необходимые количества клеток и моноклональных антител. Гибридные клетки могут храниться в замороженном состоянии, пересылаться из лаборатории в лабораторию. В ходе приготовления гибридных клеток может быть выделено несколько клонов клеток, продуцирующих антитела к разным эпитопам антигена, что позволяет провести его разносторонний анализ.

Моноклональные антитела могут использоваться для разных практических целей:

- 1) для идентификации клеток — выявления Т- и В-лимфоцитов и других клеток, определения их свойств;
- 2) для осуществления современных радиоиммунных, иммуноферментных и иммунолюминесцентных методов выявления антигенов и антител;
- 3) для определения локализации антигенов в организме и доставки к ним (например, в опухоль) лекарственных веществ, присоединенных к антителам;
- 4) для приготовления иммуносорбентов, позволяющих выделить или удалить из организма антигены или клетки данной специфичности.