

ВАКЦИНЫ

ВАКЦИНЫ

- это препараты, содержащие антигены (АГ) возбудителей инфекционных заболеваний, и предназначенные для создания искусственного активного иммунитета с целью профилактики и лечения соответствующего заболевания.

Традиционные вакцины

- цельные патогенные м/о.
Клеточные или вирусные АГ.

АТ, вырабатываемые в ответ на их введение, связываются с *поверхностными* белками патогенного м/о и запускают иммунный ответ.

- **I Неживые** (убитые)
- **II Живые аттенуированные** (от лат. attenuatio — уменьшение)
 - варианты живых патогенных м/о, лишенные патогенности (или ослабленные). Получают в результате инактивирующего воздействия на природные (дикие) штаммы.
 - Штамм дикого типа выращивают в культуре, очищают, а затем инактивируют или модифицируют до такой степени, чтобы он утратил патогенность, но сохранил способность вызывать иммунный ответ
 - Для инактивации используют нагревание, воздействие химических веществ, физических факторов (УЗ, температурный или осмотический шок и т.д.)

Компоненты комплекса АГ-АТ

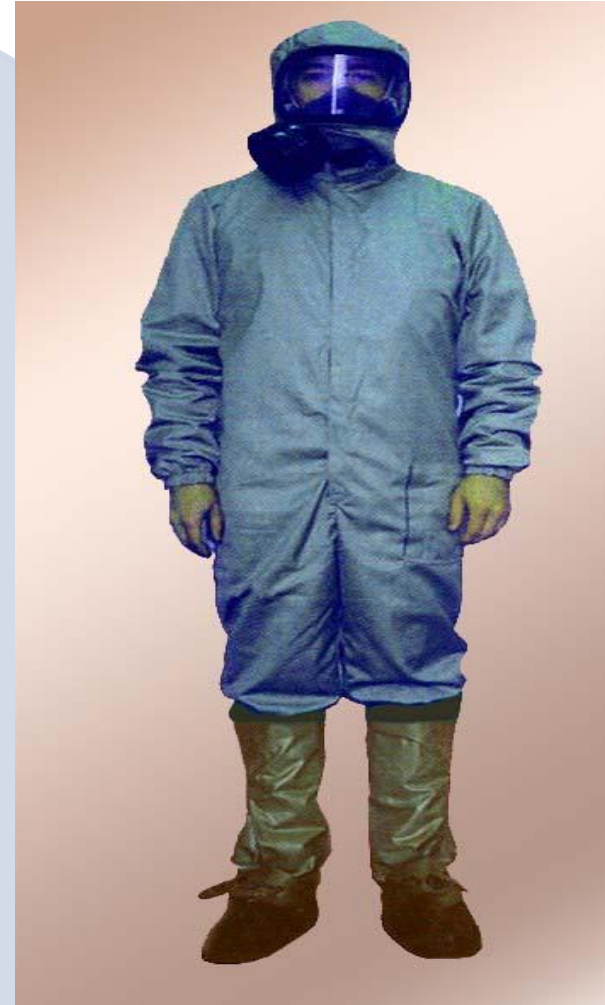
- разрушают мембраны клеток м/о,
- активируют фагоциты,
- генерируют сигналы, мобилизующие другие компоненты системы иммунного ответа (T_H – лимфоциты, эффекторные клетки, механизмы воспаления и т.д. – см.

Взаимодействие АГ с
системами
естественного
иммунитета
собственного
организма



Пробл
емы и
ограни
чения
в
произ
водст
ве
тради
ционн
ых
вакцин

- Не все патогенные м/о удастся культивировать
- При нарушении производственного процесса в вакцины могут попасть вирулентные м/о (недостаточно ослабленные), что может привести к распространению инфекции
- Возможно инфицирование персонала. **GMP** регламентируют **особые правила** для работы с особо опасными м/о.
- Атенуированные штаммы могут ревертировать к исходному дикому штамму
- Некоторые заболевания (например СПИД) нельзя предупредить с помощью традиционных вакцин



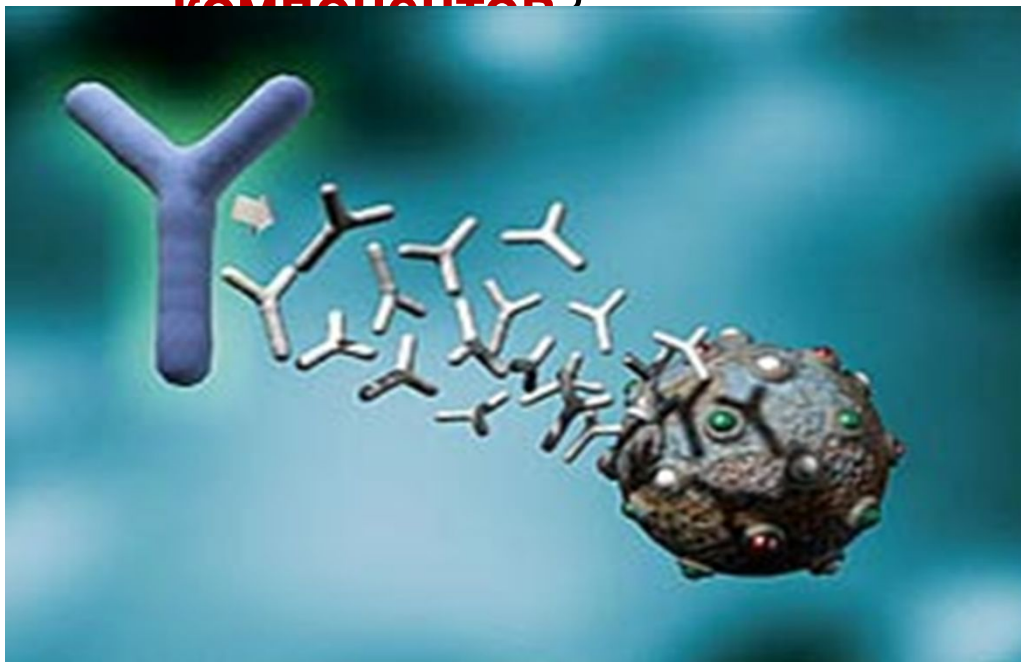
Костюм для
работы
с ООИ

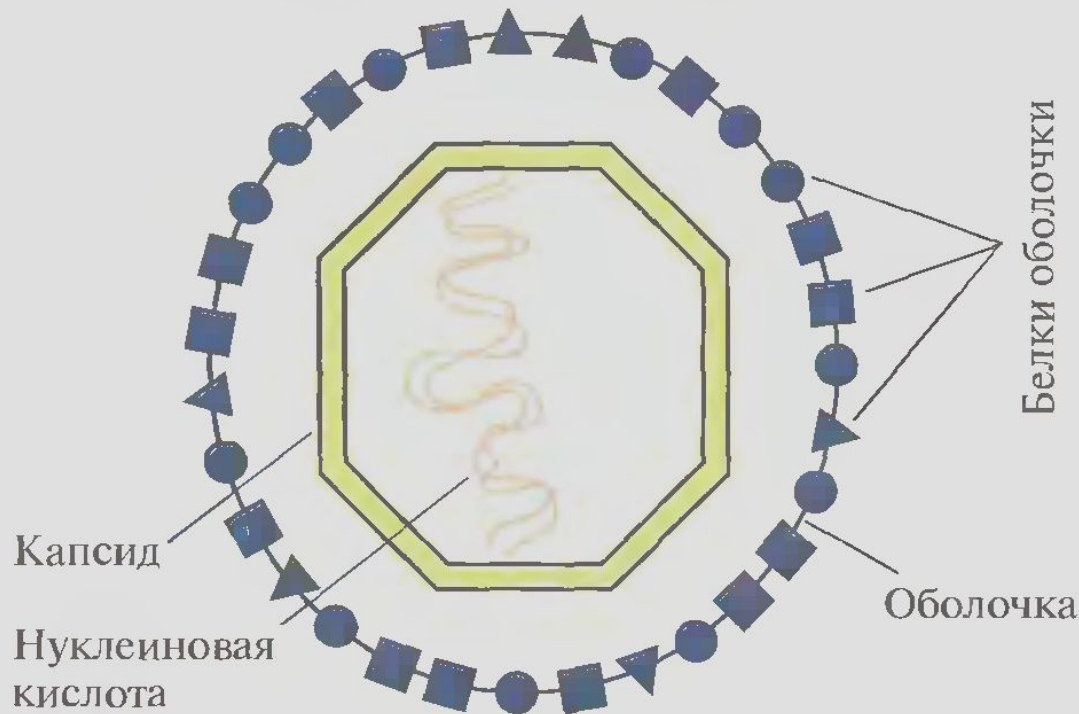
Вакцины нового поколения

Лишены недостатков традиционных вакцин.

Для их разработки применяют методы генной инженерии.

- Если антитела, вырабатываемые в ответ на введение традиционных вакцин, связываются с поверхностными белками патогенного м/о и этого бывает достаточно для запуска иммунного ответа, то должна ли **вакцина** содержать **целые клетки**?
- М.б. достаточно лишь каких-то специфических **поверхностных компонентов**?





Строение вируса млекопитающих.

ДНК или РНК заключена в белковый капсид. У некоторых вирусов капсид окружен еще и белковой оболочкой

установлено

Для выработки в организме-хозяине антител в ответ на вирусную инфекцию достаточно очищенных

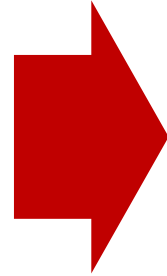
поверхностных белков вируса (белков капсида или внешней оболочки)

1. Субъединичные вакцины

**Вакцины, содержащие лишь
отдельные компоненты патогенного
м/о**

Создание и производство субъединичных вакцин

Идентифицируют АГ-активную компонент у патогенного м/о (как правило белковой природы)



Гены (или их сегменты), кодирующие основные АГ патогенных м/о экспрессируют в альтернативном хозяине, например *E.coli*



Получают АГ-белок в большом количестве, очищают и используют как

Преимущества и недостатки субъединичных вакцин

Преимущества:

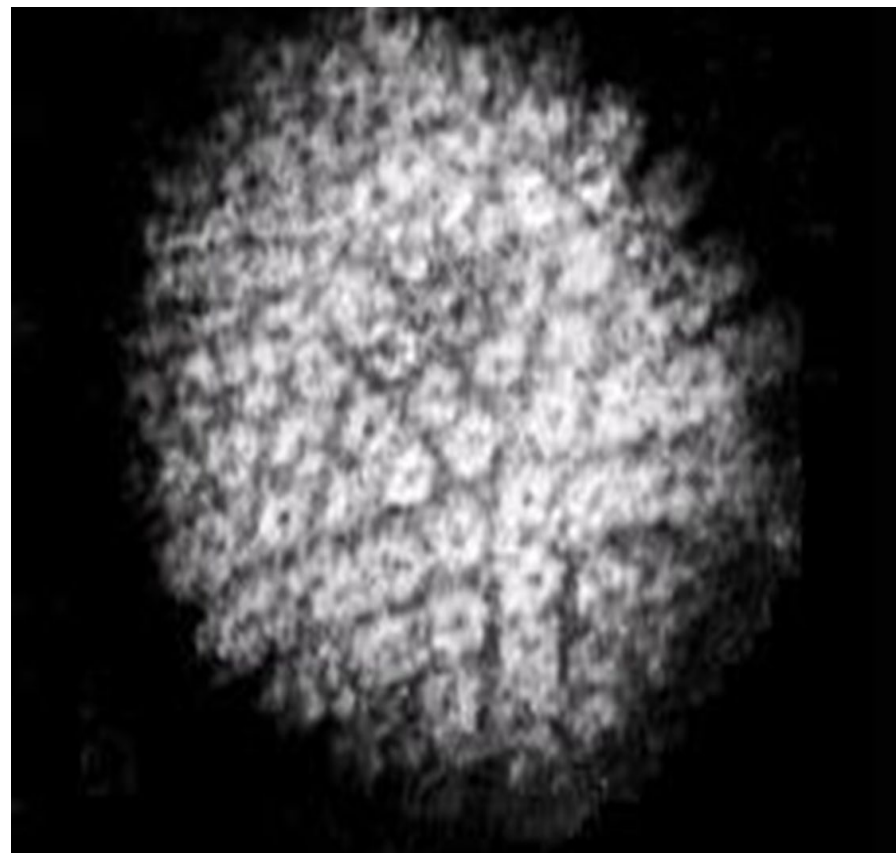
- очищенный иммуногенный белок стабилен
- Безопасен (в сравнении с патогенным м/о – живым или аттенуированным)
- его химические свойства известны
- в нем отсутствуют дополнительные белки и нуклеиновые кислоты, которые могли бы вызвать нежелательные побочные эффекты в организме-хозяине (аллергические)

Недостатки:

- очистка специфического белка дорогостоящая
- *конформация* выделенного белка может отличаться от конформации *in situ* (в составе вирусного капсида), что может приводить к изменению его антигенных свойств (отсюда → непостоянство активности)

СУБЪЕДИНИЧНАЯ ПРОТИВОГЕРПЕТИЧЕСКАЯ ВАКЦИНА

- **HSV – herpes simplex virus** - вирус простого герпеса. Вызывает не только заболевания местного и общего характера (глаза, гениталии, энцефалит и т.д.). Он является онкогенным, поэтому вакцинация убитым или аттенуированным вирусом сопряжена с риском развития рака. В этой связи ВОЗ запретила применение в медицине традиционной противогерпетической вакцины
- Субъединичная противогерпетическая вакцина безопасна, т.к. **не** содержит вируса, а также **ДНК, кодирующей развитие раковых клеток.**

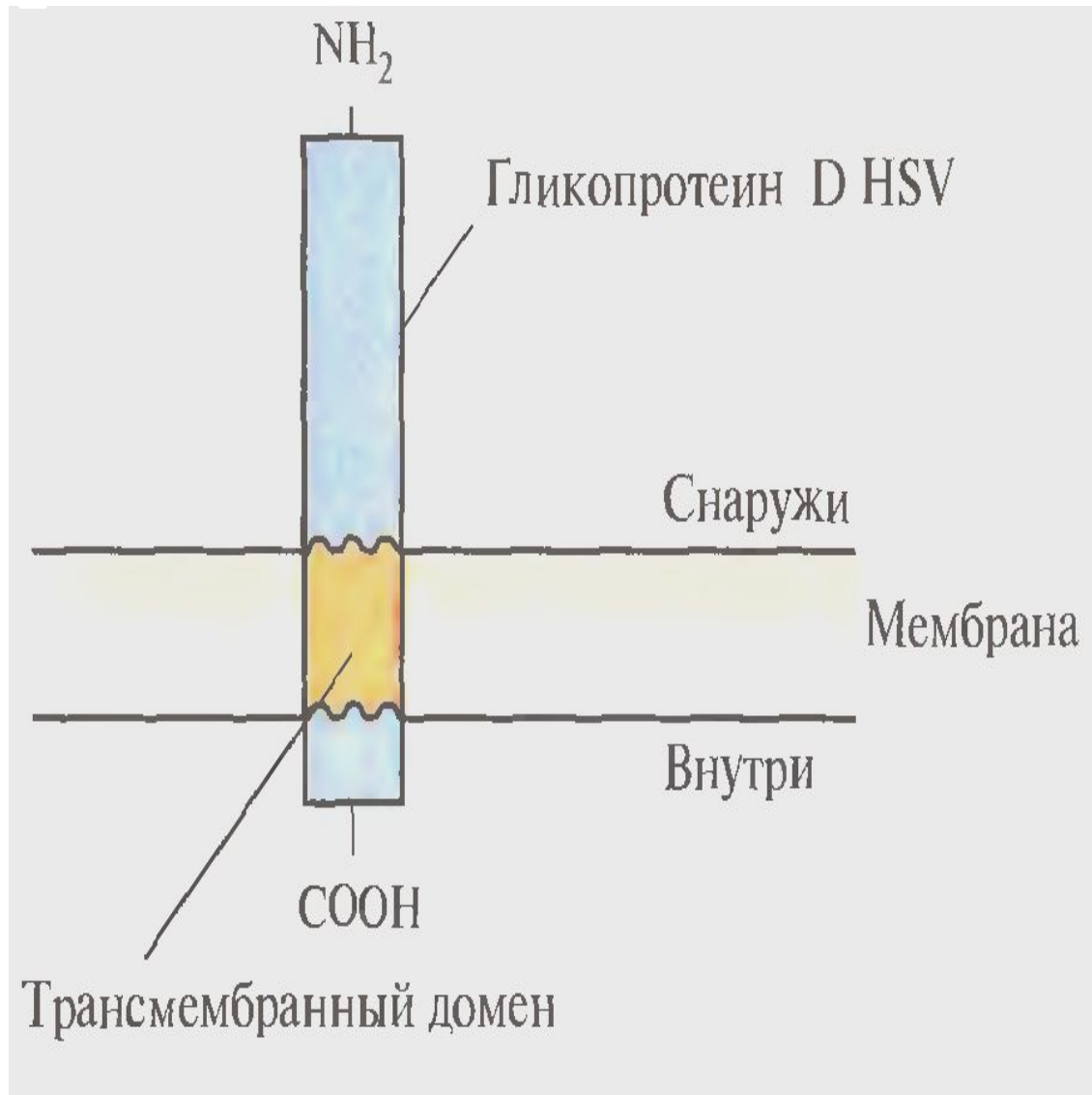


Вирус герпеса простого (**HSV**).
Электронномикроскопическое фото

СОЗДАНИЕ И ПРОИЗВОДСТВО ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГЕРПЕСА ПРОСТОГО

Стадия

Идентификация АГ-активного компонента **HSV**



Установлено, что в HSV выработку антител индуцирует **гликопротеин D** вирусной оболочки (**gD HSV**).

- В ответ на введение мышам **gDHSV** (очищенного от других вирусных фрагментов) у них вырабатываются АТ, нейтрализующие **HSV**.

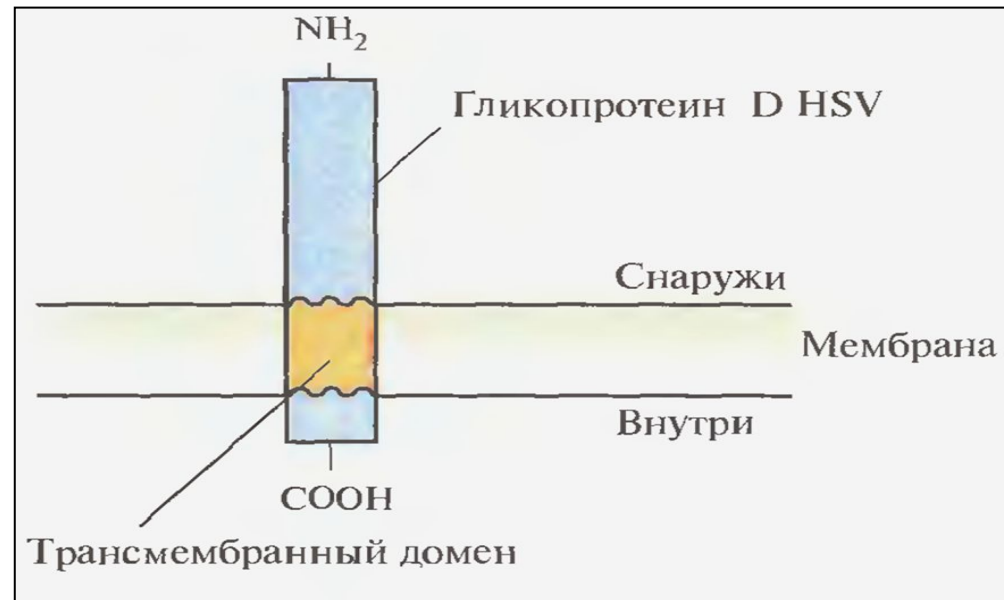
Стадия

Идентификация генов, кодирующих АГ-активный компонент HSV

- Ген, кодирующий **gD HSV**, был изолирован и клонирован в клетках млекопитающих (мыши).

Выяснилось, что полноразмерный ген **gD HSV** кодирует белок, связывающийся с мембраной клетки продуцента посредством трансмембранного домена.

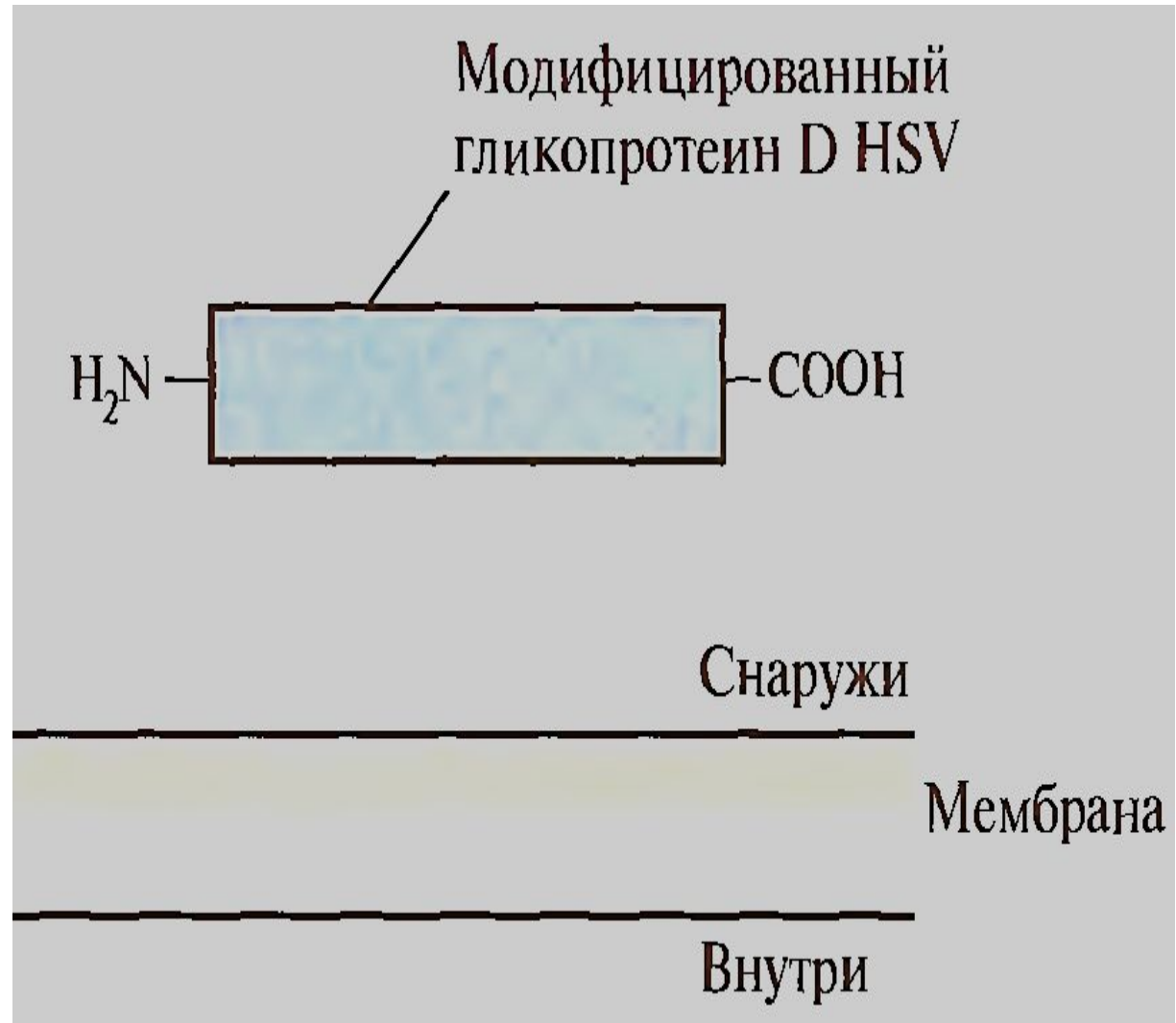
- Такой белок трудно отделить от клетки-продуцента и очистить.



Стадия

- Поэтому ген **gD HSV** модифицировали, удалив ту его часть, которая кодирует трансмембранный домен.
- В результате получили белок **D HSV**, не содержащий трансмембранного домена.
- Полученный белок уже не связывался с мембраной клетки хозяина (продуцента) и легко растворялся в клетках и межклеточном пространстве.

Получение АГ-белка



- Однако для выработки точно специфичных АТ важно было получить не просто протеин, а **гликопротеин**.
- Для этого модифицированным геном трансформировали яйцеклетки китайского хомячка - единственный подходящий продуцент.
- В отличие от клеток мыши и *E. Coli* (и пр. продуцентов) В яйцеклетках китайского хомячка происходит гликозилирование всех чужеродных белков (гликозилирование - ковалентное присоединение сахарного остатка к белковой молекуле).
- В яйцеклетках китайского хомячка модифицированный ген генерирует выработку белка, который воспринимается хозяйской клеткой как чужеродный белок и, следовательно, происходит его гликозилирование
- В результате образуется растворимый гликопротеин, который выбрасывается (экскретируется) клеткой во внешнюю среду, как чужеродное вещество.
- При введении очищенного модифицированного гликопротеина в организм человека вырабатываются АТ, эффективные в отношении **HSV**

Субъединичная противотуберкулезная вакцина

- В стадии разработки.
- Возбудитель туберкулеза – *Mycobacterium tuberculosis*. 2 млрд людей инфицировано.
- Актуальность обусловлена тем, что традиционная вакцина, созданная на основе ослабленного штамма *Mycobacterium bovis* - ***Bacillus Calmette-Guerin*** – вакцина BCG, используемая в настоящее время, вызывает:
 - заболевание у иммуноослабленных пациентов
 - BCG-вакцинированные лица дают положительный ответ на обычную процедуру выявления туберкулобактерий (Манту, Пирке), что не позволяет отличить их от больных туберкулезом.

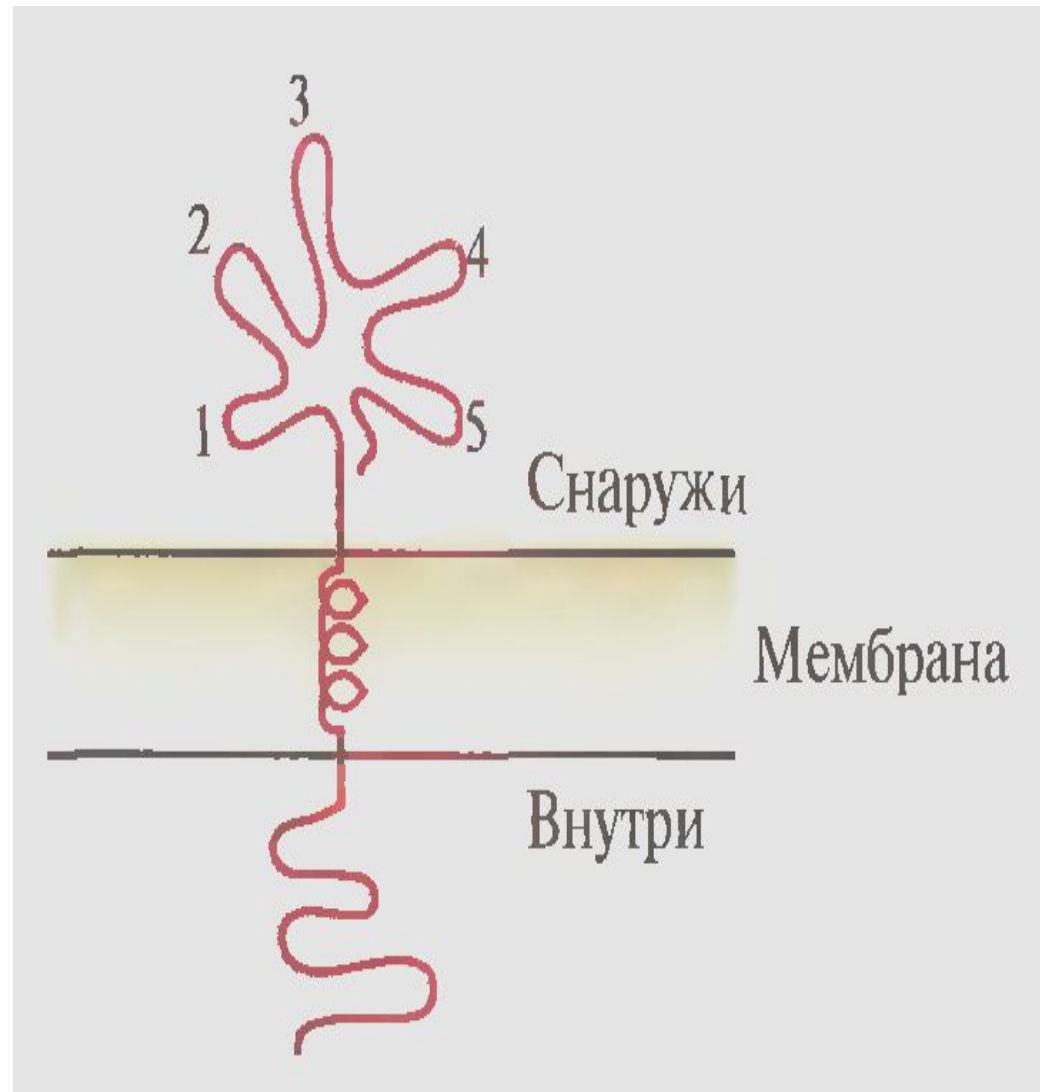
Субъединичные пептидные вакцины

- А может ли **небольшой участок** белковой молекулы (домен) служить субъединичной вакциной и индуцировать выработку АТ?



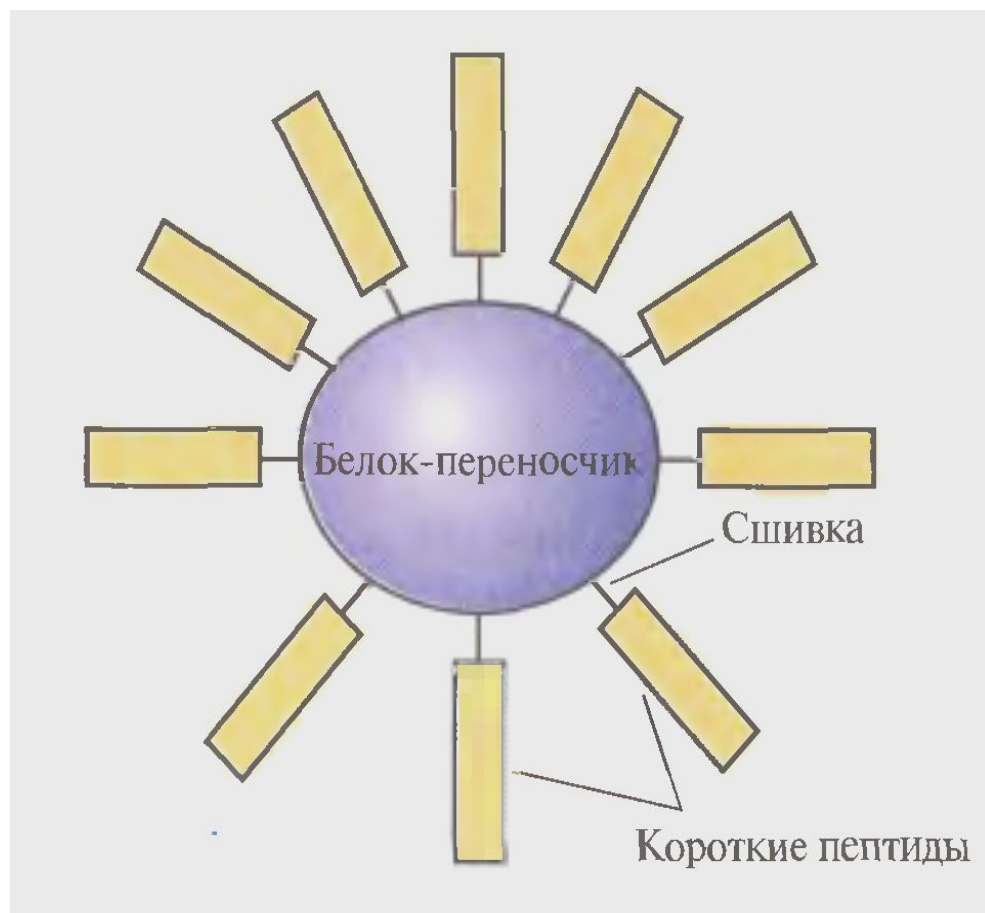
Субъединичные пептидные вакцины

- Интуитивно - да: те участки, которые находятся на поверхности вируса и доступны для АТ обладают иммуногенными свойствами, а внутренние участки несущественны, если только они не влияют на конформацию иммуногенного домена.
- Если так, то короткие пептиды, имитирующие АГ, можно использовать для создания вакцин.



Субъединичные пептидные вакцины

- Химическими методами синтезировали белковые домены, идентичные поверхностным белкам патогенного для морских свинок вируса, и сшили их по-отдельности с инертным белком-переносчиком (для предотвращения их разрушения)
- Ввели морским свинкам.
- Наблюдался ярко-выраженный иммунный ответ. Но доза такой вакцины выше, чем в случае убитой вакцины.



2. Генетически аттенуированные вакцины

**Вакцины, содержащие целые живые
м/о, но с удаленными генами,
кодирующими домены вирулентности**

Создание генетически аттенуированных вакцин

- Патогенный м/о подвергают генетической модификации:
 - делетируют (**delet** - удалять) гены, ответственные за вирулентность или за жизненноважные функции м/о;
 - но (**ВАЖНО!!!**) сохраняют АГ-кодирующие домены ДНК

Создание генетически аттенуированных вакцин

Основное требование:

ЭТИ ВАКЦИНЫ, ЯВЛЯЯСЬ ЖИВЫМИ, НЕ ДОЛЖНЫ РЕВЕРТИРОВАТЬ И СТАНОВИТЬСЯ ПАТОГЕННЫМИ.

Для предупреждения ревертирования необходимо:

- Делетировать, как минимум, **2** области ДНК: кодирующую вирулентность м/о и какую-либо жизненно важную функцию;
- вероятность их одновременного восстановления очень мала.

Генетически аттенуированная противосальмонеллезная вакцина

- Разные штаммы *Salmonella* вызывают острые кишечные инфекции, брюшной тиф, пищевую токсикоинфекцию.
- Аттенуированные штаммы сальмонеллы получают путем делеции отдельных доменов в генах **ARO**, кодирующих ферменты биосинтеза ароматических соединений и генах **PUR**, кодирующих ферменты метаболизма пуринов.
 - Такие штаммы вызывают легкую форму инфекции и обладают в 1 000 000 раз меньшей вирулентностью.

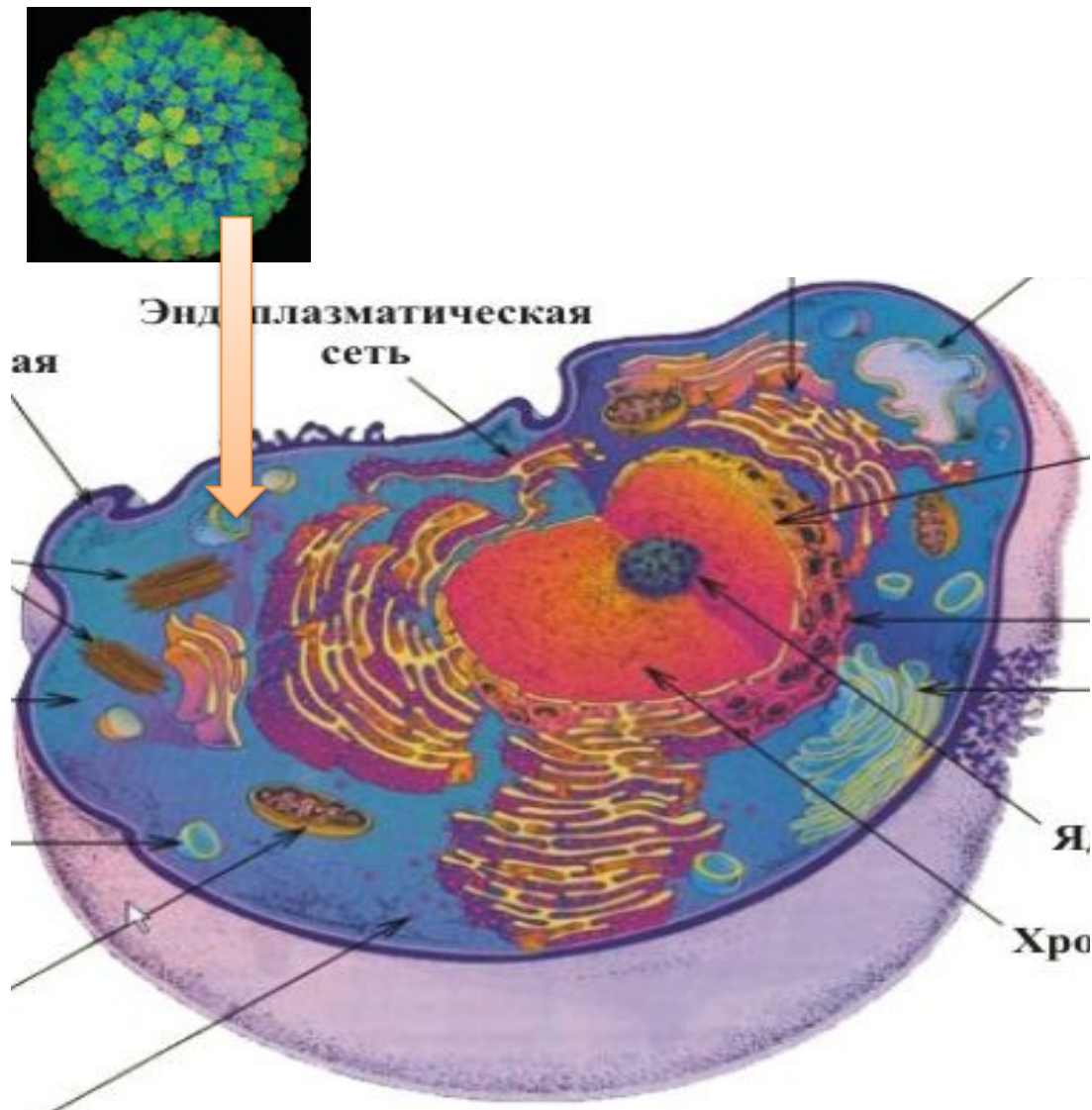
Генетически аттенуированная вакцина вибриона холеры

- Находится в стадии разработки
- Актуально, т.к. используемая в настоящее время – на основе холерных вибрионов, убитых фенолом, обеспечивает частичную защиту на ограниченное время – не более 3-6 месяцев

3. Векторные вакцины

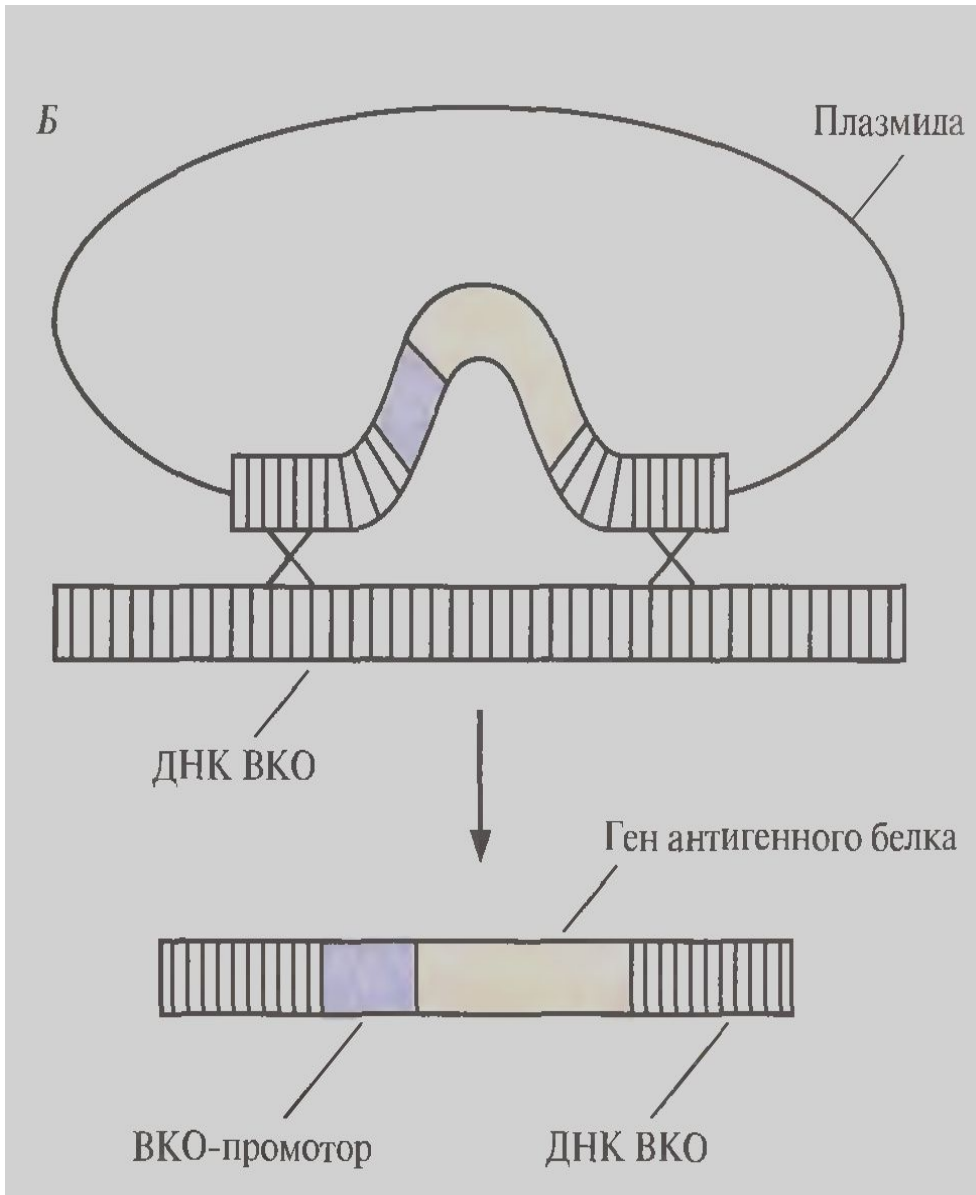
Живые вакцины, полученные путем клонирования генов, кодирующих **основные АГ** патогенного м/о, и встраивания их в геном непатогенного носителя (обычно вируса)

В качестве непатогенного носителя используют ВКО – вирус коровьей оспы



- Геном ВКО изучен и воспроизведен
- Проникая в клетку хозяина (макроорг-ма), ВКО начинает реплицировать свою ДНК в **цитоплазме** инфицированной клетки, т.к. у вируса имеются гены ДНК-полимеразы, РНК-полимеразы и гены ферментов, инициирующих синтез мРНК.
- Вновь синтезированная ДНК ВКО обрастает белковой оболочкой, образуя новые вирусы

Встраивание в ДНК ВКО гена, кодирующего АГ



- Если в геном ВКО встроить чужеродный ген, кодирующий АГ, то он будет экспрессироваться **независимо от регуляторных и ферментных систем клетки-хозяина.**
- Можно встроить ДНК, кодирующую несколько АГ.
- Таким образом получают векторные **ПОЛИ**вакцины на основе ВКО, которые позволяют провести иммунизацию сразу от нескольких заболеваний.

Векторные вакцины на основе ВКО

- В геном ВКО уже удалось встроить и экспрессировать в культуре животных клеток несколько генов антигенных белков: АГ-белка вируса бешенства, АГ гепатита В, белков вируса гриппа.
- ВКО остается жизнеспособным в течение многих лет после лиофилизации (испарения воды через замораживание) и не обладает онкогенными свойствами. Поэтому широко используется для создания векторных вакцин.
- С его помощью в организм-хозяина (человека) доставляют и экспрессируют гены, кодирующие АГ-белки, которые в свою очередь индуцируют выработку АТ.

Генная иммунизация

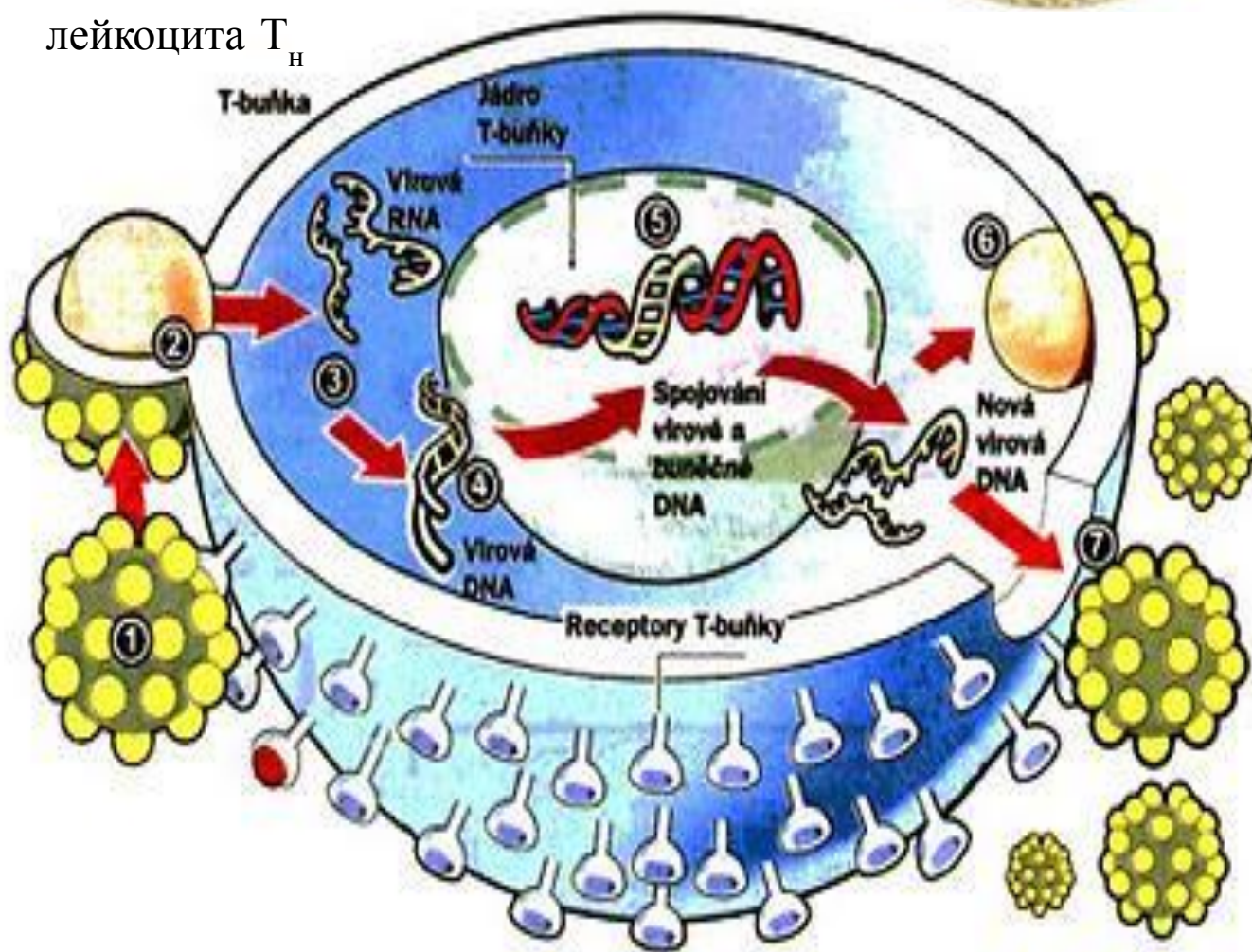
- Позволяет индуцировать в макроорганизме иммунный ответ без введения АГ
- Основан на включении в клетки организма ГЕНА, кодирующего белок АГ.
- В одном из экспериментов ДНК, кодирующую белок АГ, соединили с плазмидой кишечной палочки рBR322.
- Плазмиду ввели В/М в организм мышей.
- Более чем в 75% случаев ген включался в клетки мыши и начинался синтез белка АГ
- Белок АГ индуцировал синтез АТ.
- Этот подход позволяет избежать дорогостоящего процесса очистки АГ (в будущем)

Лекарства против СПИДа

Вакцина ВИЧ

ВИЧ

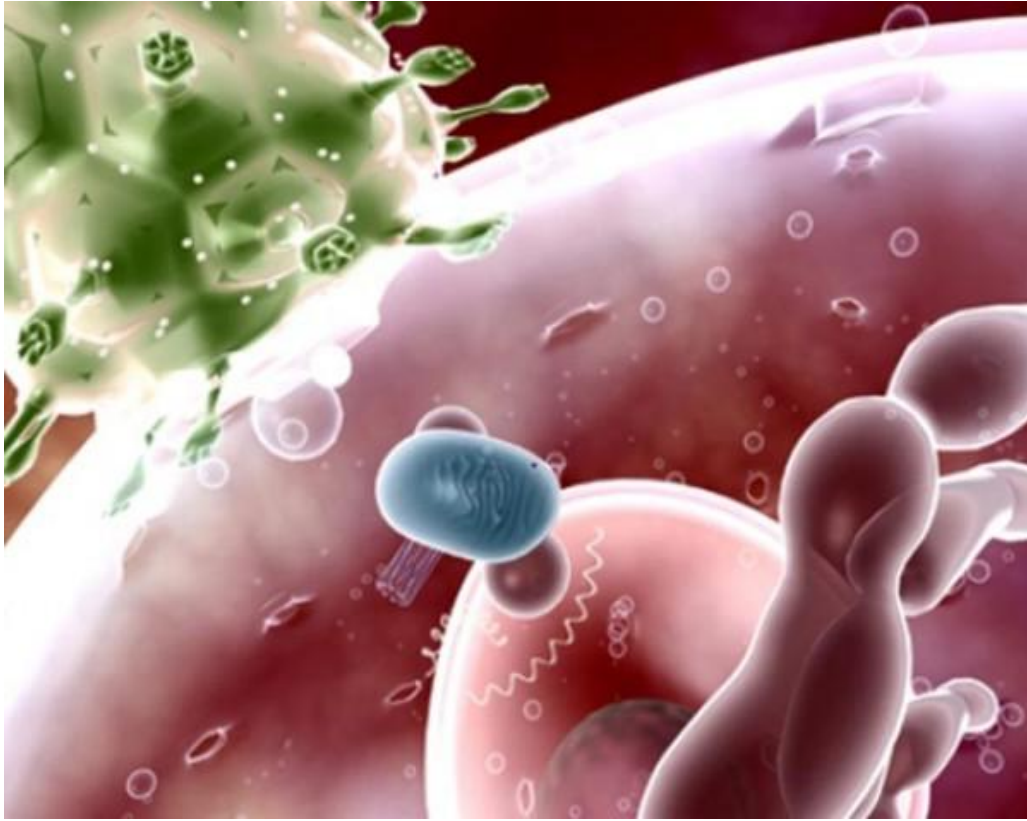
Схема атаки
лейкоцита T_H



ВИЧ поражает один из видов лимфоцитов (иммунных клеток крови)— Т-хелперы (Т_н-клетки). В норме эти клетки связывают продукты разрушения АГ (или комплекса АГ-АТ) и активизируют факторы, стимулирующие другие клетки иммунной системы к участию в иммунном ответе.

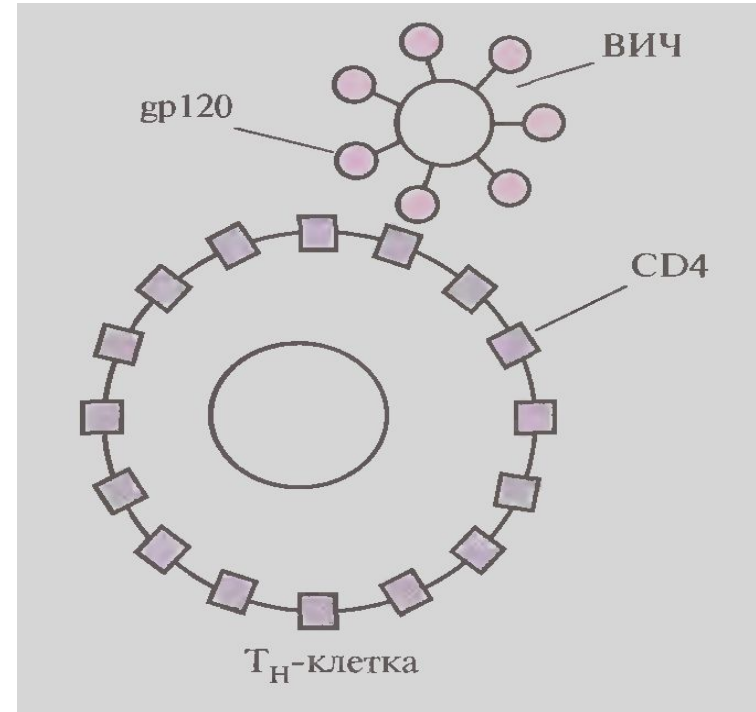
Т.о. Т_н-клетки играют ключевую роль в формировании иммунного ответа, а при ВИЧ-инфекции они перестают функционировать. В этой связи несмотря на то, что к ВИЧ вырабатываются АТ, иммунный ответ организма отсутствует.

1 этап ВИЧ-инфицирования



3-мерная схема атаки лейкоцита вирусом ВИЧ

- На первом этапе ВИЧ-инфекции происходит взаимодействие между **гликопротеином** оболочки ВИЧ (**gp120=м.м**) и рецептором на поверхности Тн-клеток – поверхностным белком **CD4**,



Т.о. связывание ВИЧ с Тн-клеткой опосредуется через образование связи gp120 - CD4.

2 этап ВИЧ-инфицирования

- После связывания с Тн клеткой ВИЧ проникает в нее и становится защищенным от иммунной системы организма
- В результате размножения ВИЧ в инфицированной Тн-клетке происходит лизис клетки
- Пораженная Тн-клетка работает как фабрика по производству **ВИЧ-гликопротеина gp120**, который и вызывает разрушение других Тн-клеток

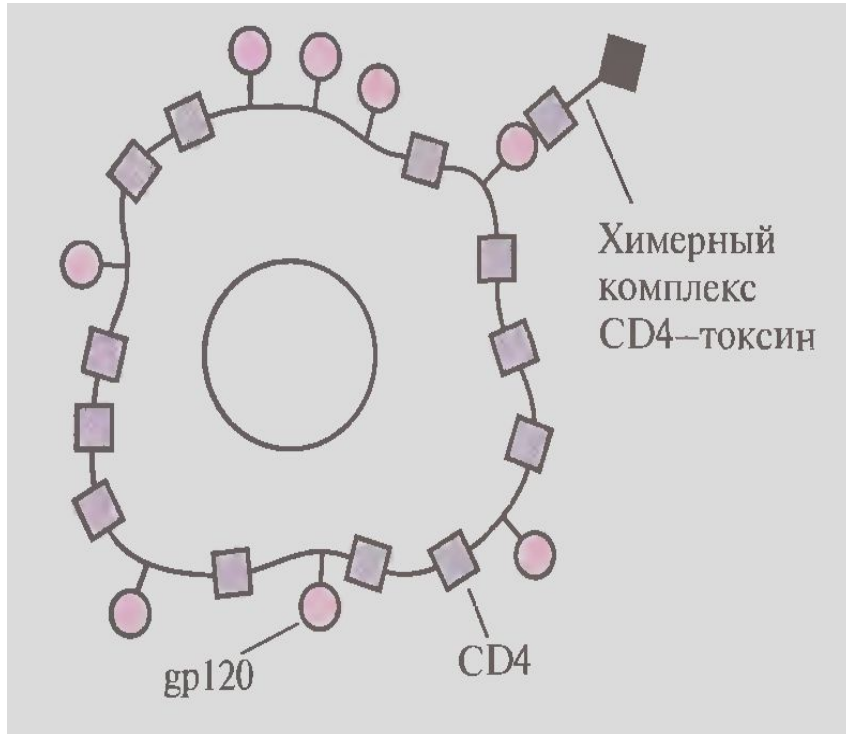
Возможные пути защиты Тн-клеток от ВИЧ

1. In vitro поражение вирусом Тн-клеток блокируется антителами к CD4;
2. процесс замедляется также **при избытке** белка CD4,

но ВИЧ не погибает ни в 1, ни во 2 случае;

3. **Создание химерного белка, состоящего из фрагмента молекулы CD4 и Fc-фрагмента специфического АТ. Такой белок синтезирован, называется **CD4 - иммуноадгезином****

Возможные пути терапии СПИДа



CD4-иммуноадгезин связывает **gp120** и блокирует ВИЧ или инфицированный Тн, а белок АТ замедляет разрушение молекулы **CD4** в плазме и ее связывание с клетками, несущими рецептор к АТ.

Фрагмент АТ (**Fc-фрагмент**) запускаются реакции АТ, обеспечивающие уничтожение вируса или пораженной клетки.