

# БІОЛОГІЯ

УДК 579.6+573.6

Михальський Л. О.

## ДЕЯКІ СУЧАСНІ НАПРЯМИ БІОТЕХНОЛОГІЇ У ЛЕКЦІЙНОМУ КУРСІ ДЛЯ МАГІСТРІВ БІОЛОГІЇ

У статті розглянуто теоретико-методологічні аспекти викладання деяких напрямів біотехнології у лекційному курсі для магістрів біології. Наведено коротку характеристику основних напрямів сучасної біотехнології: зокрема тих, що пов'язані з охороною здоров'я людини: одержання нових діагностичних препаратів, інтерферонів, імунодепресантів, вакцин, біфункціональних препаратів. Розглянуто перспективи використання маніпуляцій з генами для боротьби зі спадковими та вірусними хворобами і пухлинами.

### ВИЗНАЧЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ. РІЗНОМАНІТНІСТЬ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ. ІМУНОБІОТЕХНОЛОГІЯ

Людство здавна використовувало окремі біотехнологічні процеси у своєму житті та практичній діяльності. Насамперед це були різноманітні типи бродіння, що застосовувалися при випіканні хліба, виноробстві, пивоварінні, для одержання кисломолочних продуктів, при вимочуванні льону, для одержання полотна тощо. На сьогодні біотехнологія - це окрема галузь прикладної діяльності людини, що дозволяє використовувати властивості мікроорганізмів та культур клітин у промислових процесах і базується на знаннях і методах біохімії, мікробіології, генетики, імунології, хімічної технології та ін. Біотехнологію розглядають як промислове використання біологічних процесів та агентів на основі одержаних високоефективних форм мікроорганізмів, культур клітин та тканин рослин і тварин із заданими властивостями, метаболізм і біосинтетичні можливості яких забезпечують продукцію специфічних речовин, що використовуються людиною. У промисловому масштабі біотехнологія перетворюється на біоіндустрію.

### Основні напрями сучасної біотехнології

#### А. «Традиційна» біотехнологія

1. Одержання харчових продуктів:
  - продукти молочно-кислого бродіння: кефір, йогурти, сири, масло та ін.;

- продукти спиртового бродіння: хліб, вино, пиво, спирт.
2. Одержання органічних кислот та амінокислот:
    - лимонна, оцтова, молочна кислоти, глютамінова амінокислота та лізин;
    - ксантан та ін.
  3. Одержання фармацевтичних препаратів:
    - антибіотики (пеніциліни, цефалоспорини, бацитрацин та ін.);
    - імунодепресанти (циклоспорін);
    - вітаміни та коферменти (ціанкобаламін-В<sub>12</sub>, рибофлавін - В<sub>2</sub>);
    - гормони (наприклад стероїди - гідрокортизон);
    - вакцини (з використанням як самих мікроорганізмів, так і культур тваринних клітин, наприклад, для культивування вірусів);
    - діагностичні препарати на основі мікроорганізмів та окремих біополімерів;
    - ферменти (протеази, амілази та ін.).
  4. Одержання різних хімічних сполук (етанол, ацетон, бутанол, глюконова кислота, гліцерин).
  5. Відновлення мінеральних ресурсів.
  6. Боротьба із забрудненням довкілля (біологічна очистка та біоремедіація).

#### Б. «Нова» біотехнологія

1. Використання генетично модифікованих мікроорганізмів для одержання:
  - специфічних білків людини (інсулін, інтерферони, соматотропний гормон, інтерлейкіни, фактори згортання крові та ін.);

- генноінженерних вакцин, ДНК-вакцин;
  - рекомбінантних пептидів і білків як компонентів нових діагностичних препаратів.
2. Одержання трансгенних рослин.
  3. Одержання трансгенних тварин.
  4. Генна терапія спадкових і ракових захворювань.
  5. Використання методів гібридизації нуклеїнових кислот (ДНК-зонди у діагностиці та ДНК-фінгерпринтінгу).
  6. Клітинна інженерія:

- одержання гормонів та різноманітних біологічно активних речовин із культур рослинних і тваринних клітин та тканин;
- виведення нових сортів рослин на основі соматичної гібридизації;
- одержання моноклональних антитіл для діагностики та лікування хвороб людини, біоіндикації речовин надчутливими імунохімічними методами, надтонкої очистки речовин та ін.

Розвиток біотехнології невіддільний від стрімкого пізнання життєвих процесів у цілому. В свою чергу, результати фундаментальних досліджень життєвих явищ на клітинному та молекулярному рівнях тісно пов'язані з технічним прогресом і технологічними нововведеннями. Особливий поштовх до розвитку та становлення сучасної біотехнології надали фундаментальні відкриття у молекулярній біології, що сталися у другій половині ХХ СТ.

Сучасні біотехнологічні процеси засновані на методах та технологіях, суттєво або принципово відмінних від традиційних:

- генній інженерії або технології рекомбінантних ДНК *in vitro*;
- клітинній інженерії;
- використанні іммобілізованих ферментів, клітин, клітинних органел тощо.

Основу генної інженерії становить процедура введення природної або синтезованої ДНК, що є геном конкретного білка, у вектор, яким може бути бактеріальна плазміда або геноми певних вірусів та їх поєднань, створених штучно людиною (косміди, фазміди). Таку рекомбінантну молекулу ДНК вводять у клітину прокариот або еукариот, де відбувається її експресія. Клітини, що містять вказану ДНК, розмножують, вони утворюють клон трансформованих клітин, які й синтезують цінний продукт. Мета біотехнології- одержання клонів трансформованих клітин, здатних до експресії чужорідної генетичної інформації, й синтез ними специфічних білків у великій кількості. Технологія рекомбінантних ДНК важлива не тільки для біотехнології, а й не меншою мірою для фундаментальних досліджень, пов'язаних з ви-

вченням структури генів, регуляції їх експреси, структури білків, перетасування генів у процесі еволюції тощо.

Технологія іммобілізованих ферментів почала активно розвиватися з кінця 60-х років ХХ СТ. За цією технологією, наприклад, ферменти зв'язують із пористим гелем або фіксують на поверхні твердої фази. Вказані технології застосовували у процесі промислового виробництва напівсинтетичних пеніцилінів, при одержанні концентрату фруктози з крохмалю зернових культур, а також при проведенні нескладних біохімічних аналізів. Ще ефективнішим може бути використання іммобілізованих клітин та клітинних органел, оскільки вони містять усі необхідні гени для синтезу складних сполук.

Хоча біотехнологічні процеси й пов'язані насамперед з мікробіологією та ензимологією, не менш суттєву роль для них відіграє використання культур клітин тварин, наприклад, при культивуванні вірусів (зокрема поліомієліту) для виробництва вакцин чи діагностикумів, для одержання інтерферонів, а також при одержанні моноклональних антитіл. Лінії культур клітин людини стали незамінними для виділення й культивування ряду вірусів, при виробництві високоспецифічних білків, у дослідженнях пухлинного росту та противірусній хіміотерапії. Надзвичайно перспективними є напрями використання культур рослинних клітин і тканин для одержання цілого ряду важливих сполук.

Серед напрямів сучасної біотехнології особливе місце посідають ті, що пов'язані з охороною здоров'я, профілактикою, діагностикою та лікуванням хвороб як людини, так і тварин. У зв'язку із цим особливе місце у біотехнології відводиться *імунобіотехнології*.

Сучасну імунологію можна розглядати у двох взаємопов'язаних аспектах: по-перше, як науку, що вивчає механізми функціонування імунної системи і використання одержаних даних для діагностики, профілактики й лікування багатьох хвороб, пов'язаних з функціонуванням цієї системи (інфекції, аутоімунні процеси, алергія, рак тощо); а по-друге, як наукову основу однієї з галузей біотехнології - імунобіотехнології, що здатна забезпечити виробництво речовин, необхідних не тільки для впливу власне на імунну систему і для медицини взагалі, а й для багатьох наукових і прикладних галузей, у яких потрібна індикація біоорганічних субстанцій, вірусів, бактерій. Основою такого застосування є надзвичайна точність і чутливість імунологічних методів. Великі перспективи має також використання антитіл, наприклад, для виділення біоорганічних сполук у чисто-

му вигляді імуносорбентними методами, спрямованому транспорту лікарських препаратів тощо.

До імунобіотехнологічних відносять усі процеси, пов'язані з одержанням та використанням у практиці речовин і сполук, що впливають насамперед на функціонування імунної системи людини. Традиційними процесами, що належать до імунобіотехнологічних, можна вважати культивування мікроорганізмів у технічних масштабах для одержання діагностичних препаратів та вакцин, одержання антитіл з сироватки крові імунізованих тварин для створення тих же діагностикумів та для терапевтичного використання специфічних гаммаглобулінів у лікуванні багатьох інфекційних хвороб та ін.

### ОДЕРЖАННЯ СУЧАСНИХ ДІАГНОСТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

Медицина здавна успішно використовує досягнення природничих наук, а також інтенсивно застосовує нові технології для діагностики і лікування захворювань. Профілактику й лікування будь-якого інфекційного захворювання значно полегшує рання і точна ідентифікація патогенного мікроорганізму, що його викликав. Для про-

ведення діагностики традиційним шляхом необхідно спочатку виростити культуру потенційно патогенного мікроорганізму і лише потім проаналізувати його властивості. Хоча подібні тести дуже ефективні і мають досить високу специфічність, часто вони забирають багато часу і є дорогими. Крім того, дуже обмежена можливість виявлення тих патогенних мікроорганізмів, що погано ростуть у культурі або взагалі не піддаються культивуванню.

Будь-який метод виявлення патогенних мікроорганізмів повинен бути досить простим і мати високу специфічність та чутливість. Специфічний діагностичний тест повинен давати позитивну відповідь тільки на мікроорганізм або молекулу-мішень, чутливий - виявляти дуже малі кількості такої мішені навіть на фоні інших мікроорганізмів або молекул, що забруднюють зразок. Під простотою методу розуміють те, що він є досить продуктивним, ефективним і недорогим для рутинного застосування. Останнім часом до традиційних мікробіологічних та імунологічних методів лабораторної діагностики інфекційних захворювань додалися нові, засновані на використанні молекулярно-генетичних технологій (табл.1).

Таблиця 1. Порівняння деяких методів діагностики інфекційних захворювань

Метод	Переваги	Недоліки
Мікроскопічне дослідження	Простота. Безпосереднє виявлення патогенних мікроорганізмів. Можливість розрізнення патогенних мікроорганізмів за морфологічними ознаками.	Трудоемкість, тривалість. Низька чутливість. Неможливість розрізнення подібних мікроорганізмів. Необхідність високої кваліфікації персоналу для інтерпретації результатів.
Культивування <i>in vitro</i> та введення чутливим тваринам	Виявлення тільки життєздатних патогенних мікроорганізмів. Можливість визначення вірулентності та інфекційності.	Тривалість аналізу, висока собівартість. Необхідність використання тварин. Залежність результатів від породи тварин. Втрата життєздатності в організмі тварини.
Визначення антитіл у сироватці крові	Простота, короткотривалість аналізу. Можливість автоматизації. Можливість тестування значної кількості зразків одночасно.	Прояви неспецифічності. Неможливість розрізнення гострої та латентної форм інфекції.
Гібридизація та використання специфічних ДНК-зондів	Швидкість, висока чутливість і специфічність. Пряме визначення патогенних мікроорганізмів. Можливість розрізнення різних видів мікроорганізмів. Незалежність результатів від попередніх інфекцій. Не потребують життєздатності збудника. Можливість автоматизації.	Висока вартість аналізів, багатоетапність. Неможливість розрізнення живих та мертвих мікроорганізмів.

## Синтетичні антигени

Традиційні процедури діагностики збудників інфекції спираються або на набір характеристик патогенного мікроорганізму, або, що важливіше, на одну унікальну, легко помітну його особливість. Мікробіологи-клініцисти намагаються знайти той мінімальний набір біологічних характеристик, за допомогою якого можна буде гарантовано виявляти й ідентифікувати патогенні мікроорганізми. Наприклад, деякі збудники виробляють специфічні біохімічні сполуки, які й необхідно віднайти в біологічному зразку. Часто подібну маркерну молекулу можна виявити безпосередньо, провівши високоспецифічний біохімічний аналіз. Але це надзвичайно трудомісткий підхід. Більш придатні універсальні методи, що дозволяють виявити будь-яку маркерну молекулу (діагностично-значимий антиген) незалежно від її хімічної природи. Саме таким є метод, заснований на застосуванні високоспецифічних антитіл до збудника або до його діагностичних антигенів, та ідентифікація комплексів антиген-антитіло у тій чи іншій системі, наприклад в імуноферментному чи імунофлуоресцентному аналізі.

Одним із підходів, що дозволяє визначити, чи відбулося зв'язування антитіла з антигеном-мішенню, є імунохімічні та серологічні методи. В них використовуються або специфічні антигени для виявлення антитіл до конкретного збудника у сироватці крові, або специфічні антитіла для виявлення самого збудника у дослідженому матеріалі.

Із зростанням кількості праць з вивчення антигенів різних збудників стало можливим створення таких штучних антигенів, які б повністю відтворювали структуру природного білка і могли використовуватись як компоненти діагностичних систем.

Синтетичні антигени мають не лише наукові, а й практичні переваги. Основні переваги застосування синтетичних антигенів такі:

- зникає необхідність використання інфекційного матеріалу (це особливо важливо, коли збудник є надзвичайно небезпечним);
- властивості продукту можна охарактеризувати точніше, тому відпадає або спрощується система контролю якості, можна стандартизувати препарати;
- пептидні реагенти зберігають стабільність необмежене довгий час навіть за кімнатної температури;
- можна отримувати реагенти для діагностики таких інфекційних хвороб, збудники яких не культивуються в штучних умовах;

- вартість виробництва таких препаратів набагато нижча, ніж одержання звичайних антигенів.

На сьогодні штучні антигени широко застосовуються як компоненти діагностичних систем для проведення діагностики на В-клітинному рівні - визначення антитіл до збудника у сироватці крові. Така діагностика дає інформацію про:

- епідеміологічне поширення інфекції;
- стадію і перебіг інфекції у конкретного хворого;
- наявність інфекційних агентів у крові та продуктах крові;
- ступінь ефективності хіміотерапії при бактеріальних та паразитарних хворобах;
- етіологію хвороб, що мають подібну симптоматику і діагностика яких іншими методами ускладнена (наприклад гепатит і діарея).

Синтетичні антигени можуть бути ефективно використані у програмах вакцинації, особливо проти тих хвороб, у яких серологічна ідентифікація збудника є найбільш важливою (наприклад вірус грипу); а також для визначення стадії хвороби, особливо при деяких вірусних захворюваннях.

На відміну від В-клітинних, Т-клітинні діагностичні системи використовуються ще недостатньо, оскільки тести, що виявляють функції Т-клітин і розпізнавані ними антигени, надзвичайно складні і непридатні для рутинного використання. Відомо, що Т-клітини розпізнають антиген тільки у сполученні з МНС, тому для визначення необхідна наявність гістосумісних антигенпрезентуючих клітин. Також для Т-клітин характерна велика генетична відмінність в імунореактивності. Є декілька субпопуляцій Т-клітин, що відрізняються одна від одної за імунорегуляторними та ефекторними функціями, наприклад, шкірні реакції гіперчутливості, лізис АПК тощо. Т-клітини здатні виконувати як захисні, так і патологічні функції. Потреба у Т-захисних клітинах визначається типом інфекції, її тропізмом і типом інфікованих клітин. Т-тести на сьогодні є предметом активних наукових досліджень.

## ДНК-зонди

Діагностичні засоби, створені на основі аналізу генетичних структур, що визначають індивідуальність кожного організму, мають загальну назву - ДНК-зонди. Усі вони базуються на принципі комплементарності нуклеотидів (праймерів), штучно синтезованих людиною. Серед методів визначення специфічного зв'язування таких зондів із геномом збудника перше місце за чутли-

вістю посідає полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), яка дає можливість визначити практично одну молекулу ДНК. ПЛР замінила традиційну гібридизацію, яка в класичному варіанті використовувала як ДНК-зонди фрагменти ДНК із нанесеною індикаторною частиною. ПЛР - це штучний процес багаторазового копіювання (ампліфікації) специфічної послідовності ДНК, що здійснюється *in vitro*. Копіювання ДНК при ПЛР здійснюється спеціальним ферментом - ДНК-полімеразою, так само як і в клітинах живих організмів. ДНК-полімераза, рухаючись по одному ланцюгу ДНК (матриці), синтезує комплементарну їй послідовність ДНК. Важливо, що ДНК-полімераза не може почати синтез ланцюга ДНК «з нуля», їй необхідний короткий «затравочний» ланцюг РНК чи ДНК, до якого вона може почати приєднувати нуклеотиди. Основний принцип ПЛР полягає у тому, що реакція полімеризації (синтезу полімерного ланцюга ДНК із мономерних нуклеотидних ланок) ініціюється специфічними праймерами (короткими фрагментами «затравочної» ДНК) у кожному з безлічі повторюваних циклів. Специфічність ПЛР визначається здатністю праймерів «упізнавати» строго визначену ділянку ДНК і зв'язуватися з нею відповідно до принципу молекулярної комплементарності.

Універсальність, висока чутливість і відносна простота виконання зробили метод ПЛР незамінним для вирішення різноманітних завдань клінічної діагностики, таких як пряме виявлення й ідентифікація збудників захворювань, молекулярне типування і дослідження властивостей патогенних мікроорганізмів, аналіз мутацій, пов'язаних з генетичними захворюваннями у людини, ідентифікація особистості людини тощо.

## ОТРИМАННЯ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ

Ефективність препаратів антитіл, одержаних при імунізації тварин, різна, оскільки в деяких випадках при проведенні імунізації антитілопродукуючі клітини сильніше стимулюються одними детермінантами даного антигену, а в деяких - імунна система активніше відповідає на інші епітопи того ж антигену. Це може впливати на здатність різних препаратів антитіл з'єднуватися з антигенами, оскільки окремі епітопи мають різну ефективність (стимулюючу здатність). Тому у даній партії поліклональних антитіл може міститися мало молекул, спрямованих проти основного епітопа, і в результаті вона буде менш ефективною, ніж попередня. Сьогодні для підвищення

специфічності антитіл використовують моноклональні антитіла.

Відомо, що В-лімфоцити (В-клітини), що синтезують антитіла, не можуть тривалий час культивуватися у культурі *in vitro*. Розв'язання даної проблеми полягало у створенні гібридної клітини. Одержавши генетичну складову від В-клітини, ця гібридна клітина була б здатна продукувати антитіла, а отримавши здатність до поділу від клітин сумісного типу - рости в культурі. Було відомо, що В-лімфоцити іноді перероджуються і стають раковими (мієломними) клітинами, набуваючи здатності до росту в культурі, водночас зберігаючи багато властивостей В-клітин. Отже, було вирішено клітини мієломи, у першу чергу ті, що не виробляють власні антитіла, поєднати з нормальними антитілопродукуючими В-клітинами.

Перший крок у процесі одержання гібридної клітинної лінії, що продукує антитіла однієї специфічності, починається з введення мишам антигену, тобто імунізації. Після циклу імунізації, проведеного протягом кількох тижнів, перевіряють, чи відбувся у тварин розвиток імунної відповіді. Якщо відповідь розвинулася, то у тварин вилучають селезінку, промивають її, подрібнюють і легко струшують для вивільнення поодиноких клітин, серед яких знаходяться й антитілопродукуючі В-клітини. Клітини селезінки змішують з суспензією спеціальних мієломних клітин, дефектних (мутантних) за ферментом гіпоксантингуанін-фосфорибозилтрансферазою (ГДФРТ~). Таку суспензію впродовж кількох хвилин інкубують у 35 %-му розчині поліетиленгліколю, а потім переносять у середовище, що містить гіпоксантин, аміноптерин і тимідин (середовище ГАТ). Оброблення поліетиленгліколем полегшує злиття клітин, проте воно відбувається рідко і є досить випадковим. У суміші є клітини мієломи, селезінки, а також гібридні (ті, що злилися) клітини мієломи-селезінки, мієломи-мієломи, селезінки-селезінки. Однак у середовищі ГАТ ростуть тільки гібридні клітини мієломи-селезінки, усі ж інші типи клітин гинуть. Клітини селезінки і клітини селезінки-селезінки, що злилися, взагалі не ростуть у культурі *in vitro*, а дефектні (мутантні) мієломні клітини ГДФРТ" і клітини мієломи-мієломи, що злилися, не можуть використовувати гіпоксантин як попередник у процесі біосинтезу пуринових основ гуаніну й аденіну, без яких синтез нуклеїнових кислот неможливий. Однак у них є інший альтернативний природний шлях синтезу пуринів - за участі дигідрофолатредуктази, тому до складу середовища і входить аміноптерин, що інгібує активність цього ферменту. Таким чином, мієломні клітини

ГГФРТ - і клітини міеломи-міеломи, що злилися, не можуть синтезувати пурини в середовищі ГАТ і гинуть.

Клітини, селезінки-міеломи, що злилися, ростуть у середовищі ГАТ, оскільки клітини селезінки постачають функціональний фермент ГГФРТ, що надає гібридом! здатності до утилізації екзогенного гіпоксантину середовища, незважаючи на блокування синтезу пуринів за участю дигідрофолатредуктази аміноптерином, та за рахунок здатності клітин міеломи до активного поділу. Тимідин необхідний для усунення блокування в синтезі піримідинів, зумовленого інгібуванням дигідрофолатредуктази. На 10-14-ту добу після злиття клітин у середовищі ГАТ залишаються і ростуть лише злиті гібридами селезінки-міеломи. Потім їх вносять у лунки пластикових планшетів і вирощують на повному культуральному середовищі без ГАТ.

Після злиття й отримання гібридами потрібно провести ідентифікацію (скринінг) гібридних клітинних ліній, що секретують специфічні антитіла до антигену, який було використано для імунізації. Для цього зазвичай проводять скринінг культуральних середовищ, що містять антитіла, наприклад імуоферментним методом. Середовище з тих лунок, у яких є антитілосекретуючі гібридами, відбирають і переносять у лунки іншого мікротитрувального планшету, що були попередньо вкриті шаром молекул антигену-мішені. Якщо в культуральному середовищі є антитіла (перші антитіла), що розпізнають один з епітопів даного антигену, то вони зв'язуються з антигеном і залишаються в лунках після їхнього відмивання. Потім у лунки додають другі антитіла, специфічні до мишачих (перших) антитіл. Вони будуть приєднуватися до будь-яких антитіл, зв'язаних з антигеном.

В імуоферментному аналізі, що найчастіше використовується для скринінгу, до других антитіл (антимишачих) попередньо приєднують фермент, здатний розщеплювати субстрат і перетворювати незабарвлений хромоген (це все компоненти реакційної суміші) на забарвлену сполуку. Зміна кольору в одній із лунок свідчить, що вихідне культуральне середовище містило антитіла, специфічні до даного антигену. Якщо ж таких антитіл у середовищі не було, то другим антитілам ні з чим буде зв'язуватися і вони видаляються при другому відмиванні. Хромоген у таких лунках залишиться незабарвленим.

Середовище лунок вихідного мікротитрувального планшету, яке дає позитивну імунну відповідь (зміна кольору), може містити суміш клітин, що злилися. Для одержання лінії, яка

походить від однієї клітини (клони), клітинну суспензію з таких лунок розводять культуральним середовищем і висівають в інші лунки. Після культивування отриманих клонів середовища знову тестують, визначаючи, яка з клітинних ліній (гібридом) продукує моноклональні антитіла, що розпізнають антиген-мішень. У тому випадку, коли отримують більше однієї специфічної гібридами, проводять подальші дослідження, що дозволяють визначити, чи спрямовані антитіла, які виробляються різними клонами, проти однієї і тієї ж антигенної детермінанти. Кожен клон, що продукує моноклональні антитіла, можна підтримувати в культурі практично нескінченно. Крім того, зразки можна заморозити в рідкому азоті і використовувати їх надалі як джерело клітин.

Іноді гібридами культивують в організмі мишей. Для цього гібридом вводять у черевну порожнину мишей сумісної генетичної лінії, попереднього пригнітивши їхню імунну систему, наприклад, вводячи мінеральне масло. Гібридом (власне злоякісна пухлина) приживається у черевній порожнині миші, починає розмножуватися і синтезувати велику кількість антитіл, які можна виділити з асцитної рідини.

Одержані за гібридомною технологією моноклональні антитіла мають абсолютно однакову специфічність, належать до одного класу, підкласу імуноглобулінів і є практично стандартними препаратами, характеристики яких не залежать від умов утримання тварин, їхніх індивідуальних особливостей та ін. У зв'язку з цим сьогодні моноклональні антитіла широко використовуються як компоненти діагностичних препаратів, нові типи вакцин, для виділення надчистих препаратів деяких речовин та у багатьох інших сферах, про які буде згадано нижче.

## **БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПРОДУКТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ ДЛЯ ВПЛИВУ НА ІМУННУ СИСТЕМУ**

### **Інтерферони**

Інтерферони - родина білків, що були ідентифіковані у риб, птахів, рептилій і ссавців як антивірусні агенти широкого спектру дії. Вони були виявлені при вивченні вірусної інтерференції (тварина, інфікована одним вірусом, є стійкою до інфекції іншим неспорідненим вірусом). Інтерферони впливають на ріст клітин і функції імунної системи. Така дія інтерферонів на клітини зумовлена змінами у метаболізмі, що виникають після зв'язування інтерферону зі специфічним

рецептором. Інтерферони досліджували головним чином як антивірусні агенти. Вони сприяють лікуванню застудних захворювань, гепатитів, оперізувального лишая тощо. Вважається, що при вірусній інфекції клітини синтезують інтерферон і секретують його у міжклітинний простір. Тут молекули інтерферону зв'язуються з рецепторами сусідніх неінфікованих клітин. У клітині під дією інтерферону дерепресується мінімум два гени і починається синтез двох ферментів: протеїнкінази, що фосфорилує рибосомальний білок, та факторів ініціації, необхідних для трансляції. Таким чином, пригнічується трансляція мРНК. Другий фермент каталізує утворення короткого полімеру аденілової кислоти, що активує латентну ендонуклеазу, і це призводить до деградації мРНК як вірусу, так і клітини-господаря. У будь-якому випадку кінцевим результатом дії інтерферону є утворення бар'єру з неінфікованих клітин навколо вогнища вірусної інфекції.

Про ефективність дії інтерферону *in vivo* свідчать досліди із введення інфікованим мишам антисироватки до власних інтерферонів. При цьому летальна доза вірусу була у кілька сотень разів менша, ніж у контрольній групі. Інтерферони важливі не тільки для лікування, а й для профілактики цілого ряду захворювань. Інтерферони як система білків мають значно ширшу біологічну дію. Ферменти, синтез яких індують інтерферони, здатні пригнічувати поділ клітин господаря, модулювати активність інших клітин (наприклад УК), тобто розглядаються як перспективні протипухлинні препарати.

Інтерферони утворюються не лише в організмі людини, а й у інших хребетних. Доведено, що інтерферони є чітко видоспецифічними білками. Тому інтерферони тваринного походження не вдається успішно застосовувати для лікування людини.

Інтерферони продукуються, як правило, у відповідь на дію різних стимуляторів, які називаються індукторами інтерферогенезу. Такими індукторами можуть бути віруси, хімічні речовини, а також імунологічні взаємодії.

За антигенними властивостями інтерферони поділяють на три групи: альфа-лейкоцитарні; бета-фібробластні; гамма-імунні.

У людини формується велика кількість підтипів альфа-інтерферону (нині відомо 23), які є найсильнішими антивірусними агентами, проте ідентифіковано один основний тип людського бета-інтерферону, який є сильним противірусним агентом. Людський гамма-інтерферон має незначну подібність до альфа- і бета-інтерферонів. Він є модулятором імунної відповіді. Природні молекули гамма- і бета-інтерферонів глікозилзовані.

**Альфа-лейкоцитарний інтерферон.** Перші спроби отримати інтерферони здійснено у середині 50-х років ХХ СТ. Тоді з клітин периферичної крові людини, активованих вірусом Сендай, виділили альфа-інтерферон. Однак таким способом можна було отримати невеликі кількості інтерферону, непридатні для широкомасштабного клінічного використання.

Нині застосовують два способи: генно-інженерний, коли альфа-інтерферон експресується культурою клітин *Escherichia coli*, трансформованої вектором, у який вбудовано послідовність ДНК, що кодує зрілий білок, та отримання інтерферонів у культурі лімфобластоїдних клітин. За цим способом грубий матеріал із культури лімфобластоїдних клітин, попередньо активованих вірусом Сендай, очищали на імунохроматографічних колонках (імуноафінна хроматографія з моноклональними антитілами, специфічними до альфа-інтерферону). У зв'язку з використанням для вироблення інтерферону лімфобластоїдних клітин виникло кілька запитань з приводу можливості використання трансформованих клітин у біотехнологічних процесах одержання медичних препаратів. Деякі лінії, особливо отримані з клітин лімфоби Беркіта, є злоякісними. Використання трансформованих клітинних ліній, особливо пухлинного походження, для вироблення медичних препаратів було вперше застосовано саме для виробництва альфа-інтерферону. Питання про можливість використання таких препаратів широко обговорювалося, але нині загально визнано, що перешеплювальні лінії можна використовувати для виробництва фармацевтичних препаратів при достатньому очищенні кінцевого продукту та дотриманні певних вимог. Ці вимоги стосуються клітин, що використовуються як субстрат готового очищеного продукту, та методу очистки. Щодо методу, то має бути доведено, що при цьому елімінуються або інактивуються будь-які дійсно або потенційно шкідливі домішки, які наявні у неочищеному продукті. Особлива увага приділяється контролю у процесі виробництва і стабільності параметрів виробничого процесу. Система GMP (good manufacturing practice) формалізує ці вимоги. Вона застосовується в усіх біологічних виробництвах. Крім того, існує необхідний контроль активності, ідентичності, чистоти, токсичності, пірогенності і стерильності готового препарату.

Особливу увагу при одержанні інтерферонів з культур лімфобластоїдних клітин слід звертати на можливу присутність у готовому продукті таких домішок:

- біологічно активних сторонніх агентів (ДНК, білки, сторонні інфекційні агенти, ендогенні

ретровіруси). Ці агенти можуть бути в неочищеному препараті, але не в готовому продукті;

- матеріалів з культурального середовища, речовин, які використовують для підсилення продукції інтерферону, індукторів інтерферогенезу, а також речовин, що використовувались для очищення препарату.

Одразу після отримання перших партій штучного альфа-інтерферону почались дослідження щодо можливості його використання для лікування онкологічних захворювань.

**Бета-фібробластний інтерферон** синтезується фібробластами, які легко підтримувати в культурі, проте вони ростуть лише у вигляді моношару. Для збільшення площі поверхні у ферментери вносять спеціальні гранули субстрату. Також досліджували можливість використання фібробластного інтерферону для лікування множинної мієломи, раку молочної залози.

**Гамма-імуний інтерферон** отримують при культивуванні Т-лімфоцитів людини за наявності мітогенів. Ця технологія також є традиційною, її характеризує низький вихід, висока вартість очищення та низька чистота одержаних препаратів. Усі надії на масштабне виробництво інтерферонів покладалися на технологію рекомбінантних ДНК.

### **Біосинтез інтерферонів у клітинах генетично модифікованих організмів**

Клонувати гени інтерферону було значно складніше, ніж гени деяких білків (наприклад інсуліну), у перших успішних експериментах, проведених за допомогою генної інженерії. Послідовність амінокислот перших рекомбінантних молекул (інсулін, гормон росту) була відома, тоді як щодо інтерферону такі відомості були відсутні. Тому почали пошук можливих шляхів одержання інтерферону на основі його противірусної активності.

У 1989 р. Є. Гілберту і К. Вайсману (Бостон, США) вдалося отримати інтерферон людини у генетично модифікованих мікроорганізмах. Цей дослід ґрунтувався на спостереженні, що при ін'єкції мРНК з інтерферонпродукуючих лімфоцитів у гігантські ооцити *Xenopus* в останніх синтезується інтерферон. Було визначено розмір матричної РНК альфа-інтерферону. Для цього полі-А-вмісну РНК з інтерферонпродукуючих клітин фракціонували, окремі фракції вводили в ооцити і визначали противірусну активність білкових продуктів. Активність була визначена при ін'єкції в ооцити 12S РНК, і саме цю фракцію у подальшому використали для конструювання бібліотеки кДНК в плазміді рBR322. Було перевірено близь-

ко 20 000 клонів *E. coli*, отриманих при трансформації плазмідами бібліотеки, та ідентифіковано послідовності шляхом гібридизації індивідуальних клонів кДНК з альфа-інтерфероновою мРНК методом соузерн-блотингу. Спочатку виділяли великі групи, з яких потім селектували менші підгрупи у межах даного клону. Для доведення того, що кДНК кодує саме інтерферон, її вбудовували в бактерію і реєстрували противірусний ефект її білкового екзопродукту. Одразу після одержання рекомбінантного альфа-інтерферону тими ж методами було клоновано кДНК бета- та гамма-інтерферонів.

мРНК альфа-інтерферону складається з 836 нуклеотидів, серед яких 72 і 203 припадають на 5'- та 3'-ділянки, що не транскрибуються; 63 нуклеотиди кодуєть лідерний пептид, що відповідає за секрецію інтерферону з клітин. 498 нуклеотидів кодуєть 166 амінокислотних залишків молекули інтерферону.

мРНК бета-інтерферону складається з 865 нуклеотидів. 242 нуклеотиди містяться на 3'-кінці, що не транскрибуються. Лідерна послідовність складається з 23 амінокислот (69 нуклеотидів). 498 нуклеотидів кодуєть 166 амінокислотних залишків молекули бета-інтерферону. Встановлено, що альфа- та бета-інтерферони близькі за нуклеотидним складом. Гени альфа-інтерферону належать до великої генної родини, що кодує різні субтипи альфа-інтерферону, а також його неактивні форми. Було клоновано лише один ген бета-інтерферону. Усі гени і псевдогени альфа-інтерферону, а також єдиний ген бета-інтерферону локалізовані у 9-й хромосомі. Деякі з них тісно зчеплені між собою. Жоден із генів альфа-інтерферону і ген бета-інтерферону не містять інтронів. Бета- і деякі альфа-інтерферони глікозильовані.

У перших успішних генно-інженерних експериментах синтез інтерферонів був малоактивний. Підвищити активність можна було за рахунок використання інших векторів або потужніших промоторів. Це вдалося здійснити, використовуючи конструкції, що включали промотор лак-оперону. Продукція підвищилась у десятки разів, що дало змогу отримувати 1 мг інтерферону з 1 л культури. Одразу після вдалих експериментів з *E. coli* були використані еукаріотичні моделі - дріжджі роду *Saccharomyces*. Саме на прикладі альфа-інтерферону показана можливість експресії генів людини у клітинах дріжджів. При трансформації *Saccharomyces* використали конструкцію, що здатна ефективно реплікуватися як в клітинах дріжджів, так і в бактеріальних клітинах - так звані човникові вектори. У даному експерименті ген альфа-інтерферону об'єднували з геном алко-



голь-дегідрогенази дріжджів, що має потужний промотор. Для дріжджової системи характерний дуже високий вихід. Крім того, глікозилювання та дозрівання молекул білків у дріжджів відбуваються за тими ж принципами, що й у інших еукаріотів. Це особливо важливо для одержання рекомбінантних білків людини.

**Клонування генів гамма-інтерферону.** Клонування генів гамма-інтерферону виявилось найскладнішим. По-перше, було важко індукувати продукування гамма-інтерферону. Препарати мРНК з селезінки людини, в яких за допомогою бактеріального токсину було індуковано продукування гамма-інтерферону, розділяли за розмірами і вводили різні фракції в ооцити *Xenopus*. Було отримано 18S мРНК, продукт трансляції якої мав антивірусну активність. На її основі було створено кДНК, яку ввели в *E. coli* у складі космідного вектора. Рекомбінантні молекули розмножували в клітинах *E. coli* і добивалися їх експресії. Клоні використовували для селекції відповідного хромосомного гена в бібліотеці кДНК людини у векторах на основі фага лямбда. Таким чином, було ідентифіковано і секвеновано ген гамма-інтерферону. Він має 3 інтрони та 4 екзони, є унікальним і міститься у єдиній копії в 12-й хромосомі. Відсутність інтронів у генах альфа- і бета-інтерферонів має велике значення, оскільки вони синтезуються в інфікованих вірусом клітинах. Вони не залежать від сплайсингу, який в інфікованій клітині може бути порушений.

При одержанні гамма-інтерферону встановлено, що він ефективно продукується рекомбінантними клітинами (*E. coli* - 25 000 од./л, дріжджі - 1 000 000 од./л). На сьогодні відомі роботи із синтезу гамма-інтерферону в клітинах мавп, однак зі значно меншим виходом.

### **Препарати, що використовуються для пригнічення небажаної імунної відповіді**

Існує ціла група препаратів, одержаних у біотехнологічних процесах, за допомогою яких можна регулювати чи контролювати імунну відповідь, як у випадку супресії небажаної імунної відповіді, так і стимулювання захисної імунної дії при деяких хворобах.

З небажаною дією імунної системи ми стикаємося у разі аутоімунних хвороб, відторгнення трансплантатів і алергії. Існування зазначених явищ вимагає розробки нових підходів до удосконалення терапії, відповідної до кожного з вказаних патологічних проявів.

Практично всі сучасні засоби лікування імунних порушень мають емпіричне походження. За-

стосування імунодепресантів базується на перевірці великої кількості натуральних та синтетичних препаратів. Медикаменти, що нині застосовуються для супресії імунної системи, можна поділити на три групи: 1) сильнодіючі протизапальні засоби родини кортикостероїдів, такі як преднізолон; 2) цитотоксичні засоби, такі як азатіоприн та циклофосфамід; 3) метаболіти грибів та бактерій, такі як циклоспорін А, FK506 (такролімус), ранаміцин (сіролімус), що блокують передачу сигналів у Т-лімфоцитів. Ці препарати мають широкий спектр дії та інгібують захисні функції імунної системи так само успішно, як і шкодять їй. Наприклад, дуже поширеним ускладненням імуносупресивної терапії є опортуністичні інфекції.

Ідеальний імунодепресант має діяти саме на ту специфічну ділянку імунної системи, яка спричиняє ушкодження тканин. Парадоксально, але антитіла самі по собі завдяки своїй винятковій специфічності можуть сприяти більшій ефективності терапевтичного інгібування специфічної імунної відповіді. Надзвичайно перспективними є такі експериментальні підходи до корекції специфічної імунної відповіді, як маніпуляції локальним оточенням цитокінів чи маніпуляції антигенами таким чином, щоб уникнути розвитку патологічного процесу.

**Кортикостероїди** - сильнодіючі протизапальні речовини, що широко застосовуються для супресії шкідливої імунної відповіді на аутоалерген чи звичайний алергетик, а також під час індукції імунної реакції при трансплантації. Кортикостероїди - фармакологічні похідні родини глюкокортикоїдів, які належать до стероїдних гормонів. Одним із найбільш уживаних з них є преднізолон - синтетичний аналог кортизону, що діє через інтрацелюлярні рецептори, експресовані на поверхні переважної більшості клітин тіла. При приєднанні гормону ці рецептори змінюють транскрипцію специфічних генів. Експресія більш ніж 1 % генів може регулюватися кортикоїдами, які можуть або підвищувати, або, що менш вірогідно, знижувати їх експресію. Фармакологічний вплив кортикостероїдів залежить від експозиції глюкокортикоїдних рецепторів до певних концентрацій лігандів. Ненормально високий рівень зв'язування глюкокортикоїдних рецепторів спричинює надмірну глюкокортикоїдопосередковану відповідь, яка має як позитивний, так і токсичний ефект.

Кортикостероїди, що застосовуються для лікування алергій, аутоімунних хвороб та при трансплантації, часто використовують у комбінації з іншими ліками для досягнення оптимальної дози та зведення токсичних проявів до мінімуму. При

аутоімунних станах та відторгненні алотрансплантату кортикостероїди звичайно комбінують з цитотоксичними імуносупресивними препаратами.

**Цитотоксичні препарати.** Найбільш широко вживаними цитотоксичними препаратами є такі імуносупресори, як азатіоприн та циклофосфамід. Обидва препарати порушують синтез ДНК, і їх фармакологічна дія поширюється на тканини, клітини якої активно діляться. Створені вони були для терапії раку, але після ряду спостережень з'ясувалося, що вони справляють цитотоксичний вплив і на лімфоцити, що поділяються; тому вони так само добре можуть діяти і як імуносупресори. Використання цих сполук обмежене рівнем токсичного впливу на тканини тіла, які мають властивість неперервного клітинного поділу. Вказаний вплив полягає у зниженні імунної функції, а також у виникненні анемії, лейкопенії, тромбоцитопенії, ушкодженні інтестинального епітелію, втраті волосся, ураженні або пошкодженні плоду. Через свою токсичну дію згадані препарати використовуються у високих дозах лише тоді, коли метою терапії є елімінація усіх лімфоцитів, що поділяються, наприклад, при терапії майбутніх реципієнтів кісткового мозку. У низьких дозах вони застосовуються у комбінації з іншими препаратами, такими як кортикостероїди, для уникнення небажаної імунної відповіді. Азатіоприн *in vivo* перетворюється на антагоніста пурину, який включається до синтезу нуклеїнових кислот і є токсичним для поділу клітин. Ця сполука перетворюється на 6-тіоінозинову кислоту, що конкурує з інозинмонофосфатом, тим самим блокуючи синтез аденозину монофосфату та гуанозинмонофосфату, що в свою чергу блокує синтез ДНК. Азатіоприн менш токсичний, ніж циклофосфамід, що алкілує ДНК. Циклофосфамід належить до родини азотних сполук, які насамперед були створені як хімічна зброя.

**Циклоспорин А, FK506 (такролімус) та рапаміцин (сіролімус).** На сьогодні для імуносупресії у пацієнтів з трансплантатами, наприклад нирок, застосовують і менш шкідливі для організму, порівняно з цитотоксичними, препарати. Успіхи біотехнології та вивчення продуктів-метаболітів бактерій і грибів спричинили розробку великої кількості важливих фармацевтичних препаратів. Серед них - імуносупресанти циклоспорин А та FK.506, або такролімус, що нині широко використовуються при трансплантації.

Циклоспорин А - циклічний декапептид, отриманий з ґрунтових грибів *Tolypocladium inflatum*. FK506, відомий як такролімус, є макролідною сполукою з філаментів бактерії *Streptomyces tsukubaensis* (макроліди - власне антибіотики, що

містять багато лактонових кілець, до яких приєднано один чи більше деоксіцукрів). Інший макролід *Streptomyces*, названий рапаміцин чи сіролімус, на сьогодні проходить випробовування у клінічних тестах і, можливо, незабаром теж буде застосовуватися на практиці для попередження відторгнення трансплантатів. Рапаміцин отриманий з *Streptomyces hydropscopicus*. Усі три сполуки виявляють свою фармакологічну дію через зв'язування родини внутрішньоклітинних білків, відомих як імунофіліни, формуючи комплекс, який порушує сигнальні шляхи, важливі для клональної активації лімфоцитів. Циклоспорин А або такролімус блокує Т-клітинну проліферацію через зменшення експресії кількох генів цитокінів, які в нормі є індукованими при активації Т-клітин. До них належить інтерлейкін-2, продукування якого Т-лімфоцитами є важливим ростовим сигналом для Т-клітин. Ці препарати інгібують проліферацію Т-клітин у відповідь на антигени або алергенні клітини та інтенсивно застосовуються у медичній практиці для попередження відторгнення пересаджених аlogenних органів. Хоча головний імуносупресивний ефект обох препаратів, імовірно, інгібуює проліферацію Т-клітин, вони мають великий спектр інших імунологічних ефектів, деякі з них можуть бути важливими для фармакології.

Циклоспорин А і такролімус є ефективними препаратами, проте їх застосування також супроводжується певними проблемами. По-перше, так само як і цитотоксичні агенти, вони повністю пригнічують імунну реактивність організму. Лише варіювання дозами дає змогу контролювати ступінь їх імуносупресивної дії: під час пересадки потрібні високі дози, але, коли тканина вже прижилася, доза має бути знижена для того, щоби з'явилася звичайна захисна функція імунної системи і водночас підтримувалась необхідна супресія імунної відповіді на пересажену тканину. Цей складний баланс досягається не завжди. До того ж, оскільки імунофіліни виявлені у багатьох клітинах, припускають, що вказані препарати впливають і на багато інших тканин. Циклоспорин А і такролімус є токсичними для нирок та інших органів. Крім цього, лікування цими препаратами є дорогим, оскільки вони є комплексом природних сполук, які необхідно приймати впродовж тривалого часу. Це є причиною вдосконалення згаданих сполук, заміни на дешевші та безпечніші. Однак нині вони є широкоживаними у клініці трансплантації, а також проходять тестування на багатьох аутоімунних захворюваннях. Механізм дії циклоспорину А і такролімусу на сьогодні досить добре вивчений.

**Антитіла проти молекул клітинної поверхні.** Цитотоксичні препарати вбивають усі клітини, що проліферують, і тому впливають на всі типи активованих лімфоцитів та інші клітини, що діляться. Циклоспорин А, такролімус та рапаміцин діють більш селективно, однак все одно пригнічують адаптивну імунну відповідь. На відміну від них вплив антитіл на імунну систему більш специфічний і менш токсичний. Потенціальні можливості антитіл у вилученні небажаних лімфоцитів досліджено на прикладі антилімфоцитарного глобуліну, отриманого з імуноглобуліну коней, імунізованих лімфоцитами людини. Такий препарат багато років застосовували для лікування гострого відторгнення тканин. Однак антилімфоцитарний глобулін нерозрізняє нормальні лімфоцити і ті, що здатні до небажаної імунної відповіді. Більше того, імуноглобулін коней є сильним антигеном для людини, і високі дози, що застосовуються у терапії, дуже часто призводять до розвитку порушень, спричинених утворенням імунних комплексів імуноглобуліну коня та антиконячих антитіл. Проте антилімфоцитарний глобулін застосовується у практиці для терапії гострого відторгнення тканин.

**Імуносупресорні моноклональні антитіла** діють за одним з двох механізмів. Деякі моноклональні антитіла запускають деструкцію лімфоцитів *in vivo* і належать до тих, що знищують; інші - не знищують, а блокують функції своїх білків-мішеней, не руйнуючи клітини, які їх експресують. Щоби з'ясувати здатність інгібувати відторгнення пересаджених тканин та впливати на перебіг аутоімунних хвороб було протестовано багато антитіл. При цьому дослідники зустрілися з проблемою одержання моноклональних антитіл (власне мишачі антитіла), придатних для терапії людей. Головною перешкодою у терапії людини моноклональними антитілами є те, що ці антитіла отримують переважно при використанні клітин (В-лімфоцитів та мієломи) миші, і клітини людини, в свою чергу, утворюють антитіла у відповідь на антитіла миші. Це призводить не тільки до блокування дії антитіл миші, а й спричинює алергічну реакцію, що може закінчитися анафілактичним шоком, який вимагає негайного лікування. Більше того, навіть після одного випадку анафілаксії подібна терапія будь-якими моноклональними антитілами миші вже неможлива. Цієї проблеми, в принципі, можна уникнути завдяки створенню антитіл, які б не розпізнавалися імунною системою людини як чужорідні. Існує три біотехнологічні стратегії вирішення зазначеної проблеми. Перший підхід - це клонування V-ділянки імуноглобулінів людини

у бібліотеці та проведення їх селекції. Отримані таким шляхом антитіла є повністю людськими за походженням. Другий підхід полягає у тому, що відсутні у миші ендогенні гени імуноглобулінів можуть бути сконструйовані трансгенетично для важких та легких ланцюгів імуноглобулінів людини з використанням штучних хромосом дріжджів. В-клітини цих мишей мають рецептори, розкодовані через гени імуноглобулінів людини, але не толерантні до більшості білків людини. Саме тому можливо індукувати у цих мишей продукцію МОноклональних антитіл людини проти детермінант на клітинах людини або її білків. Третій підхід полягає в можливості пересадити комплементарно детермінуючі гіперваріабельні ділянки моноклональних антитіл мишей, які формують антигензв'язувальні петлі у молекулі імуноглобуліну людини. Цей процес відомий як *гуманізація* антитіл. Завдяки антигензв'язувальній специфічності, детермінованій гіперваріабельними ділянками, а також тому, що загалом остови антитіл людини і миші дуже подібні, стає можливим досягти продукції моноклональних антитіл, які антигенно ідентичні імуноглобулінам людини, але зв'язуються з такими ж антигенами, як і МОноклональні антитіла миші. Такі рекомбінантні антитіла значно менш імуногенні для людини, ніж моноклональні антитіла миші, від яких вони походять. Саме через значно менший ризик розвитку анафілаксії вони можуть застосовуватися для лікування людей.

Аутоімунні хвороби визначаються лише тоді, коли імунна система вже почала ушкоджувати власні тканини або порушувати специфічні функції організму. На сьогодні існує три підходи у лікуванні цих хвороб. По-перше, протизапальна терапія, що може зменшити пошкодження тканин, викликані аутоімунною відповіддю; по-друге, імуносупресивна терапія, метою якої є зниження аутоімунної відповіді; по-третє, терапія має бути спрямована саме на ту систему органів, яка уражена захворюванням, наприклад діабет, що спричинюється імунною атакою клітин підшлункової залози і лікується інсуліном. Протизапальна терапія аутоімунних хвороб полягає у застосуванні антицитокінових антитіл; анти-TNF-а антитіла викликають значну тимчасову ремісію при ревматоїдному артриті. Антитіла можуть також бути застосовані для блокування міграції клітин до ділянок запалення, наприклад, анти-CD 18 антитіла запобігають щільній адгезії лейкоцитів до судинного ендотелію та знижують ефект запалення у дослідках на тваринних моделях хвороби.

Кінцева мета імунотерапії аутоімунних захворювань - це специфічне втручання задля віднов-

лення толерантності до аутоантигенів. Існує два експериментальні підходи до вирішення цього питання.

Перший підхід полягає у блокуванні специфічної відповіді на аутоантигени. Один із шляхів досягнення цього - ідентифікувати специфічні рецептори Т-клітин або молекули імуноглобулінів, що їх несуть на собі лімфоцити, які спричинюють захворювання, а потім зробити на них мітку антитілами, спрямованими проти ідіотипічних детермінант на Т-клітинах або імуноглобулінах. Інший шлях полягає в ідентифікації певних молекул ГКГ (МНС) першого чи другого класу, що здатні презентувати білки аутоантигенів та інгібувати їх антигенпрезентуючу функцію вибірково з антитілами або ж блокуючими білками.

Другий підхід до лікування аутоімунних захворювань - це спроба перетворити патологічну аутоімунну відповідь на нешкідливу. Цей підхід є експериментальним, оскільки толерантність до тканинних антигенів не завжди залежить від відсутності реакції Т-клітин. Навпаки, вона може активно підтримуватися цитокінами, що їх секретують Т-клітини, супресуючи шкідливу запальну Т-клітинну відповідь. Набір цитокінів, експресованих Т-лімфоцитами, є критичним у визначенні стану збереження та прояву аутоімунних хвороб; маніпулювання експресією цитокінів відкриває шлях до їх контролю. Існує багато технік, відомих під загальною назвою «імуна модуляція», які здатні змінити експресію цитокінів Т-лімфоцитами. Вони включають маніпуляцію цитокіновим оточенням, у якому активізуються Т-клітини, або маніпуляцію шляхом презентування антигену, оскільки було досліджено вплив вказаних факторів на диференціацію та цитокін-секретуючу функцію активованих Т-клітин.

Слід враховувати, що жоден із вказаних методів терапії досі не випробувано на людині, і більшість із них потребує знання конкретного антигену. З цієї причини та через відносну неефективність стосовно сформованої імунної відповіді можливості згаданих підходів на тваринних моделях буде важко реалізувати в клінічних умовах.

### **Препарати, що використовуються для підсилення імунної відповіді. Вакцини**

Інфекційні хвороби були і залишаються практично головною причиною смертності. Важливим внеском у підтримання здоров'я суспільства за останні 100 років було введення у практику санітарних норм і вакцинації, які значно знизили рівень смертності від інфекційних хвороб.

Сучасна імунологія розвинулась на базі успіху Е. Дженнера і Л. Пастера у вакцинації проти віспи та холери. Величезним її тріумфом є глобальне викорінення натуральної віспи, оголошене Всесвітньою організацією охорони здоров'я у 1980 р. Сьогодні триває глобальна компанія зі знищення поліомієліту.

Індукування імунності проти іфекційних агентів можна досягнути кількома шляхами. Найдавніший підхід полягав в умисному викликанні слабкої інфекції при введенні незміненого патогену. Це був принцип варіоляції, коли інокуляція малої кількості сухого матеріалу з пустул віспи викликала слабку інфекцію, що супроводжувалася тривалим періодом стійкості до виникнення повторного захворювання. Однак не завжди при варіоляції інфекція, що виникла, була слабкою: летальні випадки віспи становили близько 3 %, що не відповідає сучасним критеріям безпеки. Досягненням Е. Дженнера було усвідомлення того, що інфекція, яку викликає коров'ячий аналог віспи, вакцина (від лат. *vacca* - корова), названа коров'ячою віспою, може сформувати захисну реакцію проти віспи у людей без ризику важкого перебігу захворювання. Він назвав цей процес вакцинацією, а Л. Пастер на його честь поширив цей термін на усі методи стимулювання захисту від інших інфекційних агентів. Після вакцинації людина не хворіє природною формою захворювання, у неї формується тільки нетривала й обмежена інфекція, але антигени, що вона містить, стимулюють імунну відповідь, яка має перехресну реактивність з антигенами віспи, і тому виникає стійкість до людської форми захворювання.

Так сформувалися головні принципи безпечної та ефективної вакцинації. На початку ХХ СТ. існувало два емпіричні напрями розроблення вакцин:

- одержання атенуйованих організмів зі зниженою патогенністю, що могла б стимулювати протективну імунність;
- створення вакцин на основі вбитих мікроорганізмів та попередньо очищених компонентів мікроорганізмів, які могли б бути такими ж ефективними, як і цілий живий організм, тому що будь-яка жива вакцина здатна викликати летальну системну інфекцію, наприклад при імуносупресії.

На сьогодні імунізація вважається настільки безпечною та важливою, що у більшості країн практично все дитяче населення вакцинується (шляхом щеплення) проти вірусів кору, епідемічного паротиту та поліомієліту атенуйованими вакцинами, а проти таких хвороб, як правець (викликається *Clostridium tetani*), дифтерія (викликається

*Corynebacterium diphtheriae*) та кашлюк (викликається *Bordetella pertussis*) – інактивованими токсинами або анатоксинами. Нещодавно почали застосовувати вакцини проти *Haemophilus*, одного з агентів, що викликає менінгіт, а також проти вірусу гепатиту В.

Однак все ще залишається багато хвороб, проти яких не існує ефективних вакцин. Крім того, навіть якщо загальнозживані вакцини можуть бути ефективно застосовані у розвинутих країнах, технічні та економічні проблеми можуть завадити повсюдному застосуванню їх у країнах, що розвиваються, і де смертність від цих хвороб зберігається на високому рівні. Тому розвиток вакцинації залишається важливою метою імунології, і друга половина минулого століття була присвячена пошуку більш раціонального підходу, базованого на детальному вивченні молекулярної патогенності мікроорганізмів, аналізі захисної реакції господаря на патогенний організм та розумінні регуляції імунної системи при генерації ефективної Т- та В-імунної відповіді.

Ефективність вакцинації залежить від природи збудника інфекції та реакції на нього імунної системи людини. Антитіла забезпечують найважливіший механізм захисту господаря від позаклітинних мікроорганізмів (наприклад основної маси бактерій), тоді як для контролю за внутрішньоклітинними мікроорганізмами (вірусами, деякими найпростішими) також важливою є відповідь Т-лімфоцитів. Ідеальна вакцинація забезпечує захист господаря у ділянці вхідних воріт інфекції, тому стимуляція місцевого імунітету є важливим моментом вакцинації проти тієї великої кількості мікроорганізмів, які проникають крізь слизові оболонки.

Для формування ефективного захисту проти деяких мікроорганізмів необхідна присутність антитіл, синтез яких було індуковано попередньо. Наприклад, клінічні прояви правця та дифтерії цілком обумовлені дією надзвичайно сильних екзотоксинів. Наявність у крові антитіл проти цих бактеріальних екзотоксинів необхідні для забезпечення захисту від хвороб. Антитіла також потрібні для захисту від деяких внутрішньоклітинних патогенів, таких як вірус поліомієліту, що інфікує чутливі клітини господаря за дуже малий відрізок часу після потрапляння в організм. Вірус погано контролюється Т-лімфоцитами, а тому необхідна його елімінація ще до потрапляння у клітину.

Імунна відповідь на інфекційні агенти звичайно складається з синтезу антитіл, спрямованих на велику кількість епітопів, та тільки деякі з цих антитіл є протективними і забезпечують захист. Наявність особливих Т-клітинних епітопів у

складі антитіл також може впливати на природу імунної відповіді. Наприклад, домінуючими є епітопи, що розпізнаються Т-клітинами після вакцинації респіраторним синцитіальним вірусом. Вони спричинюють сильну запальну реакцію і нейтралізацію антитіл, тим самим викликаючи патологію за відсутності захисної функції.

Таким чином, ефективна вакцина повинна приводити до генерації антитіл та специфічної активності Т-клітин, спрямованих на визначений епітоп інфекційного агента. Для деяких сучасних вакцинних препаратів, у яких використовуються тільки один чи кілька епітопів, цей фактор особливо важливий. Існує ще кілька важливих умов, яким повинна відповідати дієва вакцина. По-перше, вона має бути безпечною. Вакцину потрібно дати великій кількості людей, і порівняно невелика кількість з них може захворіти або інколи й загинути від хвороби, яку вакцина мала б попереджувати. Це все означає, що вакцина не може мати навіть низький рівень токсичності. По-друге, вакцина має бути спроможна викликати захисний імунітет у значного відсотка населення, щодо якого була застосована. По-третє, оскільки неможливо охопити вакцинацією велику або розосереджену сільську популяцію, ефективна вакцина повинна стимулювати виникнення тривалої імунної пам'яті. Це означає, що вакцина повинна стимулювати В-, і Т-лімфоцити. По-четверте, вакцина має бути дешева, особливо якщо застосовується на великих популяціях. Вакцини є одним з найбільш рентабельних з точки зору їх вартості заходів у збереженні здоров'я, проте ця перевага зникає, коли зростає собівартість дози.

Ефективна програма вакцинації забезпечує імунітет населення через зниження кількості чутливих членів популяції: природний резервуар інфікованих індивідів у популяції знижується, отже, знижується і вірогідність передачі інфекції. Таким чином, навіть невакциновані члени популяції можуть бути захищені від інфекції, якщо більшість населення вакцинована.

Вакцина вважається нешкідливою, якщо у щепленого організму не з'явилися патологічні симптоми, загальний стан не погіршився і специфічний збудник, який може інфікувати нещеплених і викликати у них захворювання, не виділяється. Нешкідливість вакцин оцінюється за такими параметрами:

- живі та вбиті вакцини мають бути без будь-яких біологічних контамінантів і непередбачених технологією вірусних продуктів;
- жоден тип вакцинних препаратів не повинен містити токсичні речовини вірусного або клітинного походження;

- живі вакцини мусять бути достатньо імуногенними без проявів клінічних та інших сторонніх реакцій.

Основні тести, що використовуються для оцінки нешкідливості вакцин:

- застосування високих доз у ветеринарії і апробація вакцин для людей на тваринах;
- пірогенний контроль *in vitro* або *in vivo*;
- дослідження бактеріальної контамінації вбитих вакцин;
- ідентифікація сторонніх агентів у різних системах *in vitro* та *in vivo*, аналіз нешкідливості в умовах епідеміологічного польового досліджу;
- поряд з традиційними методами контролю за біологічними та хімічними параметрами, вивчення метаболізму та виведення з організму вакцин на основі полімерних імуностимуляторів.

Існує поділ на традиційні та нетрадиційні вакцини.

**Традиційними** є такі типи вакцинних препаратів: живі, інактивовані, хімічні та кон'юговані. Всі традиційні вакцини - це, як правило, суміш антигенного матеріалу та цільових домішок - ад'юванта, консерванта, стабілізатора тощо.

**Жива вакцина** - це живі штами збудників у певному стабілізаторі (ад'юванти та консерванти відсутні). Загальними ознаками опису живих вакцин є опис усіх компонентів як простої механічної суміші із зазначенням використаних штамів та їх кількісного вмісту. Титр антигену - умовний показник у серологічній реакції. Живі штами можна також ідентифікувати, використовуючи методи чистих культур, фізико-хімічні методи. Є специфічні ознаки, характерні тільки для штаму, що входить до складу вакцини: антигенна структура, імуногенність, специфічна нешкідливість, залишкова вірулентність, онкогенність, серологічні властивості та стабільність атенуації. Вакцини можна поділити на моно- і полівалентні залежно від того, від скількох хвороб вакцина захищає. Полівалентні вакцини є особливо цінні, бо під час використання одночасно кількох вакцин спостерігається синергізм їх дії.

**Інактивовані вакцини** належать до композицій, одержаних шляхом змішування таких компонентів: штам збудника, інактивованого хімічним або фізичним способом; засоби, що підвищують імуногенні властивості основного компонентна (консервант та ад'ювант). Для характеристики інактивованих вакцин використовують ті самі принципи, що й для живих, але необхідно вказувати і тип консерванта (особливо, коли вдаються до хімічної інактивації патогену) та ад'юванта.

**Хімічні вакцини** - певні композиції антигенних матеріалів, одержаних тим чи іншим способом із збудника та цільових домішок. Антигенний матеріал може бути одержаний зі збудника при певній обробці або з культурального середовища (токсин). Як правило, він є складним молекулярним комплексом часто з невідомим складом і структурою. Специфічна ідентифікація цих вакцинних препаратів забезпечується застосуванням серологічних методів. Вони дають можливість ідентифікувати окремі компоненти антигенної суміші. Для характеристики використовують також інші ознаки, наприклад: призначення антигену (для профілактики якого захворювання використовується), джерело виділення, метод виділення, метод очистки. У повному паспорті таких вакцин має бути вказана природа виділеного антигену, ознаки, що характеризують якість препарату: антигенна активність, серологічна активність, імуногенність (здатність створювати гуморальний та клітинний імунітет). Протективний ефект антигену - ще одна обов'язкова ознака. Крім цього, зазначають їх токсичність, стійкість до протеолізу, термолабільність, імунохімічні або інші засоби контролю гомогенності та пірогенності.

**Кон'юговані вакцини** - це різновид хімічних вакцин. Вони вирізняються принципом сумісництва компонентів у складі препарату. У хімічних вакцинних препаратах антигенний матеріал і ад'ювант - це проста механічна суміш компонентів, а в кон'югованих вакцинах антигенну молекулу ковалентним зв'язком приєднують до імуностимулюючого носія. Імуностимулюючий носій - високомолекулярні полімери (білки, полісахариди, синтетичні полімери). Кон'юговані вакцини можна включити в групу іммобілізованих біологічно активних речовин, їхніми ознаками є: якісний склад, кількісний склад, хімічний зв'язок між компонентом, призначення та корисні властивості. Конструювання кон'югованих вакцин відбувається на хімічній основі. Нині вдосконалюють технології, спрямовані на стабілізацію антигенів, вибір носіїв, методи ковалентного (або іншого) зв'язування носіїв.

**Нетрадиційні вакцини** - це принципово нові вакцинні препарати, розроблені на основі передових технологій з урахуванням механізмів імунної відповіді. Мішенню дії таких вакцин є конкретна ланка імунної відповіді. Сьогодні ці вакцини перебувають ще на стадії дослідження. До них належать такі типи: синтетичні, антиідіотипічні, генно-інженерні.

**Синтетичні вакцини** - індивідуальний макромолекулярний комплекс зі встановленою струк-

турою. Ці вакцини називаються за хімічною номенклатурою, наводиться також опис усіх структурних радикалів і груп та їх значення, основні корисні властивості (насамперед імуногенність).

**Антиідіотипічні вакцини** є практично моноклональними антитілами, для яких характерна певна сфера застосування. На сьогодні запатентовано всього кілька препаратів. Практично такими ж експериментальними є препарати *ДНК-вакцин*.

**Генно-інженерні вакцини** використовують при генно-інженерному конструюванні живих рекомбінантних вакцинних препаратів; генно-інженерному вдосконаленні традиційних вакцинних препаратів; генно-інженерному одержанні конкретних поліпептидів, що мають ту чи іншу антигенну специфічність.

Історія вакцинації проти бактерії, яка викликає кашлюк, *Bordetella pertussis*, доводить необхідність удосконалення і розповсюдження ефективних вакцин. Цільноклітинна вакцина проти кашлюку може мати побічні ефекти, як правило, це: почервоніння, біль та припухлість у місці ін'єкції; рідше - підвищення температури та невпинний плач, у виняткових випадках - судоми та нетривала сонливість або ж вона взагалі не діє. Усвідомлення медиками того, що цільноклітинна вакцина проти кашлюку не є достатньо безпечною, стало значним стимулом для пошуку нешкідливої вакцини. Вивчення природної імунної відповіді на *Bordetella pertussis* показало, що ця інфекція індукує синтез антитіл проти чотирьох компонентів бактерії - кашлюкового токсину, філаментного гемаглютинину, пертактину та антигенів фімбрії. Імунізація мишей цими очищеними антигенами захищала їх від ураження кашлюковою інфекцією. Це підштовхнуло до пошуку безклітинних кашлюкових вакцин, які містили би очищений кашлюковий анатоксин, що є токсином, інактивованим хімічно, наприклад перекисом водню або формальдегідом, або ж токсином, що було змінено шляхом генно-інженерних маніпуляцій. Деякі вакцини також містять філаментний гемаглютинін, пертактин та антигени фімбрії. Дослідження показали, що ці вакцини такі ж ефективні, як і цільноклітинні, але не мають побічних ефектів своїх попередників. Тому останнім часом все активніше розробляються безклітинні вакцинні препарати.

Безклітинні вакцини є незаперечно безпечнішими, ніж вакцини, що базуються на цілих організмах, але повної ефективності вакцини неможливо досягти, використовуючи тільки ізольовані частини мікроорганізмів. Тепер вже зрозуміло, що для ініціації імунної відповіді необхідно активувати більше ніж один тип клітин. У результаті було створено кон'юговані вакцини.

Проте навіть кон'юговані вакцини не завжди є достатньо імуногенними: більшість із них потребує додавання ад'ювантів - субстанцій, що підсилюють імуногенність антигенів. Вважається, що багато або навіть усі ад'юванти діють на антигенпрезентуючі клітини, що засвідчує важливість цих клітин у ініціації імунної відповіді.

Наприклад, анатоксин правця за відсутності ад'юванта не є імуногенним, і тому вакцини анатоксину правця часто містять гідроксид алюмінію, до якого ковалентно приєднані йонними зв'язками молекули анатоксину, що селективно стимулюють відповідь антитіл. Кашлюковий токсин, що продукується *Bordetella pertussis*, сам має ад'ювантні властивості, і коли застосовується у суміші з правцевим та дифтерійним анатоксином, не тільки вакцинує проти коклюшу, а й діє як ад'ювант для двох інших анатоксинів. Ця суміш являє собою потрібну вакцину АКДП, якою вакцинують дітей протягом першого року життя.

Деякі малі молекули (наприклад мурамілдіпептид, екстрагований з клітинної стінки мікобактерій) також діють як ад'юванти. Механізм їх дії, однак, невідомий.

Існують інші підходи до підвищення ефективності вакцин, а саме - застосування коадмініструючих цитокінів.

Із розвитком генно-інженерних технологій стало зрозуміло, що навіть традиційні вакцини можна вдосконалити і зробити безпечнішими при застосуванні технології рекомбінантних ДНК.

Відомо, що більшість існуючих антивірусних вакцин містять інактивовані або живі атенуовані віруси. Інактивовані, або «вбиті» вакцини містять віруси, оброблені таким чином, що вони стають нездатними до реплікації. Живі атенуовані вакцини значно ефективніші, можливо, тому, що стимулюють велику кількість важливих ефektorних механізмів, включаючи індукцію цитотоксичних CD8 Т-клітин: інактивований вірус не може продукувати протеїни в цитозолі; таким чином, антигени вірусних білків не можуть бути презентовані ГКГ молекулами класу I, і тому цитотоксичні CD8 Т-клітини не генеруються цими вакцинами. Атенуовані вірусні вакцини на сьогодні застосовуються проти поліомієліту, кору, епідемічного паротиту, краснухи та вітряної віспи.

Емпіричний підхід до атенуації і досі лишається актуальним, але він може бути доповнений двома новими методами, в яких застосовується технологія рекомбінантних ДНК. Перший - це ізоляція специфічних вірусних генів та їх мутагенез *in vitro*. Мутовані гени використовують для зміни гена дикої типу в реконструйованому

вірусному геномі, внаслідок чого примусово атенуований вірус можна застосувати як вакцину. Перевага цього підходу полягає в тому, що ці мутації є штучними, отже, реверсія до дикого типу є практично неможливою. Такий підхід може бути корисний при створенні живої протигрипозної вакцини. Відомо, що вірус грипу здатний реінфікувати одного й того ж господаря кілька разів, оскільки цей вірус піддається антигенним змінам, що запобігає природній імунній відповіді. Сучасний підхід до вакцинації проти грипу полягає у використанні вбитої вірусної вакцини, яка щорічно формується на основі найпоширеніших штамів вірусу.

Важливим методом лишається селекція непатогенних або ослаблених мутантів для вдосконалення живих атенуованих бактеріальних вакцин. Завдяки такому підходу було вдосконалено ряд антибактеріальних вакцин. Наприклад, збудник черевного тифу (*Salmonella typhi*) було використано для вдосконалення живої вакцини. Дикий природний штам піддавали мутагенезу під дією нітрозозуанідину; у новому штамі відбирали дефектний за одним із ферментів, блокуючи шлях синтезу ліпополісахаридів, що є важливим фактором патогенності. Сучасні підходи до використання атенуованих вакцин спрямовані на специфіку генів, що кодують ферменти біосинтетичних шляхів амінокислот, які містять ароматичні кільця, такі як тирозин та фенілаланін. При мутації цих генів утворюються ауксотрофні організми, ріст яких залежить від надходження необхідних поживних речовин ззовні, що їх бактерія дикого штамів спроможна синтезувати самостійно. Ці бактерії погано ростуть у кишечнику, але здатні зберігатися тривалий час як вакцина, індукуючи ефективну імунну відповідь. Вакцинація проти *Salmonella* важлива не тільки для людини. Сучасні методи масового вирощування курей для харчових потреб призвели до поширення інфікування свійських птахів штамми *Salmonella*, які є патогенними для людини та часто спричиняють харчові отруєння. Таким чином, в окремих частинах світу, де поширений черевний тиф, вакцинація людей є пріоритетним завданням.

Окрім того, атенуовані мікроорганізми можуть бути ефективними векторами при вакцинації проти багатьох інших патогенів. Ефективна жива атенуована тифозна вакцина здатна виконувати не тільки свою пряму функцію, а й слугувати вектором для презентації антигенів з інших організмів. Атенуовані штамми *Salmonella* використовуються як носії гетерологічних генів, що кодують токсин правця та антигени таких різноманітних мікроорганізмів-збудників, як *Listeria*

*monocytogenes*, *Bacillus anthracis*, *Leishmania major*, *Yersinia pestis* та *Schistosoma mansoni*. Варіанти таких нових пероральних вакцин було апробовано у дослідах з метою захисту мишей від експериментального зараження відповідними патогенами.

Вірусні вектори для перенесення гетерологічних пептидів та протеїнів від інших організмів можуть бути сконструйовані подібним чином. Хоча вірус коров'ячої віспи вже не використовується для профілактики натуральної віспи; цей мікроорганізм здатний відігравати роль авірулентного носія гетерологічних антигенів. Було запропоновано помістити гени, що кодують протективні антигени, кількох різних організмів у один штам вірусу коров'ячої віспи. Цей механізм дозволяє імунізувати людей проти кількох патогенів одночасно, але така вакцина не може бути повторно використана, оскільки вектор вірусу коров'ячої віспи сам по собі генерує тривалий імунітет, що може нейтралізувати його ефективність при повторному введенні.

Для успішного розвитку технології рекомбінантних вакцин необхідна ідентифікація протективних антигенів, саме тому прогрес у цьому напрямі залежить від аналітичних можливостей методів рекомбінантної ДНК, так само як і їх застосування для маніпуляції структурою гена.

Одним із нових типів вакцинних препаратів є синтетичні вакцини, створені на основі синтетичних пептидів, аналогів протективних антигенів збудників інфекційних хвороб. Такий підхід до вдосконалення вакцин базується на ідентифікації епітопів для Т-клітин, які стимулюють захисний імунітет.

Незвичним джерелом отримання захисних пептидів вакцин є віруси рослин, які не є патогенними для людини. За допомогою методів генної інженерії відповідні пептидні антигени вводять до складу химерних білків оболонки. Цей метод використовували для захисту мишей від летального ураження вірусом сказу: мишей попередньо годували листям шпинату, інфікованим рекомбінантним вірусом альфа-мозаїки, що містив пептид вірусу сказу.

Удосконалення вакцинних препаратів полягає в удосконаленні шляхів їх введення в організм людини. Більшість вакцин вводиться ін'єкцією. Цей шлях має два недоліки: практичний та імунологічний. Ін'єкція потребує матеріальних витрат і є болючою: потрібні шприц, голки та кваліфікована людина для її здійснення. Ін'єкції не популярні серед пацієнтів, що знижує сприйняття вакцини, а масова вакцинація таким методом є складною. Імунологічний недолік полягає у тому, що ін'єкція не є звичайним шляхом потрап-



ляння в організм для більшості патогенів, проти яких спрямована вакцинація. Багато важливих патогенів інфікують слизові поверхні або потрапляють крізь них в організм. Прикладом можуть слугувати респіраторні мікроорганізми, такі як *Bordetella pertussis*, риновіруси та вірус грипу, а також кишкові мікроорганізми, такі як *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, ентеропатогенні *Escherichia coli* і *Shigella*. Саме тому важливо зрозуміти, яким чином ці організми стимулюють місцевий (секреторний) імунітет, і розробити вакцини для оральної або назальної інгаляції. Дієвість таких методів підтверджує ефективне застосування живої атенуйованої поліомієлітної вакцини.

Особливим типом нових нетрадиційних вакцинних препаратів є ДНК-вакцини. Механізм їх дії полягає у привнесенні ДНК, що кодує мікробний антиген, в організм людини, наприклад у м'язи. Все почалося зі спроб використати нездатні до реплікації бактеріальні плазмиди, що кодують білки, в генній терапії: у білків, які експресуються *in vivo* з цих плазмід, була виявлена здатність стимулювати імунну відповідь. Коли ДНК, що кодувала вірусний імуноген, вводили внутрішньом'язово, у миші з'явилися антитіла та цитотоксичні Т-клітини, що дозволяло їй уникнути наступного ураження цілим вірусом. Така реакція не шкідлива для м'язової тканини, безпечна та ефективна, тому що використовується тільки один мікробний ген (фрагмент мікробної ДНК), не призводить до ризику виникнення активної інфекції. Ця процедура була названа «ДНК-вакцинація». ДНК почали вводити спеціальним «генним пістолетом», за допомогою якого мікрочастинки, покриті ДНК, через шкіру потрапляли до м'язів. Ця техніка виявилася ефективною при застосуванні на тваринах і, можливо, буде використана для масової імунізації, однак вона тільки випробовується на людях. Об'єднання у плазмідах (векторах) генів, які кодують захисні антигени, з генами, що кодують деякі цитокіни, робить ДНК-вакцинацію значно ефективнішою.

### **БІФУНКЦІОНАЛЬНІ ЛІКАРСЬКІ ПРЕПАРАТИ СПРЯМОВАНОЇ ДІЇ**

Ідея П. Ерліха щодо можливості спрямованого транспорту лікарських препаратів в організм людини була значно розвинута після опрацювання гібридомної технології одержання моноклональних антитіл. Він вважав, що на поверхні клітин усіх тканин містяться унікальні рецептори, що надають їм свою неповторну специфічність. А тому емпіричним шляхом можна віднайти такі речовини, які будуть зв'язуватися з клітинами

переважно однієї тканини і не взаємодіяти з Іншими клітинами організму. Серед таких речовин можуть існувати і такі, що мають терапевтичну дію щодо клітин, з якими вони зв'язались. Таким чином, за Ерліхом, лікарські препарати повинні мати одночасно дві властивості: по-перше, здатність вибірково прикріплюватися до потрібних клітин, а по-друге, здатність певним чином модифікувати життєдіяльність клітин, тобто активувати чи пригнічувати ту чи іншу функцію клітини, її поділ, вбивати її. Зрозуміло, що підібрати «магічні кулі», тобто препарати з таким набором властивостей, емпіричним шляхом надзвичайно важко. Проте саме скринінг багатьох тисяч різноманітних речовин з метою пошуку серед них однієї потрібної лікарської форми становить основу фармацевтичної індустрії.

В останні роки виник та ефективно розвивається новий науковий напрям, який принципово відрізняється від емпіричного пошуку препаратів. Це конструювання нових лікарських препаратів з двох складових, одна з яких забезпечує селективне зв'язування з плазматичною мембраною потрібних клітин, друга - модифікує їх метаболізм. Такі препарати складаються з двох фрагментів, один з яких є адресою, інший - ефектором. Сконструйовані таким чином препарати називаються біфункціональними, а науковий підхід - спрямованим транспортом лікарських засобів.

Імунологія відіграє в цьому напрямі провідну роль. Саме імунна система має унікальні інструменти надзвичайно точного розпізнавання - це антитіла та антигенрозпізнавальні рецептори клітин. Молекули антитіл придатні до використання у ролі структури біфункціонального препарату, який відповідає за селективне зв'язування з рецепторами на поверхні потрібних клітин. За допомогою такої точної «адреси» можна успішно доставити до клітини-мішені потрібний ефектор-активатор, інгібітор чи токсин.

На сьогодні експериментально опрацьовано кілька моделей біфункціональних препаратів: імунотоксини, респекрини, ADEPT (antibody-dependent enzyme potentiated therapy) проти пухлин, радіоактивні антигени та деякі інші. В основному всі вони мають виконувати функцію селективного знищення пухлинних клітин в організмі людини. Проте радіоактивні антигени було успішно апробовано у клінічному експерименті при лікуванні такої надзвичайно важкої аутоімунної хвороби, як міастенія гравіс, при якій внаслідок появи аутоантитіл до білка-рецептора ацетилхоліну порушується нормальна взаємодія ацетилхоліну з відповідним рецептором у нервово-м'язових синапсах. Це призводить до розслаблення

та подальшої дистрофії скелетної мускулатури. Було сконструйовано біфункціональний препарат на основі високоспецифічних моноклональних антитіл до ацетилхолінового рецептора (адреса), до яких було кон'юговано високоактивний радіоактивний ізотоп (ефектор). При введенні в організм хворого цей препарат знищив клон В-лімфоцитів, що синтезували аутоантитіла до білка-рецептора ацетилхоліну. У хворого після такої терапії настала тривала ремісія. Це свідчить про перспективність застосування таких препаратів.

## ВИСНОВКИ

Описані напрями сучасної біотехнології дають підстави стверджувати, що це - галузь стрімких, майже фантастичних розробок. Безсумнівно, біотехнологія визначатиме майбутнє нашої цивілізації. У зв'язку з цим зростає роль дослідників, які пра-

цюють у даній сфері, у забезпеченні розвитку нових технологій у нашій державі. А отже, підготовка фахівців має відповідати найсучаснішому рівню. Зрозуміло, що країни, які володіють найсучаснішими технологіями, не передадуть їх тим, у кого їх немає. Вони згодні й зацікавлені продавати тільки кінцеві продукти вказаних технологій. Таким чином, формується залежність від експорту, наприклад лікарських препаратів для ефективної профілактики, діагностики та лікування цілого ряду хвороб. Створювати щось нове стає все важче, і на певному етапі наздогнати, створити свої нові біотехнології буде практично неможливо.

Нові ідеї мають визначати напрямки наукових пошуків. І саме добре підготовлена патріотична молодь забезпечить розвиток нових унікальних технологій у нашій державі та створить надзвичайно ефективні, корисні для людства в цілому продукти.

1. Биотехнология / Под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. Кн. 1: Проблемы и перспективы / Н. С. Егоров, А. В. Олескин, В. Д. Самуилов. Кн. 3: Клеточная инженерия / Р. Г. Бутенко, М. В. Гусев, А. Ф. Киркин и др.- М.: Высш. шк., 1987.- 142 с.; 128 с.
2. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение.— М.: Мир, 2002.— 590 с.
3. Иммунология / Под ред. У. Пола.- М.: Мир, 1987.-Т. 1-3.
4. Моноклональные антитела / Под ред. Р. Г. Кеннета, Т. Дж. Мак-Керна, К. Б. Бетхол.- М.: Медицина, 1983.- 416 с.
5. Петров Р. В., Хаитов Р. М. Искусственные антигены и вакцины.- М.: Медицина, 1988.- 288 с.
6. Применение синтетических антигенов для диагностики инфекционных болезней / Доклад научной группы ВОЗ-Женева: ВОЗ, 1991- 75 с.
7. Рыбальский Н. Г., Романова В. С., Тареева И. Г. и др. Вакцины - как объект изобретения.- М.: ГКНТ, 1988.- 260 с.
8. Сассон А. Биотехнология — свершения и надежды.— М.: Мир, 1987.-410 с.
9. Сингер М., Берг П. Гены и геномы.- М.: Мир, 1998- Т. 1- 373 с.
10. Уотсон Дж., Туз Дж., Кури Д. Рекомбинантные ДНК.-М.: Мир, 1986.-285 с.

*L. Mykhalsky*

## SOME MODERN BRANCHES OF BIOTECHNOLOGY IN THE LECTURE COURSE FOR MASTERS OF SCIENCE IN BIOLOGY

*Some theoretical and methodological aspects of the presentation of some branches in modern biotechnology in the lecture course for the Masters of Science in Biology are presented in this article. We give brief characteristics of the main lines in modern biotechnology, including those ones, which are connected with human health protection: obtaining of the new diagnostic medication, interferons, immunosuppressors, vaccine, bifunctional preparats. There are also prospects of gene manipulations usage for controlling the inheritable and virus diseases and tumors in this article.*