

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

Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко

ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ:
СЬОГОДЕННЯ ТА МАЙБУТНЄ

Навчальний посібник
для студентів спеціальності «Біотехнології та біоінженерія»

Рекомендовано вченою радою НТУ «ХПІ»

Харків
НТУ ХПІ
Друкарня Мадрид
2022

УДК 615.012(075):602.4(075):577(075)

К 78

Рецензенти:

Г. С. Григор'єва, д-р хім. наук, проф.,
ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»;
А. В. Мартинов, д-р. фарм. наук, проф.,
ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова
НАМН України»

*Рекомендовано вченою радою НТУ «ХПІ»
як навчальний посібник для студентів спеціальності
«Біотехнології та біоінженерія», протокол № 6 від 23 вересня 2022 р.*

Краснопольський Ю.М., Пилипенко Д. М.

К 78 Фармацевтична біотехнологія: сьогодення та майбутнє : навчальний посібник для студентів біотехнологічних спеціальностей / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : ТОВ «Друкарня Мадрид», 2022. – 151 с. : іл. 31, табл. 7, бібліогр. 142 назв.
ISBN 978-617-8254-01-8

У навчальному посібнику описані останні досягнення у галузі фармацевтичної біотехнології: вакцини, продукти для регенеративної медицини, рекомбінантні факторів згортання крові та рекомбінантні пробіотичні препарати, нанобіотехнологічні лікарські засоби.

Навчальний посібник призначено для студентів та аспірантів біотехнологічного напрямку.

УДК 615.012(075):602.4(075):577(075)

ISBN 978-617-8254-01-8

© Ю.М. Краснопольський, Д.М. Пилипенко, 2022

© НТУ «ХПІ», 2022

© ТОВ «Друкарня Мадрид», 2022

ЗМІСТ

ВСТУП	5
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	8
ГЛАВА 1. БІОТЕХНОЛОГІЯ ВАКЦИН.....	11
1.1. Антирабічні вакцини для профілактики сказу	12
Контрольні запитання.....	24
1.2. Вакцини для профілактики COVID-19	27
1.2.1. Будова коронавірусу SARS-CoV-2.....	27
1.2.2. Патогенез SARS-CoV-2.....	29
1.2.3. Створення вакцин проти COVID-19	31
Контрольні запитання.....	39
ГЛАВА 2. ЛІПОСОМАЛЬНІ ФОРМИ АД'ЮВАНТІВ І ВАКЦИН	42
2.1. Противірусні вакцини.....	47
2.1.1. Вакцини для профілактики гепатиту	47
2.1.2. Вакцини для профілактики грипу	48
2.1.3. Вакцини для профілактики вірусних інфекцій.....	50
2.2. Антибактеріальні вакцини	55
2.2.1. Вакцини, що містять токсини та анатоксини.....	55
2.2.2. Вакцини, що містять ліпід А	57
2.2.3. Вакцини, що містять пептиди різної структури	59
2.2.4. Вакцини, що містять антигени мікобактерій туберку- льозу	61
2.2.5. Вакцини, що містять бактеріальні полісахариди	63
2.2.6. Рибосомальні вакцини.....	63
2.2.7. Вакцини, що містять компоненти бактеріальної клі- тини	64
2.3. Протипухлинні вакцини	66
Контрольні запитання.....	72

ГЛАВА 3. ФАРМАЦЕВТИЧНА РОЗРОБКА ЛІПОСОМАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ	76
3.1. Вибір складу ліпосомальних препаратів	77
3.2. Комплексні ліпосомальні препарати	83
3.3. Характеристика фізико-хімічних властивостей ліпосом.....	90
Контрольні запитання.....	94
ГЛАВА 4. БІОТЕХНОЛОГІЯ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ	98
4.1. Характеристика пробіотиків людини	98
4.2. Біотехнологія рекомбінантних пробіотичних штамів	101
Контрольні запитання.....	109
ГЛАВА 5. ФАКТОРИ ЗГОРТАННЯ КРОВІ	112
5.1. Фактори згортання крові.....	112
5.2. Біотехнологія рекомбінантного активованого фактора VII ...	115
5.3. Біотехнологія рекомбінантного фактора VIII.....	116
5.4. Біотехнологія рекомбінантного фактора IX.....	124
Контрольні запитання.....	125
ГЛАВА 6. БІОТЕХНОЛОГІЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЇ МЕДИЦИНИ	128
6.1. Класифікація стовбурових клітин.....	129
6.2. Приклади роботи зі стовбуровими клітинами	133
6.2.1. Отримання культивованих клітин жирової тканини	134
6.2.2. Отримання стовбурових клітин із кісткового мозку людини	137
6.2.3. Приклади комерційних препаратів, що містять стовбурові клітини	139
6.3. Екзосоми у регенераційній медицині. Терапевтичний потенціал	140
Контрольні запитання.....	148

ВСТУП

Шановний читачу! Представлений Вам навчальний посібник є продовженням матеріалів з фармацевтичної біотехнології та має розглядатися разом із випущеними раніше виданнями кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії НТУ «ХПІ».

За минулі роки біотехнологічні дослідження досягли високого рівня, з'явилися нові напрямки, що дозволили створити сотні продуктів на основі фармацевтичної біотехнології, які розширили спектр лікарських, профілактичних та діагностичних препаратів. У даному посібнику нами наведені останні досягнення в галузі біотехнологічних продуктів: вакцин (препарати проти COVID-19 та вірусу сказу), продуктів для регенеративної медицини, рекомбінантних факторів згортання крові та рекомбінантних пробіотичних препаратів, нанобіотехнологічних лікарських засобів та ін.

Вакцинація сьогодні є найефективнішим методом профілактики низки інфекційних захворювань. Розглянуто біотехнологічну розробку вакцин на прикладі препаратів проти COVID-19 та вірусу сказу. Особливу увагу в книзі приділено вакцинам проти вірусу SARS-CoV-2, що викликає COVID-19. Активна боротьба з пандемією 2020–2021 рр. показала, що успіху можна досягти лише за спільного співробітництва багатьох держав завдяки координації робіт між промисловістю, науковими дослідженнями та значними фінансовими інвестиціями. Вакцини проти COVID-19 – перші у світі препарати на основі інформаційної РНК та вірусних векторів, які використані для вакцинації сотень мільйонів людей.

Вакцина проти сказу є незамінним препаратом для профілактики сказу. При розробці цих вакцин біотехнологія пропонує низку напрямків: живі атенуйовані препарати, пептидні вакцини, рослинні продукти для профілактики сказу, ліпосомальні вакцини, продукти на основі РНК або вірусних векторів, використання методу зворотної генетики та ін.

Розвиток нанобіотехнології призвів до розробки прогресивних лікарських препаратів на основі ліпосомальних «drug delivery system» (систем направленої

доставки ліків) та сучасного обладнання для їх виробництва. Сьогодні статус ліпосом як універсальних «drug delivery system» сформований як результат клінічного використання у світі близько 50-ти інноваційних препаратів з доведеною клінічною ефективністю, які містять різні активні фармацевтичні інгредієнти у мембрані або всередині ліпосом, для лікування онкологічних, інфекційних, запальних та інших тяжких захворювань. Активно розробляються ліпосомальні форми, що мають мембранопротекторну та антиоксидантну дію.

Сьогодні в наше життя увійшли препарати пробіотичних штамів мікроорганізмів, функції яких в організмі людини неможливо недооцінити. На основі природних штамів створено десятки рекомбінантних пробіотиків, використання яких у медицині розширює можливості для лікування людини.

Широкий розвиток отримала регенеративна медицина, за допомогою якої можна провести відновлення пошкодженої або ураженої хворобою тканини за допомогою ендогенних стовбурових клітин або трансгенних клітин. Регенеративна медицина прагне розвивати науку та технології, які мають допомогти відновити або замінити пошкоджені (хворі клітини та тканини людини) для відновлення їх нормальної функції. Це може включати трансплантацію стовбурових клітин, клітин-попередників, стимулювання власних процесів відновлення або використання клітин як способу доставки терапевтичних агентів, наприклад, генів або цитокінів.

Фармацевтична біотехнологія має великі перспективи на світовому фармацевтичному ринку через постійне зростання потреб охорони здоров'я. Серед біотехнологічних препаратів є продукти для спрямованого на патологічні мішені, переважно, парентеральні. Серед них – білки та нуклеїнові кислоти: вакцини, гормони, моноклональні антитіла, цитокіни, фактори згортання крові, ДНК, РНК та ін.

Інтенсивний розвиток біотехнології, біохімії, імунології визначив прогрес у розвитку світової фармації та створення вискоефективних вакцин: як традиційних, так і вакцин нового покоління; рекомбінантних пробіотиків та факторів згортання крові, продуктів на основі стовбурових клітин різної спрямованості.

Широкий спектр біотехнологічних препаратів, що застосовується сьогодні у світовій практиці, вимагає подальшого дослідження і є предметом обговорення даного посібника. Технології, наведені у цій публікації, є принципово можливими схемами отримання біотехнологічних препаратів і не є технологією конкретного виробника. Спроба їх відтворення не може закінчитися успішно,

оскільки наведено лише загальні характеристики процесів, що дозволяють представити й оцінити сучасний стан проблеми.

Дана публікація є продовженням серії навчальних посібників НТУ «ХП» за спеціальністю «Біотехнології та біоінженерія», напрям «Фармацевтична біотехнологія»:

✓ «Фармацевтична біотехнологія: Технологія виробництва імунобіологічних препаратів» (2009 р.);

✓ «Фармацевтична біотехнологія: Біонанотехнологія у фармації та медицині» (2011 р.);

✓ «Фармацевтична біотехнологія: Виробництво біологічно активних речовин, Частина I» (2012 р.);

✓ «Фармацевтична біотехнологія: Виробництво біологічно активних речовин, Частина II» (2013 р.);

✓ «Фармацевтична біотехнологія: Основи лабораторних досліджень. Практикум» (2017 р.);

✓ «Фармацевтична біотехнологія: Аспекти фармацевтичної хімії» (2018 р.);

✓ «Фармацевтична біотехнологія: Біотехнології виробництва готових лікарських форм» (2020 р.).

Можна сподіватися, що представлений на суд читачів матеріал сприятиме розвитку знань бакалаврів, магістрів та аспірантів про розробку, виробництво, контроль та застосування біологічно активних речовин, отриманих біотехнологічними методами.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ

АКДП	– адсорбована кашлюково-дифтерійно-правцева вакцина
АСЛ	– альбумін сироватковий людини
АПФ-2	– ангіотензин перетворюючий фермент 2-го типу
АФІ	– активний фармацевтичний інгредієнт
ВЕРХ	– вискоєфективна рідинна хроматографія
ВООЗ	– Всесвітня організація охорони здоров'я
ДК	– дієнові кон'юганти
ДМСО	– диметилсульфоксид
ДФУ	– Державна Фармакопея України
ІХС	– ішемічна хвороба серця
МДА	– малоновий диальдегід
мРНК	– матрична рибонуклеїнова кислота
міРНК	– мікро РНК
МО	– Міжнародна одиниця
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
СОД	– супероксиддисмутаза
СФМ	– спектрофотометрія
ТШХ	– тонкошарова хроматографія
ШКТ	– шлунково-кишковий тракт
ASCs	– стовбурові клітини з жирової тканини (англ. – adipose-derived stem cells).
antiRab-Vac	– антирабічна вакцина
BCF	– фактор згортання крові (англ. – blood coagulation factor)
BMSCs	– стовбурові клітини кісткового мозку (англ. – bone marrow-derived stem cells)
CHO	– культура клітин нирок китайського хом'ячка (англ. – Chinese hamster ovary cell)
Chol	– холестерин (англ. – cholesterol)
COVID-19	– коронавірусна хвороба 2019 (англ. – COrona VIRus Disease 2019)

CVS-11	– штам вірусу сказу Challenge Virus Standard
DMPC	– диміристоїлфосфатидилхолін (англ. – dimirystoylphosphocholine)
DMPG	– диміристоїлфосфатидилгліцерин (англ. – dimyristoylphospoglycerol)
DOPC	– диолеоїлфосфатидилхолін (англ. – dioleoylphosphocholine)
DOPE	– диолеоїлфосфатидилетаноламін (англ. – dioleoylphoshoethanolamine)
DOTAP	– 1,2-диолеїлокси-3-[триметиламоній]-пропан (англ. – 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane)
DPPC	– дипальмітоїлфосфатидилхолін (англ. – dipalmitoylphosphatidylcholine)
DPPG	– дипальмітоїлфосфатидилгліцерин (англ. – dipalmitoylphosphatidylglycerol)
DPG	– дифосфатидилгліцерин (англ. – diphosphatidylglycerol)
DSPC	– дистеароїлфосфотидилхолін (англ. – distearoylphosphatidylcholine)
EPC	– яєчний фосфатидилхолін (англ. – egg phophatidylcholine)
fixe-RV	– фіксований штам вірусу сказу
FDA	– Food and Drug Administration
Flury-LEP	– штам вірусу сказу Flury з низьким рівнем пасажів (англ. – low egg passage)
Flury-HEP	– штам вірусу сказу Flury з великим рівнем пасажів (англ. – high egg passage)
HBsAg	– поверхневий антиген вірусу гепатиту В (англ. – Hepatitis B surface antigen)
HDC	– культура диплоїдних клітин людини (англ. – human diploid cells)
HEK	– культура клітин ембріональних нирок людини (англ. human embryonic kidney)
HSPC	– гідрогенізований соєвий фосфатидилхолін (англ. – hydrogenated soybean phophatidylcholine)
Gang	– гангліозид (англ. – ganglioside)
IL	– інтерлейкін (англ. – interleukin)
LAV	– жива атенуйована вакцина (англ. – live attenuated vaccine)
LS	– ліпосома (англ. – liposome), ліпосомальний
MAF	– фактор активації макрофагів (англ. – macrofage activating factor)
MERS	– близькосхідний респіраторний синдром (англ. – middle east respiratory syndrome)

MDP	– мураміддипептид (англ. – muramildipeptide)
MUC-1	– Муцин-1 (англ. – Mucin-1).
ORF	– відкрита рамка зчитування (англ. – open reading frame)
PA	– фосфатидна кислота (англ. – phosphatidic acid)
PC	– фосфатидилхолін (англ. – phosphatidylcholine)
PE	– фосфатидилетаноламін (англ. – phosphatidylethanolamine)
PEG	– поліетиленгліколь (англ. – polyethylene glycol)
PG	– фосфатидилгліцерин (англ. – phosphatidylglycerol)
PI	– фосфатидилінозит (англ. – phosphatidylinositol)
PM	– штам вірусу сказу Pitman Moore
rBCF-VIII	– рекомбінантний фактор згортання крові VIII
RV	– вірус сказу (лат. – <i>Rabdovirus</i>)
SARS	– важкий гострий респіраторний синдром (англ. – severe acute respiratory syndrome)
SC	– стовбурові клітини (англ. – stem cells)
SFPC	– фосфатидилхолін соняшника (англ. – sunflower phosphatidylcholine)
TF	– тканинний фактор (англ. – tissue factor)
Th	– Т-хелпер (англ. – T-helper)
UPLC	– ультраефективна рідинна хроматографія (англ. – ultra-performance liquid chromatography)
Vac	– вакцина (англ. – vaccine)
Vero	– клітини епітелію нирок зеленої африканської мавпи
VSV	– вірус везикулярного стоматиту
α GalCer	– α -галактозилцерамід (англ. – α -galactosylceramide)

ГЛАВА 1. БІОТЕХНОЛОГІЯ ВАКЦИН

Жодний напрям медичної науки не врятував стільки життів, як вакцинологія. Вакцинопрофілактика довела свою ефективність як найбільш економічний спосіб попередження інфекційних захворювань. Людством створені вакцини проти соціально важливих інфекцій, що привело до зникнення віспи та значного зниження захворюваності на дифтерію, правець, кір, туляремію, поліомієліт та ін.

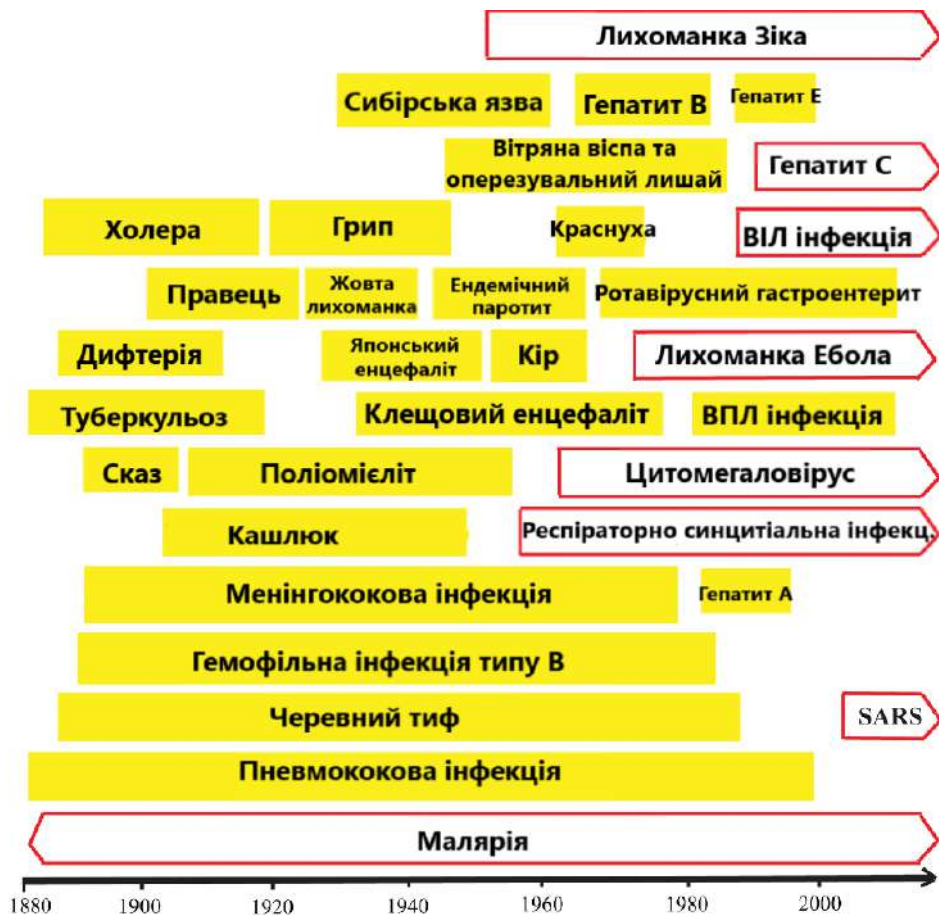


Рисунок 1.1 – Часові рамки розробки вакцин проти різних захворювань за даними ВООЗ: жовтим виділені захворювання, проти яких створені ефективні ліцензовані вакцини; білим виділені захворювання, для яких вакцини ще розробляються. [Chen et al., 2017]. *Скорочення:* ВІЛ – вірус імунодефіциту людини; ВПЛ – вірус папіломи людини; SARS – важкий гострий респіраторний синдром (англ. – severe acute respiratory syndrome). *Примітка.* Вакцина проти малярії випускається з 2021 року, проти лихоманки Ебола – з 2019 року.

Основною метою досліджень в області вакцинології є розробка безпечних та високоефективних вакцинних препаратів. Увесь шлях створення вакцин став можливим лише із використанням основних досягнень сучасної біотехнології: відкриття анатоксинів та можливість їх одержання, створення культур клітин, атенуація вірусів та бактерій, виділення та очистка полісахаридів, створення рекомбінантних технологій. Кожне відкриття у галузях біотехнології та імунології – це наступний крок до створення нових вакцин для профілактики не тільки інфекційних захворювань, але й лікування ряду алергічних, аутоімунних, онкологічних та інших захворювань.

1.1. Антирабічні вакцини для профілактики сказу

Сказ – лат. *Rabies* – є одним із найдавніших неврологічних захворювань, що викликається вірусом сказу – лат. *Rabdovirus* (RV). Вірус належить до роду *Lyssavirus*, сімейства *Rhabdoviridae*. RV – нейротропний, одноланцюговий вірус із негативною РНК. RV викликає у ссавців смертельний енцефаліт, відомий як сказ, що призводить до смерті при розвитку клінічних симптомів та є причиною близько 60 000 смертей у світі щорічно. В Україні в 2019 році вакциновано 20 894 особи, з них 1 938 – з підтвердженим діагнозом «сказ». Вірус потрапляє на периферичну ділянку та поширюється у центральну нервову систему, викликаючи дисфункцію нейронів, що є основною причиною летальності при сказі.

Усі рабдовіруси мають 2 основні структурні компоненти: спіральне ядро нуклеопротеїну і навколишню оболонку (рис. 1.2).

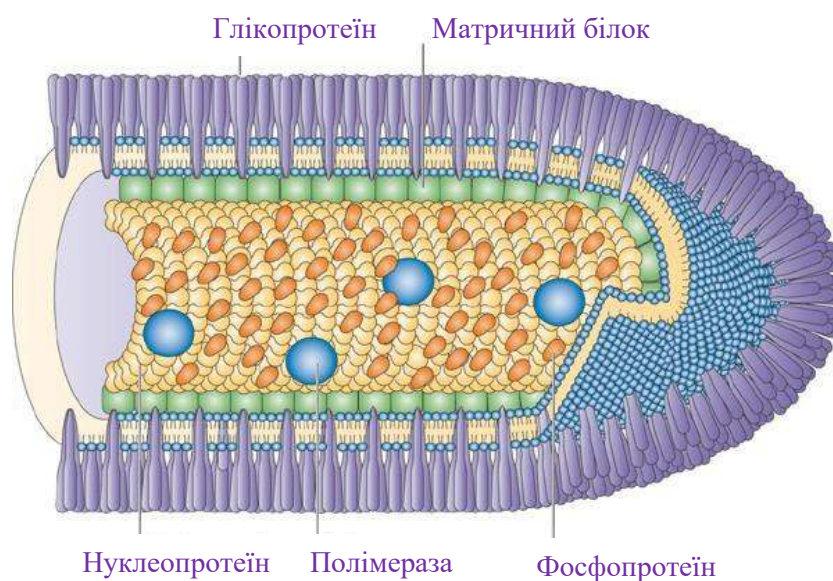


Рисунок 1.2 – Схема будови віріона RV [Schnell et al, 2010]

Геном RV кодує п'ять білків: нуклеопротеїн (N), фосфопротеїн (P), матричний білок (M), глікопротеїн (G), полімеразу (L). G утворює близько 400 шипів, щільно розташованих на поверхні вірусу. Білок M пов'язаний як з оболонкою, так і з нуклеопротеїном і може бути центральним білком зборки RV.

RV проникає у нервову систему, зв'язуючись з нервовими рецепторами, наприклад, рецепторами ацетилхоліну, адгезії нервових клітин, фактором росту нейронів. Потім RV транспортується до центральної нервової системи аксонним (ретроградним) транспортом, можливо, шляхом зв'язування з цитоплазматичним динеїном. В аксонах RV здійснює ретроградний транспорт шляхом переміщення на поверхні трубочок цитоскелета – рухається від плюс-кінців до мінус-кінців (рис. 1.3).

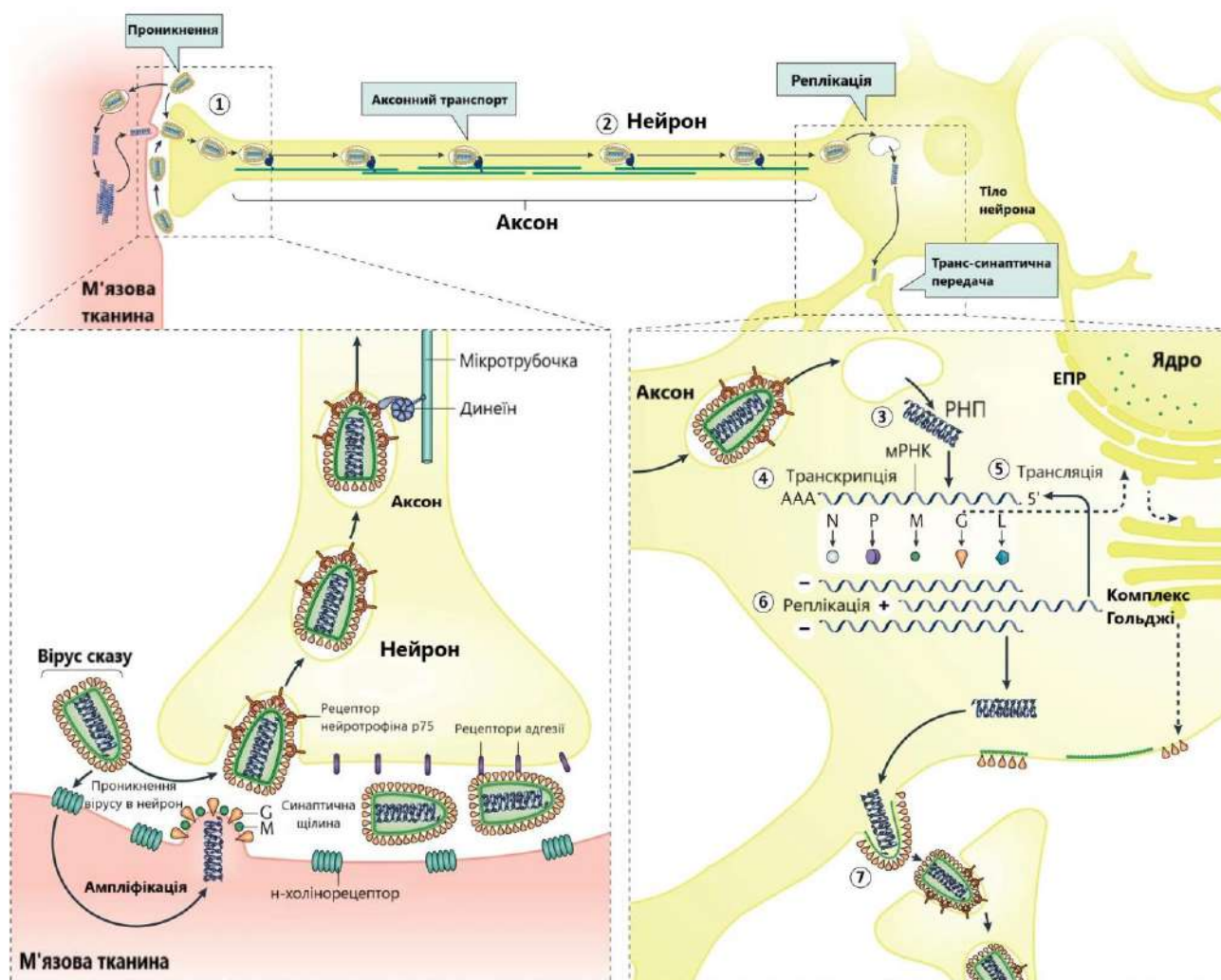


Рисунок 1.3 – Схема проникнення RV у нервову систему [Fooks et al., 2017]: 1) рецепторно-опосередкований ендцитоз RV на пресинаптичній мембрані; 2) ретроградний аксональний транспорт RV до тіла нейрона; 3) вивільнення рибонуклеопротеїну з ендцитарної везикули; 4) транскрипція вірусних мРНК; 5) трансляція вірусних білків; 6) реплікація + транскрипція нових вірусних геномів; 7) транс-синаптична передача вірусу до наступного нейрона.

них білків; б) реплікація повнорозмірних геномів РНК; 7) формування та вихід вірусних частинок з клітини. *Скорочення*: ЕПР – ендоплазматичний ретикулум; РНП – рибонуклеопротеїн.

G – єдиний білок, що експонується на поверхні віріонів. Він є основним вірусним компонентом, що відповідає за індукцію антитіл господаря. G служить важливим імуногеном вакцин (Vas, англ. – vaccine) проти сказу. Розробляються різні конструкції, що експресують білок G, використовуючи параміксовіруси і вектори аденовірусів, які можуть викликати стійкий гуморальний імунітет у відповідь на RV.

Імунобіотехнологія, зокрема, вакцинологія дозволяє запобігти захворюванню на сказ за допомогою вакцинації за умови її своєчасного та правильного проведення.

З часів Луї Пастера (1822–1895 рр.) Vas для людини проти сказу виготовляються з інактивованого RV. З 1880 року Л. Пастер розпочав проведення експериментів, спрямованих на штучне зниження вірулентності збудників інфекційних захворювань та отримання атенуйованих штамів. Вченим були отримані ослаблені штами збудників курячої холери та сибірської язви. Принципи та методи атенуації Л. Пастер використовував при отриманні та практичному використанні Vas проти сказу. Отримавши так званий фіксований RV (fixe-RV) зі стандартним ступенем вірулентності, Пастер вводив RV субоципітально кроликам, викликаючи їх зараження. Потім спинний мозок тварин піддавався висушуванню із різною тривалістю, що викликало атенуацію RV та зменшення кількості живих частинок RV. Ці дослідження дозволили створити антирабічні Vas (antiRab-Vas). Л. Пастер застосував свої відкриття вже не на тваринах, а на людині: з Ельзасу до нього привезли хлопчика, якого покусав собака, уражений вірусом сказу. Пастер почав курс, що складається з 13 ін'єкцій емульгованого матеріалу спинного мозку кролика, через три дні після того, як дитина була укушена. 90 пасажів було використано Л. Пастером для першої Vas із fixe-RV. Vas проти RV, розроблена Л. Пастером, була отримана на основі нервової тканини, а RV було інактивовано шляхом висушування.

Вперше вакцинацію проти сказу провели за допомогою мозкової Vas, зареєстрованої Л. Пастером у 1885 році. Однак дана Vas представляла небезпеку, зумовлену можливістю активації RV та розвитку алергічних реакцій через присутність у нервовій тканині мієліну. Пізніше безпечність Vas була підвищена за рахунок інактивації RV фенолом (1911 р.). Однак після застосування як і рані-

ше спостерігалися серйозні побічні ефекти, у тому числі кілька випадків паралічу та смерті. Основним фактором є гіперчутливість до мієліну. Згодом було виявлено, що кількість мієліну у Vac можна знизити при використанні новонароджених мишей, що мають менший вміст мієліну в мозку.

В Україні до початку 80-х років застосовувалась ліофілізована antiRab-Vac типу Фермі, виготовлена з мозку овець, заражених fixe-RV. Гомогенізований мозок у розчині 0,9 % NaCl, що містить 1,0 % фенолу, інактивують протягом 8 діб при температурі 20–22 °C. У Vac додають сахарозу та ліофілізують. При застосуванні Vac спостерігалися серйозні побічні ефекти, пов'язані з гіперчутливістю до мієліну. Крім того, необхідно враховувати наявність у мозкових Vac типу Фермі різних імунохімічно активних ліпідів, які можуть призводити до появи протиліпідних антитіл. Необхідно зазначити, що у складі мозкової тканини містяться гангліозиди, які можуть бути рецепторами для зв'язування з RV. Дослідження гангліозидів, виділених з мозку великої рогатої худоби (GT1 та GD1a), у дослідах *in vitro* та *in vivo* показало антивірусну активність при зараженні тварин RV на ранніх стадіях. Виживання у порівнянні з контролем (загибель 100 % тварин) становила від 20 до 60 % (активність вірусу – 50–100 LD₅₀) залежно від концентрації гангліозидів.

Як видно з наведених даних, спочатку antiRab-Vac отримували з нервової тканини. Сьогодні ж antiRab-Vac виробляють переважно на основі клітинних культур та ембріонів птахів. Перед фахівцями стояло завдання створення виробництва antiRab-Vac на біологічних субстратах, вільних від нервової тканини. Vac почали отримувати на основі клітинних культур ембріонів птахів для культивування RV: качиних, а згодом і курячих. Vac на основі клітинних культур містять RV, що розмножується у клітинних субстратах. У процесі розробки Vac, що містять інактивованій RV, запропоновано використання інших клітин: первинної культури клітин нирок хом'яка, диплоїдної культури клітин людини (HDC, англ. – human diploid cells), клітин Vero та ін. Одночасно з цими дослідженнями жосліджено можливість використання різних штамів RV (табл. 1.1). Дослідження на людях Vac, що містять вірус Flury з низьким рівнем пасажів (Flury-LEP) на курячих ембріонах, показали відсутність побічних ефектів. Однак ці Vac відрізнялися недостатньою імуногенністю. Використання RV штаму Flury з великою кількістю пасажів (Flury-HEP) збільшувало імуногенність Vac порівняно з препаратом на основі Flury-LEP, але вона була меншою порівняно з мозковою Vac. Vac з інактивованим вірусом Flury, вирощеним на культурі ка-

чних ембріонів виявилася більш ефективною, але її імуногенність виявилася нижчою, ніж у мозкових Vac.

Надалі були проведені дослідження з використанням культури фібробластів плода людини, які являли собою HDC з обмеженою тривалістю життя. Незабаром було показано, що фібробласти плода чутливі до вірусів людини та вільні від латентних вірусів. На початку 1960-х років для розмноження RV була використана високоімуногенна лінія HDC. Vac на HDC були вперше ліцензовані в Європі у 1976 р., а в США – у 1980 р., і застосовуються до сьогодні. У 1985 р. отримана очищена концентрована Vac проти сказу на клітинах Vero, яка має високу імуногенність на рівні Vac на HDC.

На сьогоднішній день вимоги до antiRab-Vac, розроблені ВООЗ, представлені в серії технічних доповідей, опублікованих у різні роки, в яких вимоги до antiRab-Vac постійно підвищуються. У доповідях наведено основні вимоги до виробництва та контролю antiRab-Vac для людини. У документі докладно описані культури клітин та вимоги до них, а також розглянуті штами RV, які дозволені до використання для отримання antiRab-Vac, їх контроль, описані стандарти та основні положення технології виробництва: культивування, очистка, інактивація, ад'юванти (гідроксид алюмінію), вимоги до Vac на різних стадіях виробництва.

За минулий період було розроблено antiRab-Vac, отримані вирощуванням RV на культурі клітин качиних ембріонів. Однак ці Vac мають меншу імуногенність порівняно з Vac з тканини мозку. Для препаратів з культури клітин качиних ембріонів рекомендовано від 14 до 23 щоденних щеплень, але іноді навіть такі високі дози не захищають від розвитку захворювання після інтенсивного контакту із джерелом зараження. Інший недолік цих Vac полягає в тому, що Vac також містили білки мієліну, які викликали побічні реакції, внаслідок чого препарат був заборонений ВООЗ.

Надалі antiRab-Vac отримували у культурі клітин та тканин. Vac, виготовлені з використанням культур клітин, були не тільки безпечнішими порівняно із застосуванням Vac на основі мозкової тканини через відсутність нейротропної тканини, але й більш ефективними.

Пізніше були отримані такі antiRab-Vac:

- ✓ очищена качина ембріональна antiRab-Vac;
- ✓ antiRab-Vac на основі HDC;
- ✓ очищена antiRab-Vac на основі клітин курячих ембріонів;
- ✓ очищена antiRab-Vac на основі клітин Vero;

✓ адсорбована antiRab-Vac, одержана на первинній культурі клітин нирок хом'яків.

Технологічний процес, що привів до розробки зазначених вище Vac, включав: адаптацію штаму Pitman Moore RV до стабільних клітинних ліній, таких як клітини Vero («AbhayRab[®]» та «VeroRab[®]») та HDC MRC-5. Vac на основі HDC вважається препаратом золотого стандарту.

Сьогодні для отримання antiRab-Vac використовуються різні штами RV та культури клітин (табл. 1.1).

Таблиця 1.1 – Культури клітин та штами RV, які використовуються для отримання antiRab-Vac для людини

Тип культури клітин	Штами RV
✓ HDC – диплоїдна культура клітин людини	✓ Flury-LEP – 40–50 пасажів
✓ Первинна культура клітин нирок собак	✓ Flury-NEP – 227–330 пасажів
✓ Vero – клітини епітелію нирок зеленої африканської мавпи	✓ Pitman moore
✓ BNK 21 – культура нирок новонароджених хом'яків	✓ Внуково 32
✓ Первинна культура курячих ембріонів	✓ Paris Pasteur
✓ Первинна культура клітин нирок хом'яків	✓ Rabbit fix
✓ Первинна культура клітин курячих ембріонів	✓ Street-Alabama Duffering
	✓ Challenge Virus Standard (CVS) 11

В даний час для профілактики сказу у людей використовуються Vac, отримані з різних штамів RV з використанням культур клітин різного походження (табл. 1.2).

В даний час широко використовуються такі antiRab-Vac, як «Rabavert[®]» і «Rabipur[®]», представлені інактивованими RV. Оскільки інактивовані Vac не можуть викликати сильний імунітет для забезпечення довгострокового захисту від інфекції RV, реципієнти повинні отримувати кілька щеплень протягом певного часу, що потребує нових технологічних підходів до створення Vac. «Rabipur[®]» – перша очищена Vac, отримана на клітинах курячого ембріона, яка була ліцензована в Німеччині в 1984 році, а потім ще в 60-ти країнах. Імуногенність Vac «Rabipur[®]» була підтверджена під час численних клінічних випробувань.

Таблиця 1.2 – Характеристика інактивованих antiRab-Vac для людини

Назва вакцини	Штам	Культура клітин	Вид очистки	Інактиватор	Допоміжні речовини на дозу	Виробник
Rabipur, ліоф. > 2,5 МЕ	Flury LEP	Фібробласти курячих ембріонів	Зональне ультрацентрифугування в градієнті щільності сахарози	β -пропіолактон	Сахароза – 75 мг, полігелін – 10 мг	Chiron Behring vaccines, Індія
Verorab, ліоф. > 2,5 МЕ	Wistar Rabies PM W 138-1503-34	Vero	Зональне ультрацентрифугування в градієнті щільності сахарози	β -пропіолактон	Мальтоза – 26,3 мг, АСЛ – 2,5 мг	Sanofi Pasteur, Франція
Indirab, ліоф. > 2,5 МЕ	PM	Vero	Хроматографія, ультрафільтрація	β -пропіолактон	Мальтоза – 25,0 мг, АСЛ – 5 мг, мертиолат 0,01 %	Bharat Biotech, Індія
Кокав, ліоф. > 2,5 МЕ	Внуково 32	Клітини нирок сирійських хом'яків	Ультрафільтрація	УФ-опромінення	АСЛ – 10 мг; сахароза 75 мг, полигелін – 10 мг	НПО «Микроген», Росія
Imovax rabies, ліоф. > 2,5 МЕ	Wistar Rabies PM W 138-1503-3M	HDC	Ультрафільтрація	β -пропіолактон	АСЛ – 100 мг, неоміцин – 150 мкг	Sanofi Pasteur, Франція
RabAvert, ліоф. > 2,5 МЕ	Fix virus, Flury LEP	Курячі фібробласти	Зональне ультрацентрифугування в градієнті щільності сахарози	β -пропіолактон	АСЛ – 0,3 мг, Na-ЕДТА – 0,3 мг, натрію глютамін – 1 мг, полігелін – 12 мг	Glaxo Smith Kline, Бельгія

Примітка. АСЛ – альбумін сироватковий людини; PM – штам RV Pitman Moore; Vero – епітеліальні клітини нирок зеленої африканської мартинки; Полігелін – полімер сечовини та поліпептидів із денатурованого желатину великої рогатої худоби.

«Rabipur[®]» виготовляється з використанням штаму RV Flury-LEP, вирощеного на культурі клітин первинних фібробластів курячих ембріонів. Вірус у Vac інактивують β-пропіолактоном та очищають за допомогою безперервного центрифугування у градієнті щільності. В результаті одержують висококонцентрований препарат, стабілізований полігеніном, з наступною ліофілізацією. «Rabipur[®]» виробляється у м. Марбург (Німеччина) та м. Анклешвар (Індія).

Нижче наведено технологічну схему antiRab-Vac, отриману з використанням RV Pitman Moore та культури клітин курячих фібробластів:

1 стадія – приготування культури клітин качиних та курячих ембріонів за класичною схемою (9–11 днів, при температурі 35–37 °C та 70–90 % вологості, трипсинізація та центрифугування);

2 стадія – зараження первинної культури фібробластів качиних ембріонів RV – 7 пасажів (адаптація), після чого отриманий штам культивують на культурі фібробластів курячих ембріонів – 4 пасажі; відібрані ембріони трипсинізують, центрифугують і суспендують клітини у ростовому середовищі до кінцевої концентрації $1,7 \times 10^6$ клітин/мл;

3 стадія – суспензію трипсинізованих клітин фільтрують через нейлоновий фільтр, центрифугують (1000–1500 об./хв, 15 хв, при 2–4 °C). Осад клітин суспендують у свіжому ростовому середовищі, перемішують і повторно центрифугують за тих же умов. Суспензію клітин перемішують протягом 5–10 хв при 35 ± 2 °C. Кінцеву концентрацію клітин доводять ростовим середовищем до концентрації $1,4$ – $2,2 \times 10^6$ клітин/мл;

4 стадія – суспензію клітин інокулюють RV та інкубують (90–120 хв при 35 ± 2 °C) при перемішуванні для адсорбції вірусу на клітинах. Інфіковану RV суспензію клітин з вірусом інкубують при температурі $34,5 \pm 0,5$ °C протягом 6 днів;

5 стадія – на 4–5 день культивування супернатант відбирають (1-й збір) та додають свіже ростове середовище, на 7–8 день відбирають 2-й збір. Збори зберігають при 2–8 °C;

6 стадія – об'єднані збори вірусу очищають та концентрують за допомогою ультрацентрифугування у градієнті щільності сахарози на зональній центрифuzі при 35 000 об./хв. Відбирають відповідні ділянки, що містять живий RV, при концентрації сахарози 35–40 %. Концентрат RV на період контролю зберігають при мінус 60 °C. Проводять контроль стерильності, ендотоксинів, імуногенності та ін.;

7 стадія – концентрат розморожують при 37 °С та охолоджують при 4±2 °С, розводять стабілізуючим розчином (сахароза, гідролізований желатин, альбумін сироватковий людини, солі натрію) до вмісту антигену 8,5 МО/мл. рН Vac доводять до 8±1 за допомогою 10 %-вого NaOH;

8 стадія – до вірусної суспензії додають β-пропіолактон до кінцевої концентрації 0,025 %. Інкубацію проводять при 2–6 °С та постійному перемішуванні не менше 48 годин до повної інактивації RV;

9 стадія – наповнення первинної упаковки, ліофілізація та герметизація;

10 стадія – контроль Vac.

На теперішній час продовжуються дослідження щодо створення нових форм antiRab-Vac. Дослідження проводяться за кількома напрямками (рис. 1.4):



Рисунок 1.4 – Види вакцин проти RV [Krasnopolsky et al., 2021]

1. Живі атенуйовані Vac (live attenuated vaccine) – LAV. На відміну від інактивованих Vac, LAV імітують природну інфекцію і часто однієї дози достатньо, щоб викликати стійку імунну відповідь. Досі, незважаючи на широке використання LAV для оральної вакцинації проти сказу диких тварин (лисиці, єноти та ін.), LAV проти сказу домашніх тварин та людей ще немає. Всі LAV, що використовуються для диких тварин, отримують у результаті багатократно-

го пасажу штамів SAD (Street Alabama Dufferin) у культурі клітин, тому їх можливе повернення до вірулентності може стати практичним обмеженням для їх подальшого розвитку та використання для імунізації домашніх тварин і особливо для людини.

2. Пептидні Vac. Відомі роботи зі створення пептидних Vac проти сказу. Вивчено ефективність білкової субодиниці (очищеного від інфікованих клітин G-білка) для захисту від сказу. G-білок вірусу сказу є основним антигеном, який відповідає за захисний імунітет проти RV. У дослідженні G-білок RV був введений у клітину дріжджів та отримані рекомбінантні клітинні екстракти, що містять G-білок RV, який захищав морських свинок від летального зараження RV при внутрішньом'язовому введенні. Однак ці екстракти не захищали мишей, заражених RV внутрішньочеребрально. В цілому Vac на основі білкових субодиниць RV є низькоімуногенними і можуть викликати обмежені імунні відповіді.

3. AntiRab-Vac рослинного походження є препаратами на основі трансгенних рослин, в геном яких вбудований відповідний фрагмент геному патогенного мікроорганізму. У літературі наведено дослідження щодо використання кукурудзи та тютюну для експресії G-білка RV для отримання «їстівної» Vac. Рослинні Vac поки що не знайшли застосування, незважаючи на те, що питанням створення таких Vac проти RV та інших інфекцій займаються протягом багатьох років.

4. Ліпосомальні antiRab-Vac. Показано, що ліпосомальна antiRab-Vac сприяє виробленню нейтралізуючих антитіл до RV у мишей лінії BALB/c. Емульсією ліпосом готували з гідрогенізованого фосфатидилхоліну сої та холестерину. Така antiRab-Vac складається з ліпосомальної емульсії та інактивованої antiRab-Vac проти RV. Імунну відповідь порівнювали між мишами, які отримували ліпосомальну antiRab-Vac та звичайну інактивовану antiRab-Vac. У мишей, імунізованих ліпосомальною antiRab-Vac, спостерігали вищі титри інтерлейкіну-2, інтерферону- γ та активності відповідних клітин-кілерів, ніж у мишей, імунізованих звичайною інактивованою antiRab-Vac. Дані авторів показали вище виживання мишей, які отримали 3 ін'єкції ліпосомальної antiRab-Vac (56,2 %), ніж тих, які отримали 5 ін'єкцій інактивованої antiRab-Vac (40,6 %).

5. AntiRab-Vac на основі РНК. В останнє десятиліття однією зі стратегій боротьби з інфекційними захворюваннями є вакцинація РНК-Vac. На відміну від ДНК-Vac, які мають потенційний ризик інтеграції у геном господаря, Vac на основі РНК усувають цю небезпеку. Крім того, ДНК-Vac повинні доставлятися

в ядро і транскрибуватися всередині ядра для експресії антигену, що може бути неефективним для деяких клітин. Навпаки, РНК-Vac безпосередньо транслюються до цитоплазми, що не тільки усуває необхідність доставки в ядро, але призводить до швидкої експресії антигену. Vac на основі РНК мають високу імуногенність і призводять до стійких результатів. Стимулом для розвитку antiRab-РНК-Vac може бути успішне застосування РНК-Vac для профілактики COVID-19 фірм Pfizer і Moderna. Наприклад, Vac фірми Pfizer є модифікованим нуклеоїдом мРНК, що кодує мутантну форму білка-шипа SARS-CoV-2, який інкапсульований у біодеградабельні ліпідні наночастинки.

6. AntiRab-Vac на основі вірусних векторів. В даний час запропоновано ряд antiRab-Vac на основі відомих вірусів: везикулярного стоматиту, парагрипу типу 5, хвороби Ньюкасла, віспи, аденовірусів людини та ін. Гено-інженерні Vac на основі вказаних вірусних векторів дозволяють доставляти у клітини людини або тварини тільки гени, які кодують синтез необхідних антигенів, що дозволяє не використовувати при отриманні Vac живі патогенні віруси. Сьогодні рекомбінантні Vac широко застосовують для боротьби зі сказом у диких м'ясоїдних тварин. Виділено клон вірусу вісповакцини, що утворює поверхневий G-білок RV. Отримано Vac, що містить рекомбінантний вірус коров'ячої віспи, що несе ген G-білку оболонки RV. Vac часто використовуються перорально для імунізації лисиць. Створено Vac на основі аденовірусу собак.

7. Vac проти сказу, одержані з використанням методу зворотної генетики. Зворотна генетика дозволяє виявляти функції генів. Дослідники маніпулюють послідовністю генів, змінюючи або вимикаючи той чи інший ген, і аналізують до яких змін це призводить. Це шлях зворотної генетики – від гена до ознак, що дозволив створити нове покоління antiRab-Vac. Зворотні генетичні методи пропонують альтернативне рішення для розробки безпечних та ефективних LAV для профілактики сказу, наприклад, амінокислота у положенні 333 глікопротеїду (G) у декількох фіксованих штамів RV відповідає за патогенність у дорослих мишей. Встановлено, що аргінін у положенні 333 сприяє реверсії патогенності. В роботі з живою ослабленою antiRab-Vac запропоновано реплікон, в якому провели заміну структурних генів венесуельського кінського енцефаліту (VEEV) на G-білок RV. Плазмиду VEEV-RV-G було сконструйовано з використанням стандартних методів рекомбінантних ДНК. Отриману глікопротеїдну послідовність ампліфікували з використанням інфекційного клону як матриці та клонували у вектор експресії реплікону альфа вірусу VEEV у сайтах AscI та PacI.

Щоб додатково охарактеризувати VEEV-RV-G, частинки VEEV-RV-G очищали ультрацентрифугуванням і проаналізували білковий склад цих частинок за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі. Білок RV-G був єдиним структурним білком RV, виявленим у вірусних частинках.

Об'ємні сферичні частинки розміром близько 60–90 нм спостерігалися на поверхні клітин, інфікованих VEEV-RV-G, порівняно з типовими частинками RV у формі кулі. Показано, що VEEV-RV-G може збирати вірусні інфекційні частинки, які сильно відрізняються від RV як за формою, так і за розмірами.

G-білок RV забезпечує ефективне пакування химерної РНК реплікону в інфекційні частинки, які можуть самопоширюватися в культурі клітин у високих титрах. Частинки VEEV-RV-G були сильно ослаблені у мишей-сосунків і могли викликати сильні гуморальні імунні відповіді у відносно низьких дозах. Мишей вакцинували VEEV-RV-G внутрішньом'язово, що захищало тварин від смерті при внутрішньоцеребральному зараженні RV.

Створенню, вивченню та використанню antiRab-Vac присвячено низку досліджень та оглядових матеріалів. Роботи останніх років присвячені ефективності існуючих antiRab-Vac та перспективам їхнього розвитку.

При розробці та виробництві Vac важливим є збереження стабільності штамів, що використовуються. Розвиток молекулярної біології та біотехнології дозволяє підтвердити справжність штамів RV та їх стабільність. Проведено аналіз штаму Внуково-32, який застосовується при отриманні культурної очищеної інактивованої сухої antiRab-Vac («Кокав», Росія). Показано, що структура РНК штамів RV Внуково-32, CVS-11, кодуєчої частини фрагмента G-білка відповідає аналогічному фрагменту РНК у RV. Структура РНК штаму RV довжиною 539 п.н., що кодує фрагмент G-білка, є стабільною на всіх етапах технології. Показано можливість застосування рестрикційного аналізу для підтвердження справжності штаму RV Внуково-32 на всіх етапах виробництва, включаючи готову форму Vac.

Нині інактивовані вірусні Vac знайшли широке застосування для профілактики низки інфекцій. Деякі інактивовані вірусні Vac використовуються вже протягом десятиліть і зазвичай добре переносяться. Оскільки віруси при вирощуванні *in vitro* зазвичай виходять у клітинне культуральне середовище, їх відокремлюють від інфікованих культур. Великий розмір частинок вірусів порівняно з іншими макромолекулами середовища дозволяє легко відокремити частинки з використанням простих технологій очищення, що ґрунтуються на розподілі частинок за розміром. До таких Vac належать вірус поліомієліту, вірус

грипу, RV і вірус японського енцефаліту. В альтернативному підході, який застосовується у випадку вбитої вірусної Vac (гепатит А, COVID), інфіковані клітини піддають лізису та проводять очищення вірусних частинок. Вірусні частинки інактивуються хімічним шляхом, зазвичай, за допомогою обробки β -пропіолактоном, формаліном, опроміненням, а потім дія інактивованого вірусу може посилюватися за рахунок ад'ювантів (наприклад, гідроксиду або фосфату алюмінію). Можливе використання ліпосом для посилення імуногенності вірусних Vac. Інактивовані вірусні Vac зазвичай мають високу імунологічну активність, наприклад, 1 доза Vac гепатиту А забезпечує захист у кількості 50 нг. Таким чином, ця класична стратегія, що характеризується бездоганною історією створення добре переносимих та ефективних Vac, залишається досить перспективною технологією, що обирається для багатьох вірусних Vac, зокрема antiRab-Vac.

Контрольні запитання

1. У чому актуальність виробництва вакцини проти сказу?
2. Що собою представляє віріон вірусу сказу?
3. Як вірус сказу поширюється в організмі?
4. Які види вакцин проти вірусу сказу Вам відомі?
5. Які штами вірусу сказу використовують для виробництва вакцин?
6. Які культури клітин використовують для вирощування вірусу сказу?
7. Назвіть основні етапи технології одержання інактивованої вакцини проти сказу.
8. Які переваги та недоліки живої атенуйованої вакцини проти сказу?
9. Які переваги та недоліки пептидної вакцини проти сказу?
10. Які переваги та недоліки вакцини проти сказу рослинного походження?
11. Які переваги та недоліки ліпосомальної вакцини проти сказу?
12. Які переваги та недоліки вакцини проти сказу на основі РНК?
13. Які переваги та недоліки вакцини проти сказу на основі вірусних векторів?
14. Які переваги та недоліки вакцини проти сказу, одержаної на основі методів зворотної генетики?

Список джерел інформації

1. Антонова Л. А. История борьбы с бешенством в Украине со времен Пастера до наших дней / Л. А. Антонова, И. Ф. Маковецкая., Т. М. Крупинина // *Актуальна інфектологія*. – 2021. – Т. 9, № 1. – С. 6–16.
2. Schnell M. J. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain / M. J. Schnell, J. P. McGettigan, C. Wirblich, A. Papaneri // *Nature Reviews Microbiology*. – 2010. – Vol. 8, No. 1. – P. 51–61.
3. Chen Y.-C. Nanotechnologies Applied in Biomedical Vaccines / Y.-C. Chen, H.-F. Cheng, Y.-C. Yang, M.-K. Yeh // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2017. – Vol. 5. – P. 57–72.
4. Fooks A. R. Rabies / Fooks A.R., Cliquet F., Finke S. et al. // *Nature Reviews Disease Primers*. – 2017. – Vol. 3. – Article 17091.
5. Краснопольский Ю. М. Исследование действия некоторых ганглиозидов на резистентность мышей к вирусу бешенства / Ю. М. Краснопольский, В. И. Швец // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 1987. – Т. CIV, № 12. – С. 698–699.
6. Zhu S. Reverse genetics of rabies virus. New strategies to attenuate virus virulence for vaccine development / S. Zhu, H. Li, C. Wang // *Journal of NeuroVirology*. – 2015. – Vol. 21. – P. 335–345.
7. Plotkin S. A. Vaccine production in human diploid cell strains / S. A. Plotkin // *American Journal of Epidemiology*. – 1971. – Vol. 94, No. 3. – P. 303–306.
8. Giesen V. 30 years of rabies vaccination with Rabipur: a summary of clinical data and global experience / V. Giesen, D. Gniel, C. Malerczyk // *Expert Review of Vaccines*. – 2015. – Vol. 14, No. 3. – P. 351–367.
9. Комитет экспертов ВОЗ по бешенству. Серия технических докладов / Всемирная организация здравоохранения. – Женева, 1986. – № 709. – С. 13–22.
10. WHO Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs. Technical Report Series. Annex 2 / World Health Organization, 2007. – Vol. 941. – P. 83–132.
11. WHO Expert Consultation on rabies. Technical report series / World Health Organ, 2018. – Vol. 931. – P. 1–88.
12. Абрамова Е. Г. Бешенство и антирабические иммунобиологические препараты: от прививок Пастера к современным биотехнологиям / Е. Г. Абрамова, А. К. Никифоров, А. А. Мовсисянц // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2019. – № 5. – С. 83–94.

13. Zhang Y. N. A novel rabies vaccine based in infectious propagating particles derived from hybrid VEEV- Rabies replicon / Y. N. Zhang, C. Chen, C. L. Deng et al. // *EBioMedicine*. – 2019. – Vol. 56. – Article 102819.
14. Ashzef S. High level expression of surface glucoprotein of rabies virus tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice / S. Ashzef, P. K. Singh, D. K. Yadav // *Journal of Biotechnology*. – 2005. – Vol. 119. – P. 1–14.
15. Miao L. Enhanced immune response to rabies viruses by the use of a liposome adjuvant vaccines / L. Miao, V. Yang, M. Yan et al. // *Virus Immunology*. – 2017. – Vol. 30, No. 10. – P. 727–733.
16. Zhu S. Rabies control and treatment: from prophylaxis strategies with curative potencial / S. Zhu, C. Cuo // *Viruses*. – 2016. – V.8, No.11. – P. 279–290.
17. Dietzschold B. Induction of protective immunity against rabies by immunization with a rabies virus ribonucleoprotein / B. Dietzschold, H. H. Wang, C. E. Rupprecht et al. // *PNAS*. – 1987. – V. 84, No. 24. – P. 9165–9169.
18. Седова Е. С. Новые антирабические рекомбинантные вакцины. БИО-препараты / Е. С. Седова, И. М. Шмарев // *Профилактика, диагностика лечение*. – 2016. – Т. 6. № 4. – С. 219–228.
19. Шишков А. В. Исследование иммуногенетических и протективных свойств антирабической живой вакцины «Ферарибавик» для диких плооядных животных / А. В. Шишков, Д. А. Лозовой, А. В. Борисов, Д. В. Михалишин // *Ветеринария сегодня*. – 2020. – № 1 (32). – С. 31–37.
20. Игнатъев Г. М. Молекулярно-генетические исследования стабильности и подтверждение подлинности штамма Внуково-32, применяемого для производства вакцины антирабической культуральной очищенной инактивированной сухой / Г. М. Игнатъев, А. С. Оксалич, Л. П. Антнова и др. // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика и лечение*. – 2020. – Т. 20, № 2. – С. 107–115.
21. Krasnopolsky Yu. M. Biotechnological research in the creation and production of antirabic vaccines / Yu. M. Krasnopolsky, D. M. Pylypenko // *Bionecnologia Acta*. – 2021. – Vol. 14, No. 4. – P. 28–37.

1.2. Вакцини для профілактики COVID-19

11 березня 2020 року ВООЗ визнала спалах захворювання на коронавірус пандемією. Пандемія раніше невідомого коронавірусу SARS-CoV-2, що викликає атипову пневмонію COVID-19 (англ. – COrona VIRus Disease 2019), призвела до смерті мільйонів людей на планеті. Найважливішою протидією цьому захворюванню є вакцинація та створення колективного імунітету у населення. Розробці вакцин (Vac, англ. – vaccine) проти COVID-19 присвячені дані матеріали.

1.2.1. Будова коронавірусу SARS-CoV-2

Коронавіруси (лат. – *Coronaviridae*) являють собою крупні оболонкові РНК-віруси, геном яких представлений позитивною одноланцюговою РНК довжиною від 25 до 32 т.п.н. Вперше коронавіруси були описані в 60-х роках ХХ-го століття як збудники гострих респіраторних інфекцій. Високо патогенні коронавіруси були причиною важкого гострого респіраторного синдрому (SARS, англ. – Severe Acute Respiratory Syndrome) з високою летальністю у 2002 році – SARS-CoV, а потім у 2013 році як збудники близькосхідного респіраторного синдрому (англ. – Middle East Respiratory Syndrome) – MERS-CoV. Геном вірусу SARS-CoV-2 є високогомологічним з геномом вірусу SARS-CoV.

Розрізняють чотири субродини коронавірусів: α - та β -коронавіруси, які інфікують лише ссавців, γ - і δ -коронавіруси, які вражають переважно птахів. Вірус SARS-CoV-2 є β -коронавірусом. Як і інші коронавіруси, віріони SARS-CoV-2 мають сферичну або овальну форму і діаметр від 60 до 140 нм. Віріон коронавірусів вкритий ліпідною оболонкою з чітко помітними на електронно-мікроскопічних знімках булавовидними шипами (англ. spike) довжиною 10 нм. Коронавіруси містять чотири структурні білки: шипові (S), оболонкові (E), мембранні (M) та нуклеокапсидні (N) (рис. 1.5).

Білок S зв'язується з рецепторами клітини-мішені і запускає інфекційний процес. Білки M взаємодіють один з одним та з мембраною, яку вірус захоплює із ураженої клітини і в результаті утворюється вірусна оболонка. Білок E формує пентамерні іонні канали, які руйнують мембрани клітин у ході брунькування вірусів. Пентамери білка E є тільки у представників *Coronavirinae*, вони присутні в кількості всього декількох копій на віріон і являють собою важливий фактор вірулентності. N-білки упаковують вірусну РНК у вигляді спіралі і відіграють важливу роль у зборці віріону. SARS-CoV-2 має додатковий шар протеїнів оболонки – гемагглютинінестераз (HE), які приймають участь у взаємодії з

клітиною-мішенню. Основна частина генома коронавірусів консервативна, проте він легко піддається генетичній рекомбінації, тож вірус може бути перенацілений з диких тварин на людину шляхом зміни структури білка S.

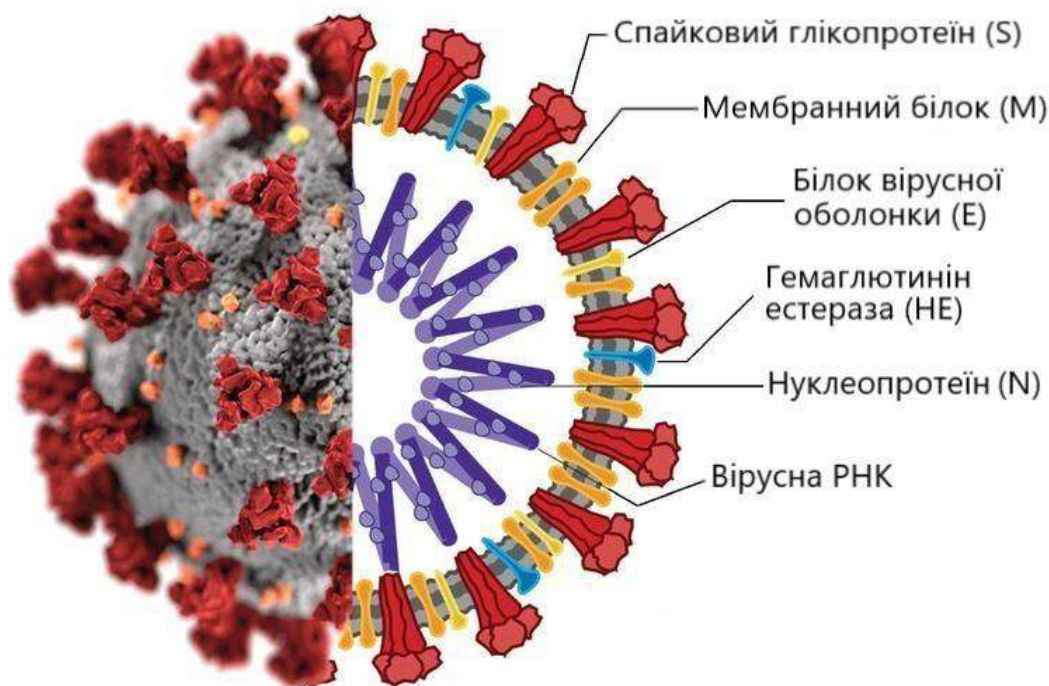


Рисунок 1.5 – Структура SARS-CoV-2 [Yamamoto et al., 2020]

Вперше геном SARS-CoV-2 під назвою Wuhan-Hu-1 було виділено та секвеновано в Китаї у січні 2020 р. Геном SARS-CoV-2 має 96 % подібності до коронавірусу кажана BatCoV-RaTG13, 82% ідентичності з геномом SARS-CoV та 70% – з геномом MERS-CoV.

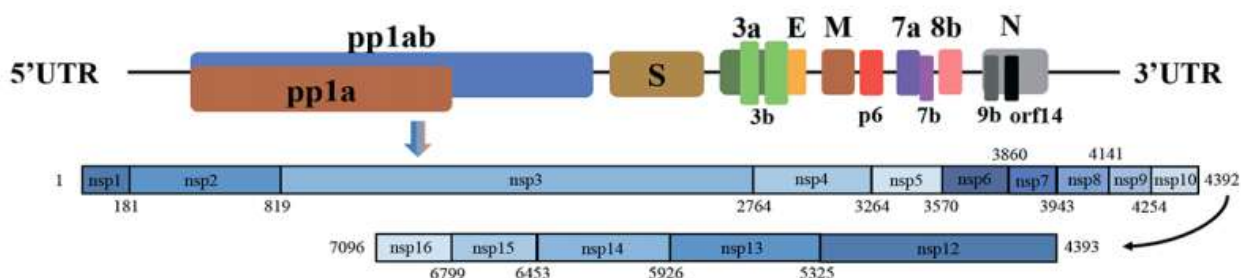


Рисунок 1.6 — Геном SARS-CoV-2 [Волянський та ін., 2020]

Спіральний нуклеокапсид сформований з N-білка в комплексі з РНК(+), яка складається з 5'-термінальної кеп-структури та 3'-поліаденільованого «хвоста». РНК SARS-CoV-2 має 14 відкритих рамок зчитування (ORF, англ. – Open

Reading Frame), що кодують 27 білків. 5'-кінець генома містить гени ORF1ab та ORF1a. ORF1ab – найбільший ген (складає 2/3 генома), що кодує білок pp1ab, який розщеплюється на 16 неструктурних протеїнів (nsp), що беруть участь в транскрипції і реплікації. 3'-кінець РНК кодує структурні білки: S, E, M та N, а також містить 8 допоміжних білків (3a, 3b, р6, 7a, 7b, 8b, 9b та ORF14). Допоміжні білки відіграють роль в ухиленні коронавірусу від імунної відповіді, включаючи інгібування інтерферонів I типу (3b та 6), стимулювання апоптозу (3a, 3b, 8a), припинення синтезу клітинної ДНК (6, 8b), стимуляції синтезу хемокінів (3a стимулює ліганди CCL5 і CXCL8) та розвитку запалення (7a та 7b активують запалення через NF- κ B та MAPK-8).

1.2.2. Патогенез SARS-CoV-2

В умовах організму основними клітинами-мішенями для коронавірусів є епітеліальні клітини та макрофаги, що мають на своїй поверхні спеціальні рецептори, які розпізнає та з якими взаємодіє поверхневий білок S вірусу. На поверхні розташовані пепломери, кожен з яких містить три однакових S глікопротеїни, складені з трьох компонентів: поверхневий S1 взаємодіє з клітинним рецептором, а S2 і S3 – запускають процес злиття вірусної мембрани з клітинною. SARS-CoV-2 використовує в якості рецепторів для проникнення в клітину CD147-глікопротеїн та ангіотензин перетворюючий фермент 2-го типу (АПФ-2). Молекула S-білка SARS-CoV-2 ідентична такому SARS-CoV, однак у SARS-CoV-2 ділянка, що зв'язується з рецептором АПФ-2, має підвищену афінність до своєї мішені, що може пояснити легкість, з якою новий вірус інфікує клітини і поширюється. Після зв'язування вірусу SARS-CoV-2 з рецептором комплекс SARS-CoV-2/АПФ-2 проникає в клітину за допомогою механізмів злиття мембрани віріона з мембраною клітини або шляхом ендоцитозу (рис. 1.7).

Інокуляція SARS-CoV-2 у дихальні шляхи людини викликає пригнічення активності мукоциліарного кліренсу за рахунок інгібування рухливості війок епітелію і супроводжується загибеллю епітеліоцитів. Вірус SARSCoV-2 проникає через слизову оболонку носа, гортані та бронхіального дерева у периферичну кров і вражає цільові органи – легені, травний тракт, серце, нирки, клітини яких експресують АПФ-2. Вважається, що основною мішенню вірусу SARSCoV-2 є епітеліоцити легень.

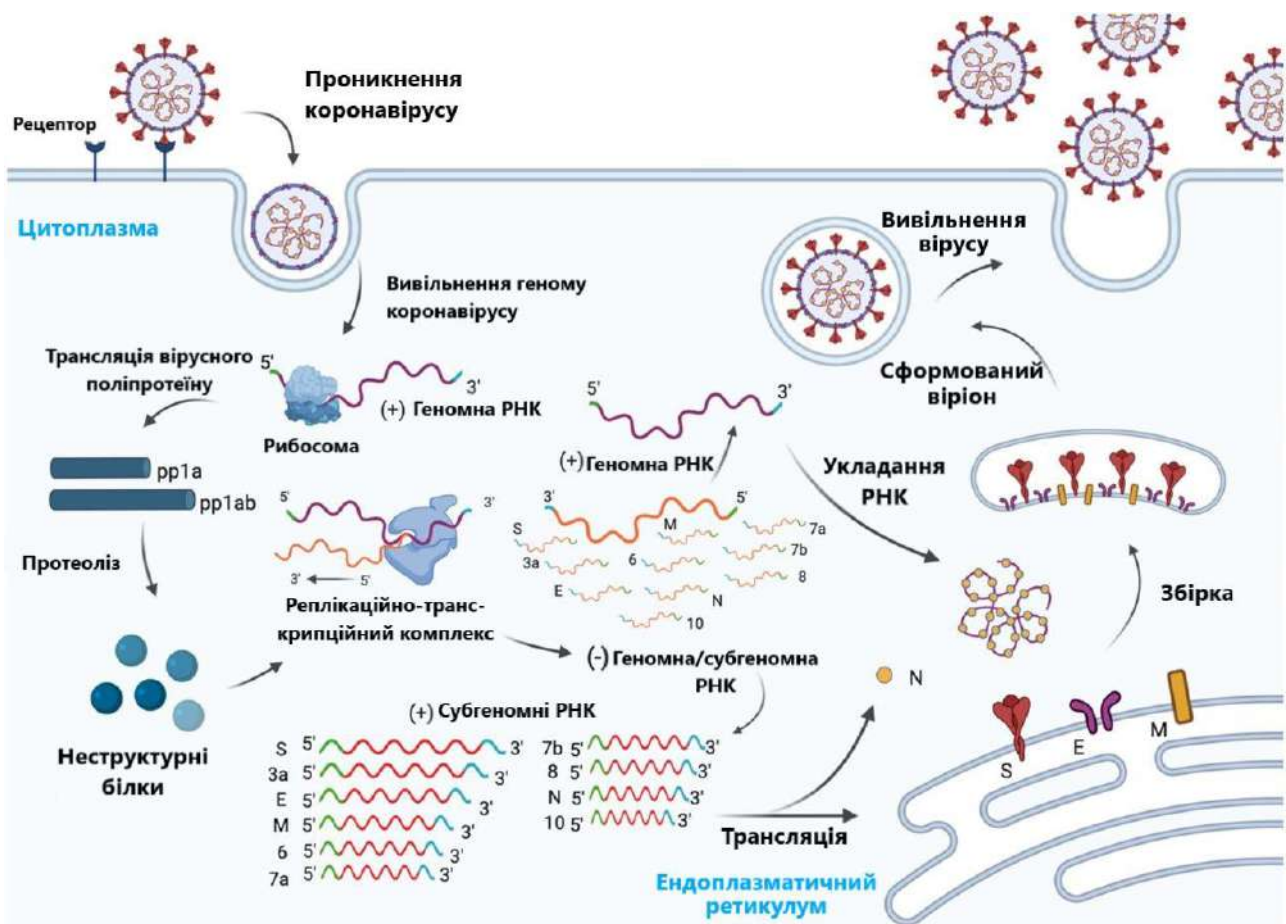


Рисунок 1.7 – Схема проникнення та реплікації коронавірусу в клітині-мішені [Zafferani et al., 2020]

Аналіз клітинних зразків на наявність РНК-послідовностей SARS-CoV-2 виявляє значну транскрипцію РНК в епітелії носу і меншу – в клітинах нижніх дихальних шляхів і альвеолярного епітелію. Це свідчить про те, що верхні, а не нижні дихальні шляхи є початковим місцем зараження SARS-CoV-2. АПФ-2 локалізовані в пневмоцитах I та II типу, клітинах ендотелію судин та ентероцитах (тому симптоми з боку дихальних шляхів часто супроводжуються симптомами з боку шлунково-кишкового тракту – нудота, діарея та ін.). Зараження SARS-CoV-2 призводить до цитопатичних ефектів, включаючи апоптоз, лізис клітин та утворення синцитію у тканинах легенів.

Після проникнення до клітини-хазяїна геном SARS-CoV-2 приєднується до рибосом, що призводить до трансляції вірусних поліпротеїнів, які в подальшому переробляються вірусними протеолітичними ферментами. У результаті протеолізу, опосередкованого протеазами вірусу 3CLpro (англ. – chymotrypsin-like protease) та PLpro (papain-like protease), поліпротеїни розщеплюються на менші компоненти, що відіграє головну роль у опосередкуванні реплікації та

транскрипції вірусів, а також сприяє поширенню інфекції. Інший фермент – RdRp (англ. – RNA-dependent RNA-polymerase) – репліказа, має важливе значення для реплікації вірусного геному та продукції нових віріонів. Отже, ці ферменти можна розглядати як потенційні лікарські мішені для розробки терапевтичних засобів, оскільки вони мають вирішальне значення для виживання, реплікації та передачі SARS-CoV-2. Лише 100 нм базальної мембрани відокремлює поверхні епітеліальних та ендотеліальних клітин в альвеолах, і це сприяє тому, що SARS-CoV-2 може заражати обидва типи клітин послідовно і насамкінець призводить до викиду вірусу в кров. Так само як і SARS-CoV, SARS-CoV-2 викликає тяжкі ускладнення – гострий респіраторний дистрессиндром і гостру легеневу недостатність, що є основною причиною смерті пацієнтів.

1.2.3. Створення вакцин проти COVID-19

Протягом 2020–2021 рр. на світовому фармацевтичному ринку для боротьби з пандемією COVID-19 з'явилися Vac різної структури та ефективності. Досить швидко розробку Vac проти COVID-19 обумовили декілька факторів:

- значні досягнення в галузі вакцинних технологій за останні 10–15 років, зокрема Vac на основі мРНК, значно прискорили розробку Vac проти вірусу SARS-CoV-2, що викликає COVID-19;
- уряди різних держав забезпечили значне фінансування, що дозволило вченим проводити кілька етапів розробки Vac паралельно, а не послідовно;
- успішне координування робіт між промисловістю, науковими установами та донорськими організаціями.

В результаті було створено платформу на основі матричної рибонуклеїнової кислоти (мРНК), яка була використана фірмами Pfizer-BioNTech і Moderna для своїх Vac проти COVID-19.

мРНК, або іРНК (матрична, або інформаційна РНК), містить інформацію про первинну структуру білків. мРНК синтезується на основі ДНК в процесі транскрипції, після чого використовується при трансляції як матриця для синтезу білків.

Технологія Vac на основі матричної РНК розроблялася понад два десятиліття. На відміну від традиційних вірусних Vac, які можуть доставляти інактивовану або ослаблену версію вірусу або частину вірусу, наприклад, капсульний білок, мРНК-Vac доставляють генетичну інструкцію щодо перетворення частини цільового вірусу у клітини людини. Потім клітини організму синтезують бі-

лок, необхідний для створення імунної відповіді. На молекулі мРНК записана інформація вірусу SARS-CoV-2 – збудника COVID-19.

В останні роки Vac з мРНК матрицею інтенсивно пропонуються в галузі імунотерапії раку та інфекційних захворювань через їх високу ефективність та безпечність. мРНК – частина генетичного коду вірусу, що призводить до синтезу антигенних білкових структур, у відповідь на які в організмі синтезуються специфічні антитіла.

Необхідно зазначити, що вкрай важливим компонентом мРНК-Vac є ліпідні наночастинки, в які інкапсульована молекула мРНК. На думку багатьох експертів, створення ліпідних компонентів та отримання на їх основі наночастинок мало вирішальне значення для створення мРНК-Vac. Ліпідні наночастинки захищають мРНК і переносять її у клітини.

Починаючи з кінця 1990-х років були розроблені ліпідні наночастинки для доставки ланцюгів нуклеїнових кислот. Наночастинки є сумішшю чотирьох ліпідних молекул (рис. 1.8): три з них стабілізують структуру наночастинки, а четвертий ліпід – іонізований – є ключем до успіху ліпідних наночастинок. Ця речовина заряджається позитивно при отриманні ліпідних наночастинок, що дає ті ж переваги, що і ліпосомальні частинки, але іонізовані ліпіди згодом перетворюють заряд на нейтральний у фізіологічних умовах, наприклад, у кровотоку, що обмежує його токсичну дію на організм. Крім того, суміш із чотирьох ліпідів дозволяє підвищити стабільність Vac у процесі виробництва, транспортування та зберігання. А також ліпідні наночастинки підтримують стабільність Vac в організмі.

До середини 2000-х років було розроблено новий спосіб змішування та виробництва цих наночастинок. Він включав використання апарату з T-подібним з'єднувачем, який об'єднує розчинені в етанолі ліпіди з нуклеїновими кислотами, розчиненими в кислотному буфері. Коли потік двох розчинів зустрічаються, компоненти мимовільно утворюють упаковані ліпідні наночастинки. Кожен виробник, що випускає мРНК-Vac, використовує різні варіації цієї платформи доставки ліпідних наночастинок.

У складі Vac виробництва компанії Pfizer-BioNTech присутні такі чотири ліпідних компоненти:

- 1) іонізований ліпід: ((4-гідроксибутил) азандиіл) біс(гексан-6,1-диіл) біс(2-гексилдеканонат);
- 2) 2[(полиетиленгликоль)-2000]-N,N-дитетрадецилацетамід (PEG-ліпід);

- 3) дистеароїлфосфатидилхолін (DSPC, англ. – distearoylphosphatidylcho-
line);
- 4) холестерин.

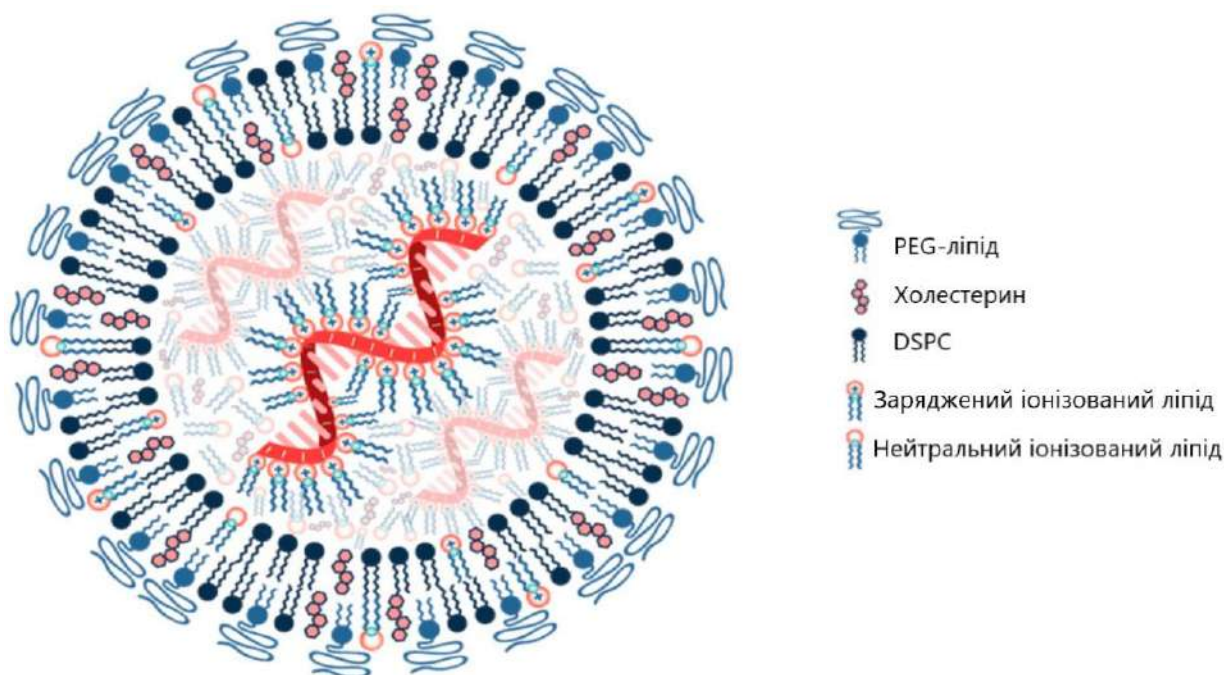


Рисунок 1.8 – Схема ліпідної наночастинки мРНК вакцини [Buschmann et al., 2021]

Формування ліпідних наночастинок з мРНК відбувається кількома методами:

- 1) шляхом швидкого змішування в мікрорідинному змішувачі або змішувачі з Т-подібним з'єднанням чотирьох ліпідів (іонізований ліпід, DSPC, холестерин і PEG-ліпід), розчинених в етанолі, з мРНК, розчиненої у водному буфері;

- 2) шляхом зустрічі іонізованого ліпідів з водною фазою – він стає протонуваним при рН 5,5, що є проміжним між рК буфера і рК іонізованого ліпідів;

- 3) іонізований ліпід електростатично зв'язує аніонну фосфатну групу мРНК і водночас виявляє гідрофобність у водному середовищі, стимулюючи утворення везикул та інкапсуляцію мРНК;

- 4) після початкового утворення везикул рН підвищується за рахунок розведення діалізом або фільтрацією, що приводить до нейтралізації іонізованого ліпідів, роблячи його більш гідрофобним і тим самим змушуючи зливатися везикули, викликавши в подальшому зв'язування іонізованого ліпідів з мРНК всередині ліпідної наночастинки.

PEG-ліпід зупиняє процес злиття, забезпечуючи наночастинки гідрофільним зовнішнім шаром і визначаючи його термодинамічну стабільність і розмір, а DSPC формує бішар, присутній безпосередньо під цим PEG-ліпідним шаром наночастинки. Склад Vac Pfizer-BionTech представлений: 50 % іонізованого ліпиду, 10 % DSPC, 38,5 % холестерину, 1,5 % PEG-ліпиду. Розмір ліпідних наночастинок становить 100–170 нм.

Проводяться дослідження використання у складі Vac проти COVID-19 як ліпідних наночастинок, так і ліпосом. Так, у Південній Кореї проведено роботи зі створення ліофілізованої ліпосомальної мРНК Vac-кандидата – EG-COVID. Для отримання Vac використовували ліпосоми, отримані з таких ліпідів: 1,2-діолеїл-3-триметиламонійпропан (DOTAP, англ. – 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane), діолеїлфосфоетаноламін (DOPE, англ. – dioleoylphosphoethanolamine) і холестерин. Розмір отриманих ліпосом до ліофілізації становив $191,7 \pm 8,5$ нм (дзета-потенціал – $-54,5 \pm 3$ мВ), а після ліофілізації – $266,7 \pm 12,2$ нм (дзета-потенціал – $-44,4 \pm 2,1$ мВ). Для порівняння авторами отримано препарат з ліпідами аналогічними Vac Pfizer. Ліпосомальні та ліпідні наночастинки включали мРНК. Активність двох препаратів порівнювали при внутрішньом'язовому введенні. Vac EG-COVID викликала стійкий гуморальний і клітинний імунітет до вірусу SARS-CoV-2. Сироватка, отримана від імунізованих мишей, пригнічувала вірусну інфекцію SARS-CoV-2 у клітинах Vero. На думку авторів досліджень, ліофілізована Vac краща за рідкий препарат, оскільки сухий препарат можна зберігати і транспортувати при більш високих температурах, порівняно з Vac фірми Pfazer.

G. Gregoriadis, один з піонерів роботи з ліпосомами, обґрунтував їх переваги при отриманні Vac так:

- 1) ліпосоми біодеградують, є простими у приготуванні та можуть кількісно включати мРНК;
- 2) включена у ліпосоми мРНК повністю захищена від нуклеазної атаки у кров'яному руслі;
- 3) ліпосомальна мРНК потрапляє у цитоплазму клітини шляхом ендоцитозу;
- 4) катіонні ліпосоми з мРНК уникають лізосомотропного шляху та залишаються інтактними у цитоплазмі;
- 5) усередині цитоплазми мРНК експресується у вигляді S-білка, після чого ліпосоми або їх фрагменти виявляють свою імунологічну ад'ювантну дію, механізм якої ще не досліджено.

Крім Vac на основі мРНК, у світі використовуються вакцинні препарати, отримані із застосуванням інших біотехнологічних схем. Так, в Україні активно проводиться імунізація населення Vac «CoronaVac» виробництва китайської фірми Sinovac. CoronaVac є інактивованою вірусною Vac, отриманою на основі виділеного в Китаї штаму коронавірусу. Вірус культивують на клітинах нирок африканських зелених мавп (Vero). Потім вірус збирають та інактивують з метою запобігання його реплікації, продукт концентрують, очищають і адсорбують на гелі гідроксиду алюмінію (ад'ювант, що стимулює імунну відповідь у людини). Ізольовані штами SARS-CoV-2 були відібрані в інфікованих пацієнтів. Вірус культивують у великих об'ємах клітин Vero та інактивують β -пропіолактоном протягом 24 годин з подальшим очищенням методами іонообмінної та ексклюзійної хроматографії (рис. 1.9). Отриманий інактивований, очищений та концентрований продукт адсорбують на гідроксиді алюмінію. Адсорбовану Vac оцінюють за імуногенною та захисною ефективністю на тваринах: мишах лінії BALB/c та щурах лінії Vistar. Встановлено високу імуногенність Vac, що призводить до появи захисного титру антитіл. Додатково Vac протестована на макаках-резус, що не відносяться до людського виду приматів, у яких було виявлено захворювання подібне до COVID-19, викликане SARS-CoV-2. Мавп імунізували тричі внутрішньом'язово середніми (3 мкг/дозу) та високими (6 мкг/дозу) дозами інактивованої Vac. На 0, 7 та 14 день визначали титри специфічних антитіл. Виявлено появу антитіл на 2-му тижні та подальше їх зростання. Всі вакциновані макаки були захищені від інфекції SARS-CoV-2. Вірусне навантаження не виявлялося у глотці і легнях вже на 7 день після зараження.

На схемі, зображеній на рис. 1.9, наведено технологію Vac, отриману за класичною схемою з використанням методу інактивації вірусу. Розглядати цю схему необхідно спільно з описом технології вірусних Vac: вимог до культури клітин, культуральних середовищ, мікроносіїв, інактивації та інших технологічних стадій, викладених у навчальному посібнику «Фармацевтична біотехнологія: Технологія виробництва імунобіологічних препаратів».

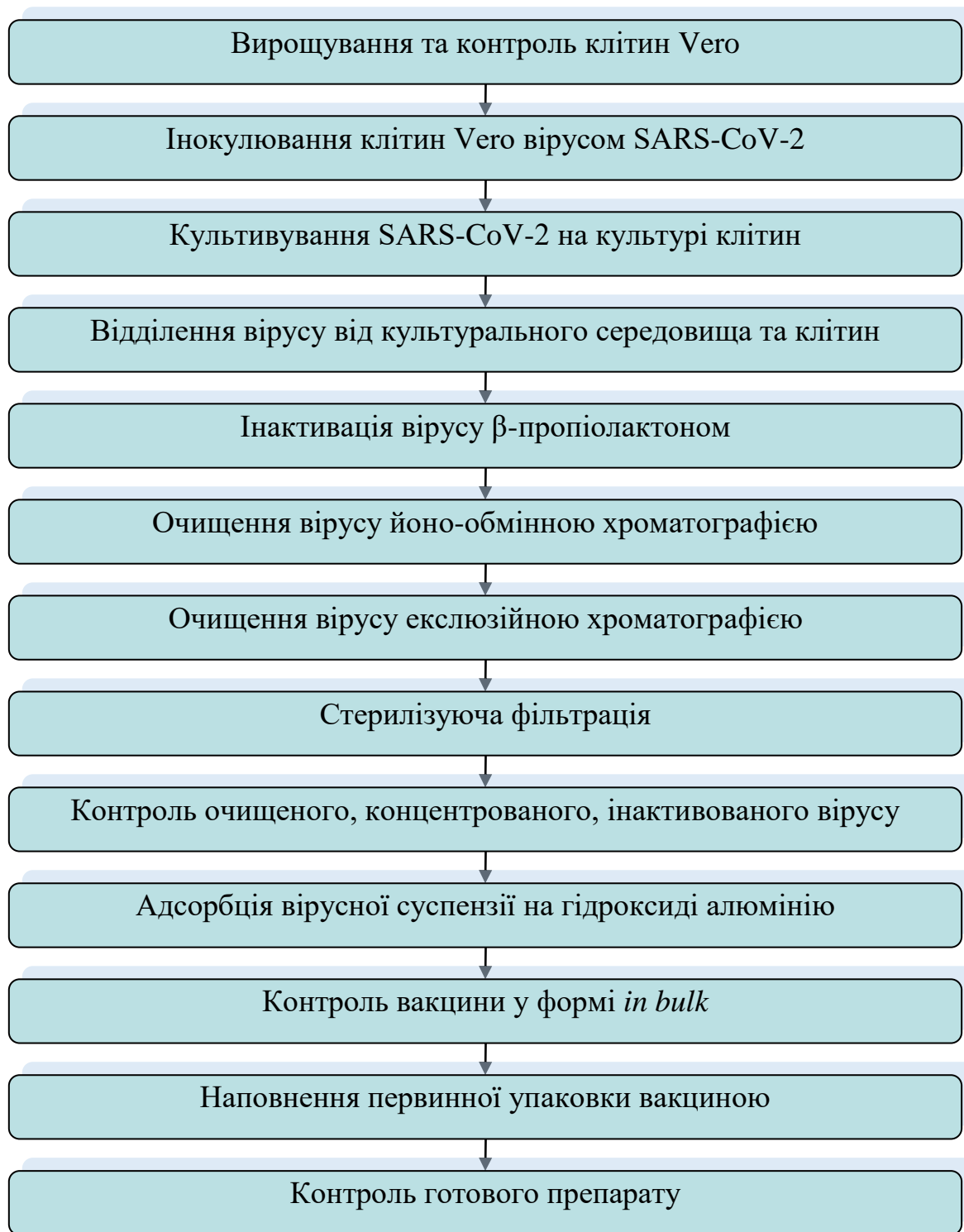


Рисунок 1.9 – Технологія отримання інактивованої вакцини Sinovac COVID-19

На сьогоднішній день використовується близько 10-ти комерційних Vac проти коронавірусу SARS-CoV-2 і більше 100 Vac знаходиться на різних стадіях доклінічного або клінічного вивчення. Розглянемо кілька комерційних Vac, що виробляються біотехнологічними компаніями різних країн (табл. 1.3).

Таблиця 1.3 – Порівняльна характеристика Vac проти коронавірусу SARS-CoV-2

Назва вакцини та виробник	Діюча речовина	Допоміжні речовини	1 доза	Умови зберігання
«AstraZeneca», Шве-дсько-Британська компанія разом із Оксфордським уні-верситетом / Cov-ishield, Індія	Рекомбінантний аденовірусний ве-ктор шимпанзе з дефектом реплі-кації, що кодує S-білок SARS-CoV-2, одержаний в генетично-модифікованих клітинах нирки ем-бріона людини HEK-293	L-гістидин, L-гістидину гідро-хлорид, MgCl ₂ ×6H ₂ O, NaCl, Твін-80, етанол, сахароза, ди-натрію едтат, вода для ін'єкцій	5×10 ¹⁰ вірус-них частинок у дозі	2 – 8 °С
«Pfizer», США	мРНК, одержана шляхом транскри-пції <i>in vitro</i> із відповідних ділянок ДНК, що кодують S-білок SARS-CoV-2 у ліпідній наночастинці	KCl, NaCl, KH ₂ PO ₄ , NaH ₂ PO ₄ , ALC-0315, ALC-0159, холес-терол, DSPC, сахароза, вода для ін'єкцій	30 мкг у дозі	(-90)–(-60) °С
«ЭпиВакКорона», Вектор, Росія	Пептидні антигени N1, N2 і N3 S-білка SARS-CoV-2, адсорбовані на Al(OH) ₃	Al(OH) ₃ , KCl, NaCl, KH ₂ PO ₄ , NaHPO ₄ , вода для ін'єкцій	Три антигени по 75±15 мг у дозі	2 – 8 °С
«CoronoVac», Sinovac, Китай	Інактивований очищений концент-рований вірус SARS-CoV-2, адсор-бований на Al(OH) ₃ , одержаний на клітинах Vero	NaCl, NaHPO ₄ ×12 H ₂ O, Na ₂ HPO ₄ ×H ₂ O, Al(OH) ₃ , вода для ін'єкцій	600 ОД інак-тивованого антигена	2 – 8 °С
«Спутник V», На-ціональний дослід-ницький центр епі-	2-х компонентний препарат: №1 – рекомбінантні аденовірусні частинки 26 серотипу, що містять	MgCl ₂ , Твін-80, етанол, саха-роза, трис-амінометан, вода для ін'єкцій	1±0,5×10 ¹¹ частинок у дозі	2 – 8 °С

Закінчення таблиці 1.3

Назва вакцини та виробник	Діюча речовина	Допоміжні речовини	1 доза	Умови зберігання
деміології та мікробіології ім. Н. Ф. Гамалеї, Росія	ген S-білка SARS-CoV-2; №2 – рекомбінантні аденовірусні частинки 5 серотипу, що містять ген S-білка SARS-CoV-2. Одержані на клітинній лінії HEK-293			
«Moderna», США	мРНК, що містить інформацію про S-білок SARS-CoV-2 в ліпідній наночастинці	SM-102, холестерин, DSPC, PEG-2000-DMG, триметамол, триметамолу гідрохлорид, оцтова кислота, натрію ацетату тригідрат, сахароза, вода для ін'єкцій	100 мкг у дозі	(-25)–(-15) °С
«Johnson-Johnson», США	Рекомбінантні аденовірусні частинки 26 серотипу, що містять ген S-білка SARS-CoV-2	Твін-80, моногідрат лимонної кислоти, тринатрію цитрат дигідрат, 2-гідрокситропіл-β-циклодекстрин, вода для ін'єкцій	Не менше ніж 8,92 log ₁₀ інфекційних одиниць	-70 °С – рік; 2–8 °С – 3 місяці.

Примітка. SM-102 – гептадекан-9-іл8-((2-гідроксіетил)-(6-оксо-6-(ундецилокси)гексил) аміно) октаноат, DSPC – дістеароїлфосфохолін, PEG-2000-DMG – 1,2-димірістоїл-рац-гліцери-3-метоксіполіетилен гліколь-2000.

Завдяки вакцинації у світі заговорили про революцію у біотехнології та фармації. Vac проти SARS-CoV-2 стали масовими препаратами, які базуються як на принципово нових біотехнологіях – на матричній РНК («Pfizer», «Moderna», США) та аденовірусних векторах («AstraZeneca», Великобританія, «CoviShield», Індія, «Спутник V»), а також на класичних біотехнологіях («CoronoVac», «Sinovac», Китай). Vac на основі мРНК містять вірусну молекулу мРНК, пов'язану з ліпідною наночастинкою. Опинившись у організмі мРНК надходить у клітину і починає синтезувати патогенно специфічні антигени, які викликають імунну реакцію. Vac виявляють різну ефективність від 85 до 95 %. За наявними сьогодні даними, вакциновані проти COVID-19 демонструють на 94 % менше випадків інфекції з симптомами, ніж у контрольній групі людей, які не були вакциновані. Серед тих, хто був вакцинований і заразився коронавірусом спостерігається на 92 % менше випадків тяжкого перебігу захворювання.

Сьогодні вакцинація проти SARS-CoV-2 – єдина можливість боротьби проти пандемії COVID-19 та збереження людських життів.

Контрольні запитання

1. У чому актуальність виробництва вакцини проти COVID-19?
2. Що собою представляє віріон SARS-CoV-2?
3. Як вірус SARS-CoV-2 проникає у клітину та поширюється в організмі людини?
4. Які види вакцин проти вірусу SARS-CoV-2 Вам відомі?
5. Який принцип роботи вакцини на основі мРНК?
6. Які ліпідні компоненти входять до складу ліпідних наночастинок для створення мРНК вакцин? У чому полягає функція кожного з них?
7. Назвіть переваги та недоліки використання ліпосом при створенні вакцин?
8. Назвіть основні етапи технології одержання інактивованої вакцини проти SARS-CoV-2.

Список джерел інформації

1. Buschmann M. D. Nanomaterial delivery systems for mRNA vaccines / M. D. Buschmann, M. J. Carrasco, S. Alishetty et al. // Vaccines. – 2021. – Vol. 9, No. 65. – P. 2–18.

2. Pardi N. Recept advances in mRNA vaccine technology / N. Pardi, M. J. Hogan, D. Weissman // *Current Opinion Immunology*. – 2020. – Vol. 65, No. 1. – P. 14–20.
3. ЛЬВОВ Д. К. Источник пандемии Covid-19: экология и генетика коронавируса / Д. К. ЛЬВОВ, С. В. АЛЬХОВСКИЙ // *Вопросы вирусологии*. – 2020. – Т. 65, № 2. – С. 62–70.
4. Huang Y. Structural and functional properties Cov-2 spike protein: potential antiviral drug development for Covid-19 / Y. Huang, C. Yang, F. Xu et al. // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2020. – Vol. 41, No. 7. – P. 1141–1149.
5. Jackson L.A. An mRNA Vaccine against SARS-COV-2 – preliminary report / L. A. Jackson, E. J. Anderson, N. G. Rouphael et al. // *The new England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383. – P. 1920–1931.
6. Hassert K. J. Optimization of lipid nanoparticles for intramuscular administration of mRNA vaccines / K. J. Hassert, K. E. Benenato, E. Jacquinet // *Molecular Therapy Nucleic Acids*. – 2019. – V. 15. – P. 1–11.
7. Hong H. C. An mRNA vaccine against SARS-CoV-2: Lyophilized, liposome based vaccine candidate EG-Covid induced high levels of virus neutralizing antibodies [Электронный ресурс] : preprint / H. C. Hong, K. S. Kim, S. A. Park et al. – bioRxiv, 2021. – Режим доступа : <https://doi.org/10.1101/2021.03.22.436375>
8. Zafferani M. Amilorides inhibit SARS-CoV-2 replication in vitro by targeting RNA structures. [Электронный ресурс] : preprint // M. Zafferani, C. Haddad, L. Luo et al. – bioRxiv, 2020. – Режим доступа : <https://doi.org/10.1101/2020.12.05.409821>
9. Gregoriadis G. Liposomes and mRNA: Two technologies together create a COVID-19 vaccine / G. Gregoriadis // *Medicine in drug Discovery*. – 2021. – Vol. 12. – Article 100104.
10. Pharmacovigilance for COVID-19 vaccines [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <https://covid-19pharmacovigilance.paho.org/>
11. Yamamoto V. COVID-19: review of a 21st century pandemic from etiology to neuropsychiatric implications / V. Yamamoto, J. Bolanos, J. Fiallos, et al. // *Journal of Alzheimer's Disease*. – 2020. – Vol. 77, No. 2. – P. 459–504.
12. Santos I. A. Antivirals Against Coronaviruses: Candidate Drugs for SARS-CoV-2 Treatment? [Электронный ресурс] / I. A. Santos, V. R. Grosche, F. Bergamin et al. // *Frontiers in microbiology*. – 2020. – Vol. 11. – 1818. – Режим доступа <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01818>

13. Интерфероны: роль в патогенезе и место в терапии и профилактике COVID-19 : методическое пособие для врачей. – Санкт-Петербург, 2020, – 60 с.
14. Волянський А. Ю Особливості SARS-COV-2 інфекції та напрями створення терапевтичних та вакцинних препаратів / А. Ю. Волянський, Т. В. Давидова, М. В. Кучма та ін. // Аналі Мечниковського Інституту. – 2020. – Т. 4. – С. 7–20.
15. Дзюблик І. В. Нові коронавіруси людини та захворювання органів дихання / І. В. Дзюблик, О. В. Кукало // Український пульмонологічний журнал. – 2015. – № 4. – С. 53–59.

ГЛАВА 2. ЛІПОСОМАЛЬНІ ФОРМИ АД'ЮВАНТІВ І ВАКЦИН

В даний час у різних напрямках медицини широкого використання набули ліпосомальні препарати. Один з таких напрямків – застосування ліпосом (LS, англ. – liposome) як ад'ювантів для конструювання вакцин (Vac, англ. – vaccine). Спочатку ад'ювантна дія LS по відношенню до різних антигенів була встановлена при введенні експериментальним тваринам антигенних субстанцій, вірусів і бактерій, глобулінів та альбумінів сироватки крові, ферментів. Надалі LS-Vac знайшли широке застосування у профілактиці інфекційних захворювань людини. У таблиці 2.1 представлені комерційні LS-Vac, що використовуються у клініці.

Таблиця 2.1 – Ліпосомальні вакцини для застосування людиною

Назва вакцини	Виробник	Антиген	Захворювання
«Eраxal Berna vaccine», в/м	Crucell-Berna-Bio-tech, Швейцарія	Антиген гепатиту А	Гепатит А
«Inflexal» virosomal influenza vaccine, в/м	Crucell-Berna-Bio-tech, Швейцарія	Антигени вірусу грипу А, гемагглютинін, нейрамінідаза	Грип
«НераХен» combintd vaccine, в/м	Лірохен, Велика Британія	Антиген гепатиту В	Гепатит В
«Lіrovaca» influenza vaccine, в/м	Болгарія	Гемагглютинін, нейрамінідаза	Грип
«Mosquirix», в/м	GlaxoSmithKline (GSK), Бельгія	Епітоп прееритроцитарного циркумспорозітного білка <i>Plasmodium falciparum</i> і S-антиген вірусу гепатита В (HBsAg)	Малярія
«Shingrix», в/м	GlaxoSmithKline (GSK), Бельгія	Рекомбінантний антиген ліпопротеїна Е вірусу вітряної віспи	Оперізувачий лишай

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

До ад'ювантів у вакцинології висуваються досить жорсткі вимоги:

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

Посилення дії антигену в організмі при введенні його з ад'ювантами пояснюється кількома причинами:

- ✓ уповільненою резорбцією антигену з утвореного на місці введення «депо», що сприяє антигенному подразненню;
- ✓ запальною реакцією організму у відповідь на введення ад'ювантів;
- ✓ утворенням комплексу антигену з ад'ювантом за типом хімічного зв'язку, внаслідок чого підвищується імуногенність антигену;
- ✓ стимуляцією ад'ювантом фагоцитарної активності ретикулоендотеліальної системи;
- ✓ загальним посиленням синтезу білка в організмі;
- ✓ уповільненням гідролізу антигену тканинними ферментами;
- ✓ стресорною дією ад'юванту на організм;
- ✓ активацією системи комплементу;
- ✓ прискоренням транспорту антигену до імунокомпетентних клітин;
- ✓ стимуляцією утворення цитокінів;
- ✓ стимуляцією проліферації, диференціювання та функціональної активності Т- і В-клітин та їх взаємодії.

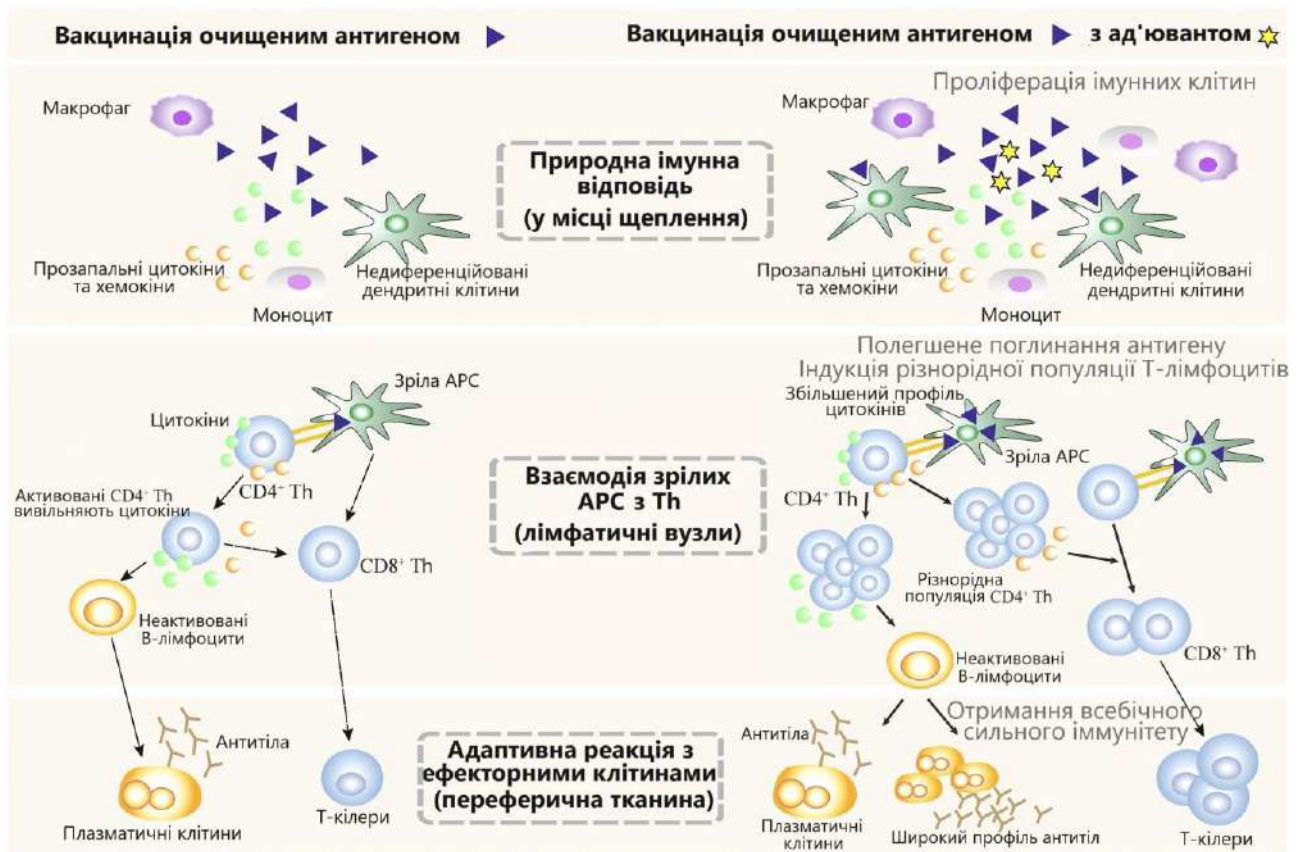


Рисунок 2.1 – Імунні відповіді, викликані імунізацією вакцинами в присутності ад’юванта або без нього. *Скорочення:* APC – антигенпрезентуюча клітина (англ. – antigen-presenting cell); Th – Т-хелпери [Wang et al., 2019]

Необхідно зупинитися на ряді клітин, що беруть участь в імунній відповіді (рис. 2.2):

- Т-хелпери-1 (Th-1) переважно сприяють розвитку клітинної імунної відповіді, активуючи макрофаги (основний цитокін, що виділяється, – інтерферон- γ);
- Т-хелпери-2 (Th-2) беруть участь у протипаразитарному імунітеті та алергічних реакціях, продукують інтерлейкіни ІЛ-4,5,10.
- Т-хелпери (помічники) – Т-лімфоцити, головною функцією яких є посилення адаптивної імунної відповіді. Т-хелпери активують В-лімфоцити, моноцити, натуральні кілери та ін., презентуючи їм фрагменти чужорідних антигенів при прямому контакті, а також гуморально, виділяючи цитокіни.

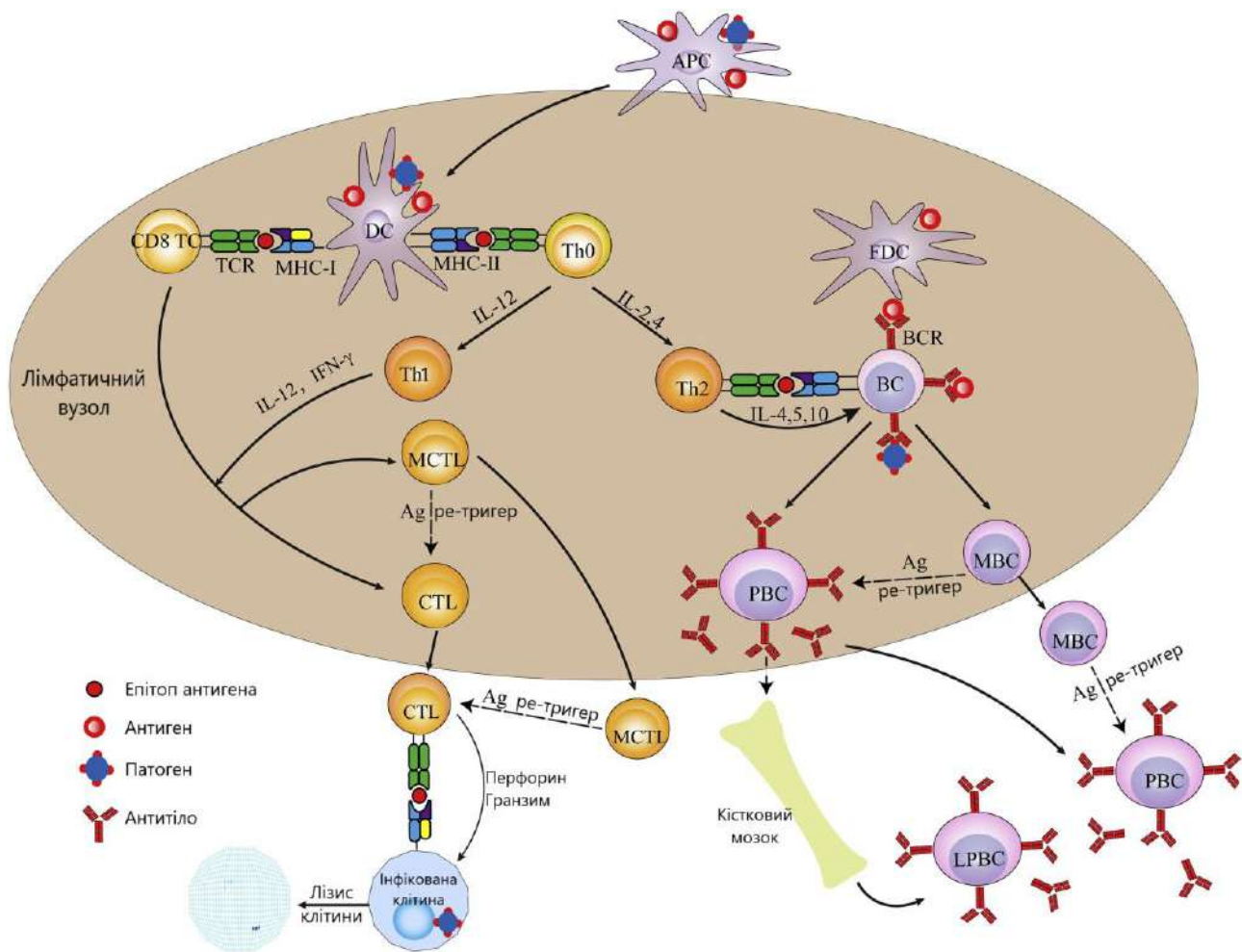


Рисунок 2.2 – Схематичний опис процесу формування гуморального та клітинного імунітету, спровокованого збудником або вакциною [Wang et al., 2019].
Скорочення: APC – антигенпрезентуюча клітина (англ. – antigen-presenting cell); DC – дендритна клітина (англ. – dendritic cell); FDC – фолікулярна дендритна клітина (англ. – follicular dendritic cell); CTL – цитотоксичний Т-лімфоцит (англ. – cytotoxic T-lymphocyte); МНС – головний комплекс гістосумісності (англ. – major histocompatibility complex); МСТЛ – цитотоксичний Т-лімфоцит пам'яті (англ. – memory cytotoxic T-lymphocyte); TCR – Т-клітинний рецептор (англ. – T-cell receptor); BCR – В-клітинний рецептор (англ. – B-cell receptor); МВС – В-клітина пам'яті (англ. – memory B-cell); РВС – плазматична В-клітина (англ. – plasma B-cell); LPBC – довгоживуча плазматична В-клітина (англ. – long-lived plasma B-cell); Th0 – «наївний» недиференційований CD4+ Т-хелпер; Th1 – Т-хелпер 1-го типу; Th2 – Т-хелпер 2-го типу; IFN-γ – інтерферон-γ (англ. – interferon-γ).

Більшість дослідників вважають, що ад'юванти спричиняють комбіновану дію як на антиген, змінюючи його фізико-хімічні властивості і посилюючи імуногенність, так і безпосередньо на організм, викликаючи ряд неспецифічних реакцій. Вплив ад'ювантів на властивості антигену стосується зміни його стру-

ктури, молекулярної маси, полімерності, розчинності та інших фізико-хімічних та імунохімічних властивостей. Сьогодні відома значна кількість ад'ювантів, що відрізняються походженням (природні та синтетичні) та фізико-хімічними властивостями:

- 1) мінеральні ад'юванти;
- 2) рослинні ад'юванти (наприклад, сапоніни). Ад'ювант QS21 виділений з південно-американського дерева *Quillaja Saponaria*. Імуностимулюючий комплекс «ISCOM» являє собою ад'ювантну фракцію *Quillaja Saponaria*, включену в частинки, що складаються з холестерину, фосфоліпідів і антигенів клітинних мембран. «ISCOM» вводили до складу Vac проти вірусу грипу, вірусу папіломи людини, ВІЛ, збудника малярії, низки пухлин та ін. Показано, що Vac, що містять ISCOM, найбільш ефективні при інтраназальному введенні та індукують змішану Th-1 і Th-2-іммунну відповідь;
- 3) масляні ад'юванти (ад'ювант Фрейнда, мінеральні олії, тваринні та рослинні олії);
- 4) цитокіни (наприклад, інтерлейкіни IL-1 α та IL-1 β) та пептиди;
- 5) мікробні ад'юванти (корпускулярні та субодичні структури, білки, нуклеїнові кислоти, ліпіди, вуглеводи, ліпополісахарид-білкові комплекси);
- 6) синтетичні речовини (полінуклеотиди (полі-А:У, полі-Г:Ц та ін.), пептиди (мураміддипептид та його похідні, поліелектроліти – поліаніони, полікатиони));
- 7) складні штучні ад'ювантні системи (LS, мікрокапсули).

Враховуючи викладене вище, стає зрозумілим значний інтерес, який виник в останнє десятиліття до LS як до «drug delivery system» і перспективних ад'ювантних компонентів. Звертає на себе увагу той факт, що LS відповідають більшості вимог, що пред'являються до ад'ювантів. Важливим є можливість отримання Vac з ліпосомальними ад'ювантами, які можуть легко піддаватися стерилізуючій фільтрації, на відміну від мінеральних або жирових ад'ювантів. Це у свою чергу дозволяє проводити стерилізуючу фільтрацію на кожному етапі отримання Vac-препаратів. LS знижують токсичність інкапсульованих у них антигенів і мають високу біосумісність. Крім того, з'явилися дослідження, в яких у складі Vac запропоновано використовувати комбінацію з кількох ад'ювантів: LS, цитокінів, пептидів, імуностимулюючих комплексів.

2.1. Противірусні вакцини

2.1.1. Вакцини для профілактики гепатиту

Отримані різними авторами дані свідчать про те, що якщо введені у водному розчині антигени призводять до негативної або дуже слабкої імунної відповіді, то їх інкапсулювання у LS призводить до високих титрів антитіл у сироватці крові. При підшкірній ін'єкції морським свинкам поверхневого антигену вірусного гепатиту В отримано високі титри антитіл, що захищають тварин від інфекції. Показано, що антиген вірусу гепатиту, включений до LS, призводить до появи антитіл у 750 разів більших титрах, ніж при імунізації водним розчином антигену. Очищені препарати антигену вірусу гепатиту включали в LS, що складаються з яєчного фосфатидилхоліну (EPC, англ. – egg phosphatidylcholine), холестерину і додецилфосфату у співвідношенні 7 : 2 : 1. Автори визнають ад'ювантні властивості LS.

Безсумнівний інтерес представляють дані про можливість зміни типу імунної реакції при введенні антигену у складі LS. Як антиген використовували поверхневий пептид вірусу гепатиту В (HBsAg, англ. – Hepatitis B surface antigen), введення якого мишам лінії C57BL приводив до імунної реакції Th-2-типу. Введення даного антигену в LS у присутності імуномодулятора показало сильну проліферативну реакцію Т-лімфоцитів. Т-лімфоцитна підгрупа була ідентифікована як Th-1-тип на підставі цитокінного профілю, який свідчив про значне виділення інтерферону- γ (цитокін Th-1) та надзвичайно низький рівень ІЛ-4 (цитокін Th-2). Контрольна група мишей лінії C57BL, імунізована пептидом з квасцями, показала дуже низький рівень проліферації Т-лімфоцитів, до того ж не відзначалося жодного збільшення виділення інтерферону- γ або ІЛ-4. Таким чином, було встановлено, що реакція типу Th-1 відбувається у тварин, яким пептид вводили тільки у складі LS.

«НераХенTM» – LS-Vac для профілактики гепатиту В випускається фірмою «Лірохен». При застосуванні цієї Vac рівень антитіл у 20 разів перевищує рівень специфічних антитіл порівняно з використанням неLS-Vac. У зв'язку з цим виникла реальна можливість зменшити профілактичну дозу Vac і кількість ін'єкцій.

Авторами отримана LS-Vac проти гепатиту В, в якій був інкапсульований рекомбінантний HBsAg розміром 22 нм. LS отримували з диміристоїлфосфатидилхоліну (DMPC, англ. – dimirystoylphosphocholine) та диміристоїлфосфатидилгліцерину (DMPG, англ. – dimirystoylphosphoglycerol) в молярному співвід-

ношенні 9 : 1. Розмір LS після гідратації становив 5 мкм. При порівнянні LS-Vac з вільним та адсорбованим на гелі гідроксиду алюмінію HbSAg встановлено, що LS-Vac приводила до вищого рівня гуморальної відповіді (титру специфічних антитіл).

«Eраxal[®]» – Vac для профілактики гепатиту А (виробництва «Crucell-Berna-Biotech», Швейцарія). Препарат являє собою LS з диолеїлфосфатидилхоліну (DOPC, англ. – dioleoylphosphocholine) і диолеїлфосфатидилетаноламіну (DOPE, англ. – dioleoylphosphoethanolamine) у співвідношенні 75 : 25, що містять вірус гепатиту А, інактивованій формаліном, та гемаглютинін вірусу грипу. Vac продемонструвала високі імуногенні властивості та нешкідливість. При вивченні рівня захисних антитіл у крові імунізованих тварин методом імуноферментного аналізу виявлено, що сероконверсія на 14-ий та 28-ий день становила відповідно 97 % та 98 %. Після другої ін'єкції LS-Vac рівень сероконверсії становив 100 %.

Фірма «Лірохеп» розробила першу в світі Vac для профілактики гепатиту Е, яка містить рекомбінантний білок гепатиту Е в LS, отриманих за відомою технологією Imixep.

2.1.2. Вакцини для профілактики грипу

Грип та його ускладнення дають істотну захворюваність і смертність у людей похилого віку. У людей молодого віку імуногенність при вакцинації забезпечує 70–90 % захисту, а у літніх людей – близько 50 %. Запропонована тривалентна LS-Vac, що містить по 15 мкг гемаглютиніну кожного вірусного штаму і 33 мкг ІІ-2 людини. Проведено вивчення імуногенності та нешкідливості запропонованої LS-Vac у порівнянні зі стандартною комерційною Vac. Vac вводили внутрішньом'язово літнім людям (середній вік – 80 років). При вивченні рівня захисних антитіл методом імуноферментного аналізу встановлено наявність захисного титру антитіл у 33 % людей при використанні стандартної Vac та у 48 % при імунізації LS-Vac. У цих дослідженнях показано однакову нешкідливість Vac, а імуногенність була вищою у LS препараті. Причому, антитіл до ІІ-2 не виявлено. Не виявлено також збільшення рівня антифосфоліпідних антитіл у крові імунізованих людей.

Існуючі на сьогодні Vac проти грипу є переважно препаратами з інактивованого вірусу.

Існує три види Vac:

- Vac із цілісного вірусу;

- Vac із фрагментованого вірусу;
- Vac на основі окремих активних фрагментів вірусу грипу.

Для підвищення імуногенної активності даних Vac використовують як різні ад'юванти (наприклад, MF59), так і LS форми Vac. Вивчення нешкідливості та імуногенності комерційних протигрипозних Vac проводили на двох групах хворих. Першій групі вводили Vac, що містить гемаглютинін, виділений з вірусу, а другій групі – Vac, отриману шляхом введення гемаглютиніну в LS мембрану, що складається з природного PC. Для дослідження використовували тривалентну Vac. Обидві Vac викликали однаково достовірне підвищення середнього титру протигемаглютинінових антитіл проти всіх трьох компонентів Vac через місяць після імунізації. Однак у групі осіб, імунізованих LS-Vac, продемонстровано статистично достовірне підвищення титру проти штамів вірусу Сінгапур і Пекін більш ніж у чотири рази у порівнянні з вільною формою Vac. Відсоток хворих, у яких титр при імунізації LS-Vac досягав захисної величини, був також значно вищий. Особливе клінічне значення мав той факт, що у 68,4 % осіб, імунізованих LS-Vac, досягався захисний рівень антитіл проти всіх трьох компонентів Vac, проти 38 % при вакцинації звичайною Vac.

Численні дослідження LS-Vac, що містять вірус грипу або його високоочищені компоненти, привели до створення комерційних LS препаратів для профілактики грипу. Одним із таких препаратів є Vac «Inflexal[®]V» виробництва «Crucell-Berna Biothec» (Швейцарія). Препарат є полівалентною LS (віросомальною) інактивованою Vac проти грипу (рис. 2.3), до складу якої входять поверхневі антигени трьох штамів вірусу грипу типів А і В. Віруси інактивують формальдегідом, після чого з вірусів виділяють і очищають антигени – гемаглютиніни та нейромінідази. В одній дозі міститься по 15 мкг гемаглютиніну кожного штаму. Препарат являє собою LS з DOPC і DOPE у співвідношенні 75 : 25.

Віруси грипу постійно змінюються, тому склад Vac, що випускається у різні роки, може відрізнятись. Перевагою віросом є можливість імітації ними вірусних частинок. Механізм дії віросом можна описати так:

- фагоцитоз віросом імунокомпетентними клітинами;
- презентація антигенів (гемаглютинін та нейрамінідаза), включених в LS, імунній системі;
- активація CD4⁺ Т-хелперів для вироблення цитокінів;
- цитокіни стимулюють клітини для вироблення антитіл до антигенів вірусу грипу.



Рисунок 2.3 – Схематичне зображення віросомальної вакцини проти грипу [Herzog et al., 2009]

Захисний рівень антитіл у крові зазвичай досягається через 2–3 тижні після вакцинації. Тривалість поствакцинального імунітету становить 6–12 місяців.

2.1.3. Вакцини для профілактики вірусних інфекцій

Вірус простого герпесу-2 є найпоширенішим збудником герпесу статевих органів. Запропоновано LS-Vac, що містить пептиди, виділені з вірусу герпесу. У модельних експериментах на мишах заражених вірусом герпесу (самки заражені інтравагінально, самці – інтраректально) одноразове введення LS-Vac приводило до 86–100 % виживання при інтравагінальному зараженні і 71–100 % при інтраректальному. Різні за складом пептиди вірусу герпесу мали різну імуногенну активність.

«LipoRab™» – Vac для профілактики сказу. LS підвищують імуногенність Vac з включеним в них вірусом сказу, у порівнянні з використанням Vac тільки з вірусом сказу. Перевагою цієї Vac є можливість зменшення доз та кількості ін'єкцій.

Значним успіхом вакцинології можна вважати Vac «Shingrix®». «Shingrix®» – Vac виробництва «GlaxoSmithKline» (Бельгія), спрямована на профілактику оперізуючого лишая і являє собою суспензію для внутрішньом'язового введення, що складається з ліофілізованого рекомбінантного антигену ліпопротеїну E вірусу вітряної віспи, який при використанні відновлюється суспензією AS01, що виконує функцію імунологічного ад'юванта. Антиген являє собою очищену усічену форму глікопротеїну, експресованого в клітинах яєчників сирійського хом'ячка. Суспензія ад'юванту AS01 складається з 3-0-дезацил-4'-монофосфориліпиду A з *Salmonella* (штам *Minnesota*) і молекули сапоніну (QS21), очищеного з екстракту *Quillaja saponaria* (мильне дерево).

Обидва компоненти введені до складу LS, що складається з DOPC та холестерину у фосфатному буфері.

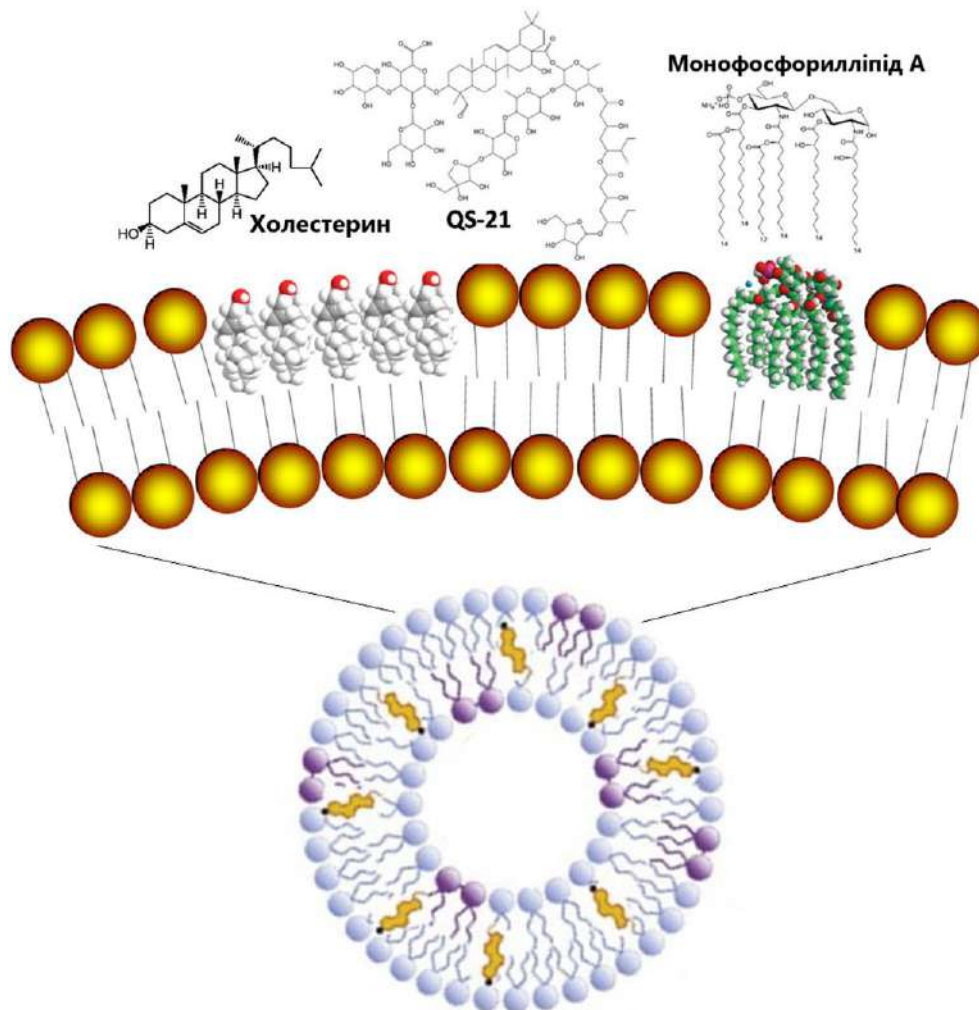


Рисунок 2.4 – Схематичне зображення вакцини на основі ад’юванту AS01, нприклад, «Shingrix®» – вірусної вакцини проти оперізуючого лишая, «Mosquirix®» – бактеріальної вакцини проти малярії [Wang et al., 2019]

Vac представлена двома флаконами: в одному знаходиться суспензія ад’юванту (50 мкг монофосфорилліпиду А; 50 мкг QS21, 1 мкг DOPC, 0,25 мкг холестерину, 0,160 мкг натрію дигідрофосфату, 0,54 мкг калію дигідрофосфату), у другому – ліофілізований антиген у кількості 50 мкг. Умови зберігання препарату – 2–8 °С. Як допоміжні компоненти використовували 20 мкг сахарози (стабілізатор), 4,385 мкг натрію хлориду і 0,08 мкг полісорбату-80. Перед використанням суспензія ад’юванта вводиться у флакон з антигеном (після приготування суміш може зберігатися протягом 6 годин при 2–8 °С). Vac продемонструвала високі протективні властивості при захисті від оперізуючого лишая.

В даний час проводиться розробка ряду Vac для боротьби з вірусними інфекціями, наприклад, проти хвороб Ебола, Зіка та ін.

Лихоманка Ебола – гостра висококонтагіозна хвороба, рідкісне, але вкрай небезпечне захворювання. Спалахи епідемії зафіксовані у Центральній та Західній Африці. Летальність у середньому становить 50 %. Вірус Ебола розповсюджується через кров або рідкі виділення організму хворої або померлої людини або тварини. Інфікуватися можна через нещодавно заражені біологічними рідинами предмети.

У листопаді 2019 року на фармацевтичний ринок введено першу комерційну Vac проти вірусу Ебола – «Ervebo» (виробництва Merck) – rVSV-ZEBOV-GP. «Ervebo» – це живий атенуйований рекомбінантний вірус везикулярного стоматиту (rVSV), в якому ген, що кодує глікопротеїн (PO3522) оболонки вірусу, змінений на поверхневий глікопротеїн вірусу Ебола (P87666), виділеного з типового заїрського вірусу (*Zaire ebolavirus*) (рис. 2.5). Вірус у цій Vac не є патогенним для людини. Vac проти вірусу Ебола пройшла випробування на 16 000 осіб. Vac індукує імунну відповідь у вигляді нейтралізуючих антитіл. Vac rVSV-ZEBOV – «Ervebo» є єдиною Vac проти лихоманки Ебола, схваленою FDA. Запропонована Vac забезпечує захист від ізолятів *Zaire ebolavirus* та не захищає від інших ізолятів вірусу Ебола або вірусу Марбург.

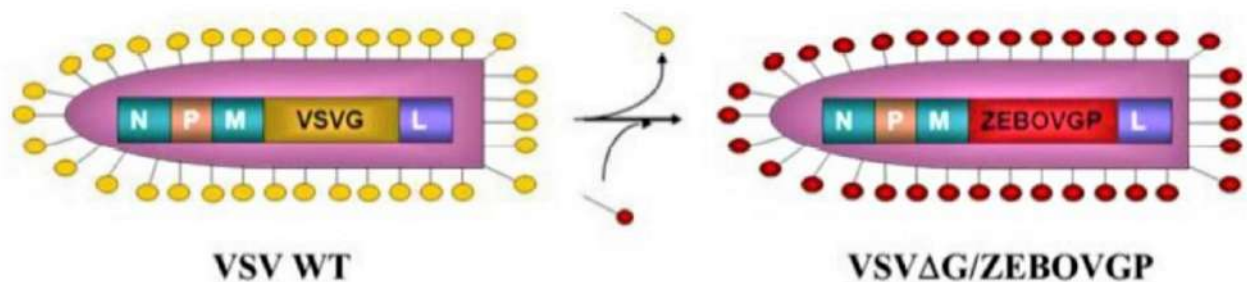


Рисунок 2.5 – Структура штаму VSV дикого типу та рекомбінантного вірусу rVSV-ZEBOV-GP [EMA assessment report, 2019]

Також запропонована Vac, розроблена Johnson & Johnson і виготовлена компанією Janssen. З метою запуску імунної відповіді запропонована комплексна Vac, яка несе генетичний код декількох білків вірусу Ебола та складається з двох компонентів: 1) Ad26.ZEBOV(Zabdeno) – рекомбінантна ДНК-Vac на основі аденовірусу 26 серотипу (Ad26); 2) MVA-BN-Filo(Mvabea) – рекомбінантна ДНК-Vac на основі модифікованого вірусу осповакцини Анкара (MVA).

У 2020 році запропонована Vac «ГамЭвак-комби» – комбінована векторна Vac розроблена для профілактики геморагічної лихоманки Ебола. Vac складається з двох компонентів, де як вектор міститься аденовірус 5-го серотипу (Ad5). Перший компонент містить рекомбінантні вірусні частинки на основі вірусу везикулярного стоматиту (VSV), що експресують ген GP вірусу Ебола; другий компонент містить рекомбінантні псевдоаденовірусні частинки, що експресують ген GP вірусу Ебола. У дослідженні Vac прийняли участь лише 2000 осіб. У зв'язку з відсутністю матеріалів 1 і 2 фази клінічних випробувань, дана Vac не рекомендована міжнародним співтовариством до застосування.

Останні роки активно розробляються Vac проти вірусу Зіка (рис. 2.6). Передача хвороби іншим людям здійснюється трансмісивним шляхом. Хвороба Зіка передається через укуси комарів *Aedes aegypti* в тропічних і екваторіальних районах. Вірус Зіка належить до роду *Flavivirus*. Протікає хвороба відносно доброякісно, характеризується висипанням, нетривалою лихоманкою без вираженої інтоксикації. Виявлено, що вірус Зіка проникає через плаценту, впливаючи на ембріон і викликаючи у немовлят мікроцефалію (значно зменшений розвиток черепа), що призводить до розумової недостатності.

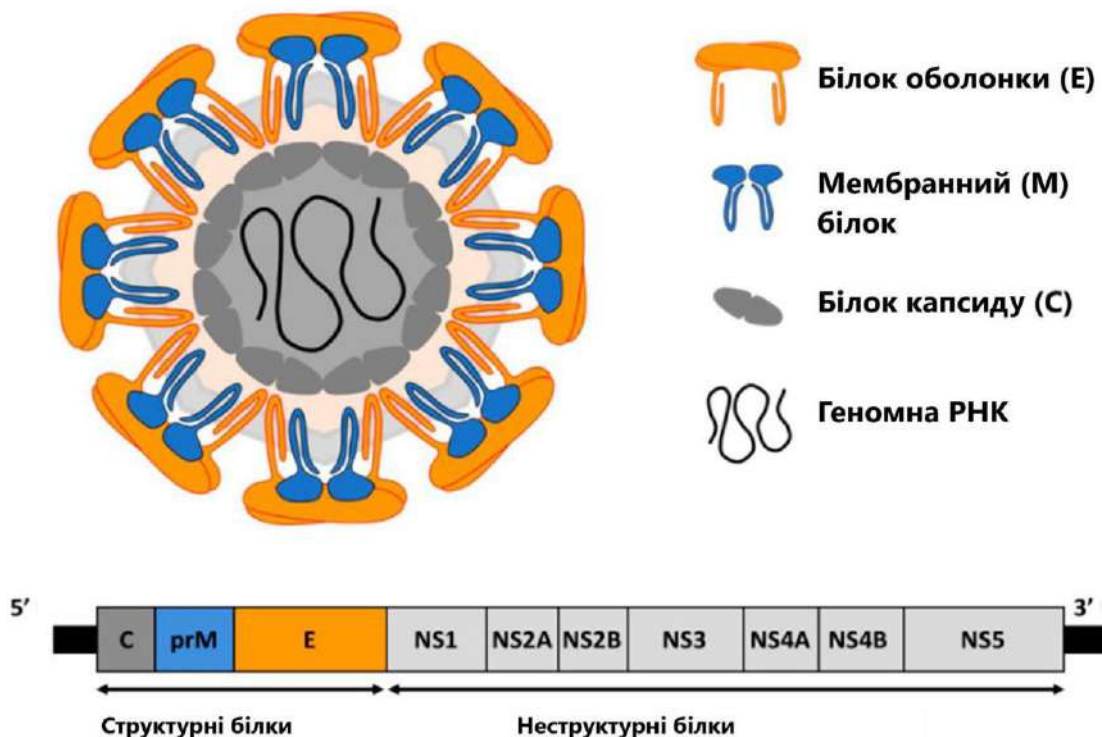


Рисунок 2.6 – Структура вірусу Зіка [Avila-Perez et al., 2018]

Сьогодні запропоновано кілька варіантів Vac проти вірусу Зіка:

1. Vac на основі ДНК розробляється вченими Центру досліджень вакцин NIAID (США). Ними використана стратегія, аналогічна експериментальній флавівірусній Vac проти вірусної інфекції Західного Нілу. Vac-кандидат на основі ДНК проти вірусу Зіка пройшла першу фазу клінічних випробувань у серпні 2016 року, другу фазу з тестування розпочали у грудні 2016 року. У лютому 2017 року розпочато дослідження безпечності й імуногенності Vac. ДНК-Vac складається з плазмідної ДНК, модифікованої білками E і PrM, що входять до складу зовнішньої білкової оболонки віріона вірусу Зіка. ДНК-Vac призначена для зборки білкових частинок, які імітують вірус Зіка та запускають імунну відповідь в організмі людини. На першій фазі відкритого клінічного дослідження, у якому прийняли участь 40 людей, вводили 3 дози Vac по 1 і 2 мл. Перша ін'єкція у дозі 1 мл забезпечувала захист у 25 % пацієнтів, у дозі 2 мл – у 60 %; друга ін'єкція у дозі 1 мл забезпечувала захист у 65 % пацієнтів, у дозі 2 мл – у 84 %. На двана тижні перед введенням третьої дози титр нейтралізуючих антитіл спостерігали у 70 і 95 % пацієнтів відповідно.

2. Очищена інактивована Vac проти вірусу Зіка під назвою ZPIVI розроблена Армійським дослідницьким інститутом Уолта Ріда (США). Vac містить інактивовані частинки вірусу і не може розмножуватися в організмі людини та викликати захворювання. У дослідженнях на мишах і мавпах-мармозетках (при їх вагітності) показано, що як первинна внутрішньом'язова, так і первинна бустерна вакцинація забезпечує 80 %-вий ефект появи нейтралізуючих антитіл.

3. Жива ослаблена (атенуйована) Vac проти вірусу Зіка. Створено химерний вірус за допомогою генної інженерії – об'єднання кількох вірусів (реасортанти отримують після спільного інфікування двома різними вірусами із сегментованим генотипом, містить гени обох батьківських вірусів). Химерний вірус складається з кістяка вірусу Денге типу 4 (Денге викликається будь-яким з 4-х споріднених вірусів, які називаються серотипами), який експресує поверхневі білки вірусу Зіка. Химерний вірус – живий, атенуйований (ослаблений) і не може викликати захворювання.

4. мРНК-Vac (платформа на основі генів, аналогічна ДНК-Vac). мРНК призводить до синтезу антитіл проти білків E і PrM, що входять до складу зовнішньої білкової оболонки віріону вірусу Зіка.

5. Vac на основі вірусних векторів використовують вірус кору або модифіковану версію вірусу везикулярного стоматиту VSV. Принцип той самий, що й у Vac проти вірусу Ебола.

б. Vac, яка спрямована на білки слини комара, а не на конкретний вірус. Vac містить 4 синтетичні білки слинних залоз комарів, призначені для індукції антитіл у вакцинованої людини – для індукції модифікованої алергічної реакції, яка може запобігти зараженню у разі укусу комаром-переносником хвороби Зіка.

Насамкінець хотілося б звернути увагу на можливість отримання Vac проти вірусів на основі різних платформ: ДНК, мРНК, вірусних векторів, атенуованих, очищених інактивованих та ін. Розвиток біотехнології та створення низки методологій дозволяє успішно боротися з небезпечними інфекційними вірусними захворюваннями.

2.2. Антибактеріальні вакцини

2.2.1. Вакцини, що містять токсини та анатоксини

Анатоксин, або токсойд – це бактеріальний токсин, інактивований шляхом спеціальної обробки (наприклад, формаліном), але який зберіг антигенні властивості.

Внутрішньовенне введення водного розчину *дифтерійного анатоксину* сенсibilізованим мишам призводило до загибелі 70 % тварин протягом 1 хвилини, а у 30 % мишей спостерігалися симптоми важкої форми сироваткової хвороби. Тварини, імунізовані анатоксином, інкапсульованим у LS, вижили, і у них були відсутні симптоми сироваткової хвороби. У сенсibilізованих дифтерійним анатоксином тварин після підшкірного введення LS антигену не спостерігався феномен Артюса.

Проведено дослідження імуногенності *анатоксинів Clostridium oedematiens* (збудник газової гангрени), інкапсульованих у LS різного складу. Найбільше виживання спостерігалось в групі тварин, імунізованих LS, до складу яких входили ЕРС, кардіоліпін, виділений з серця великої рогатої худоби, а також фосфатидилсерин і сфінгомієлін, виділені з мозку великої рогатої худоби. Оскільки LS із РС і кардіоліпіну більш активні, ніж LS із РС, то ймовірно, що їхня більша імуногенність пов'язана з присутністю кислого фосфоліпиду – однієї з небагатьох антигенних ліпідних речовин.

Очищений *правцевий анатоксин* кон'югували з LS за допомогою глутарового альдегіду. При внутрішньочеревному введенні отриманого препарату мишам лінії BALB/с встановлено, що імунізація приводить до виникнення високого рівня протиправцевих імуноглобулінів G. Одночасно показано, що вміст

специфічних протиправцевих імуноглобулінів класу Е був дуже незначним. Отримані сироватки містили титр захисних антитіл, оскільки введення летальних доз токсину у дозі 100 dlm (лат. – *dosis letalis minima*) повністю захищало тварин від загибелі. Імунізація тварин вільним розчином правцевого анатоксину або анатоксину, сорбованого на гелі гідроокису алюмінію, викликали утворення імуноглобулінів як класу G, так і класу Е. Крім того, повторна імунізація мишей LS формою правцевого анатоксину після первинної імунізації приводила до появи переважно імуноглобуліну G. При ліофілізації LS форми антигену, імуногенність препарату зберігалася протягом 6 місяців при температурі зберігання 37 °С.

На мишах лінії BALB/c вивчали вплив різних LS, що складаються з фосфоліпідів і холестерину, взятих у еквімолярних співвідношеннях, на імуногенні властивості інкапсульованого правцевого анатоксину. Антитіла визначалися за допомогою імуноферментного методу. В результаті встановлено, що ад'ювантні властивості LS найбільш виражені при співвідношенні фосфоліпідів до правцевого анатоксину 2050 : 1 по масі; збільшення співвідношення між білковою фракцією та LS призводило до значного зниження титрів. Рівень антитіл не змінюється при використанні LS, що складаються з фосфоліпідів з температурою фазового переходу «гель/рідина» від 32 °С до 41,5 °С. При вивченні впливу ад'ювантних властивостей LS на імуногенність правцевого анатоксину використовували два методи включення до складу LS: метод дегідратації/регідратації та метод ковалентного зв'язування. Автори не встановили відмінностей у дії препаратів на гуморальну імунну відповідь. Відзначено, що 82,3 % антигену зв'язується з LS незалежно від їхнього заряду – нейтрального, негативного чи позитивного. Виявлено відмінності у зв'язуванні з антигеном LS, що містять жирні кислоти різного ступеня насиченості.

Проведено вивчення *комбінованої LS-Vac, що містить дифтерійний та правцевий анатоксини*. LS були отримані ультразвуковою обробкою суміші ліпідів, що складається з соєвого PC і холестерину. В 1 мл Vac міститься по 5 Lf (англ. – *Limits of Flocculation*; флокулююча одиниця) кожного анатоксину. Мишам BALB/c препарат вводили підшкірно. Максимальне включення анатоксинів в LS спостерігалось при співвідношенні PC : холестерин – 7 : 3, дифтерійного анатоксину 39,8 % і правцевого анатоксину 38,7 %. Антитіла в крові тварин визначали імуноферментним аналізом на 15-й, 30-й і 45-й день. Встановлено, що комбіноване використання анатоксинів у Vac призводить до вищого рівня антитіл до правцевого антигену в порівнянні з моно-Vac у LS формі, що містить

правцевий анатоксин. У рівні антитіл дифтерійного анатоксину різниці не виявлено.

Встановлено, що *холерний токсин та його В-субодиниця* підвищували імунну відповідь до антигенів при спільному проникненні через слизову оболонку. При оральному введенні антигенів, що знаходяться на поверхні малих LS із РС спостерігалось збільшення імунної відповіді. Для вивчення протективних властивостей холерних Vac добровольцям перорально вводили трикомпонентну LS холерну Vac. Як контроль пацієнтам вводили вільну форму трикомпонентної Vac. Обидві Vac забезпечували 100 %-ву імуногенність, що було підтверджено захисним титром антитіл у крові пацієнтів. Водночас, вакциновані люди, які отримали антигени в LS формі, продемонстрували більшу швидкість антигенспецифічної реакції антитіл, ніж пацієнти, що отримували вільну форму Vac. На можливість використання холерної LS-Vac вказує ряд робіт, в яких як антиген використовували інактивовані теплом цілісні клітини збудника холерни. Використання LS-Vac призводило до гальмування процесу колонієутворення на слизовій оболонці у щурів.

2.2.2. Вакцини, що містять ліпід А

Безсумнівно дуже перспективним є використання LS як контейнерів для ад'ювантів різної структури. Одним з таких ад'ювантів є *ліпід А, що являє собою ліпополісахарид, виділений з грамнегативних бактерій*. Висока ад'ювантна активність ліпиду А встановлена за останні 20 років численними дослідженнями. Однак застосування Vac, у складі яких як ад'ювант використовується ліпід А, гальмується його високою пірогенною активністю (рис. 2.7).

Введення ліпиду А до складу LS значно зменшує пірогенність ліпополісахариду. Наприклад, ліпід А, виділений з *Salmonella minnesota R595* та інкапсульований в LS, виявляв меншу пірогенність порівняно з вільною формою ліпиду А. Так, непірогенна доза ліпиду А у вільному стані становила 0,32 мкг/кг маси кролика, а в LS формі вдавалось вводити 8,1 мкг/кг маси кролика без прояву пірогенної реакції. Автори провели вивчення імуногенності LS антигену малярійного плазмодія на мавпах, в якому як ад'ювант використовували непірогенний LS ліпід А. Отримана комерційна LS-Vac проти малярії «Mosquirix[®]». Ця рекомбінантна LS-Vac проти малярії на основі білка була схвалена у жовтні 2021 року ВООЗ (розробник – Арміїський НДІ Волтера Ріда (США), виробник – GlaxoSmithKline (Бельгія)). Ефективність захисту від малярійного плазмодія становить від 26 до 50 % для немовлят та дітей молодшого віку.

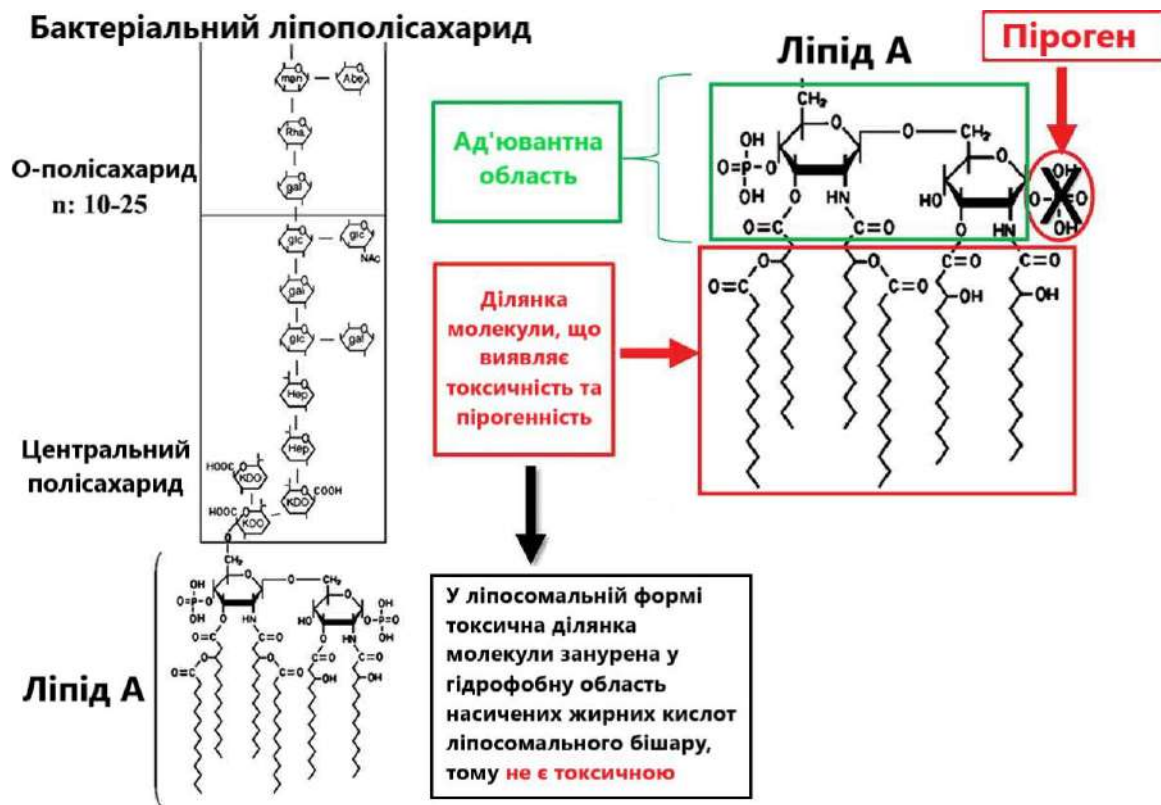


Рисунок 2.7 – Структурно-функціональні зв'язки ліпиду А, отриманого з грам-негативного бактеріального ліпополісахариду [Alving et al., 2020]

Для отримання антигену використовувалися гени центральної повторюваної області і Т-клітинного епітопу прееритроцитарного циркумспорозоїтного білка (CSP, англ. – circumsporozoite protein) малярійного паразиту *Plasmodium falciparum*, кон'югованого з поверхневим антигеном S вірусу гепатиту (HBsAg) (рис. 2.8).

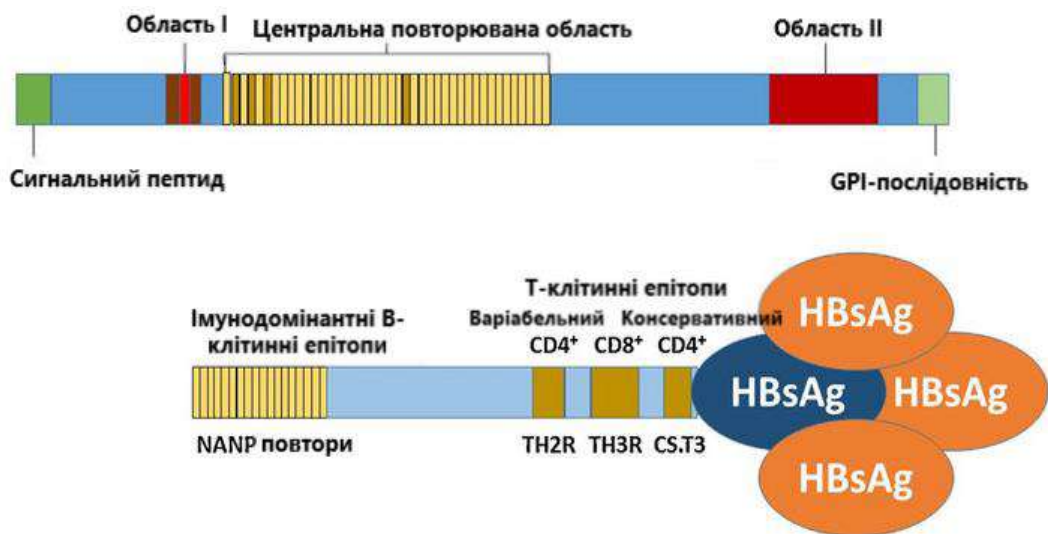


Рисунок 2.8 – Структура рекомбінантного білку вакцини «Mosquirix®» [Kaslow et al., 2015]

Разом ці два білкових компоненти збираються в розчинні вірусоподібні частинки, схожі на зовнішню оболонку вірусу гепатиту В. На основі LS з ад'ювантом AS01 інфекція попереджається на рахунок індукції гуморального та клітинного імунітету з високими титрами антитіл, які не дозволяють паразиту *P. falciparum* заражати печінку людини.

Ад'ювант AS01 у вигляді LS складається з ряду сполук (рис. 2.4):

- ✓ монофосфорил-ліпиду А, який діє як агоніст рецептора TLR-4, активуючи Th1 для продукції цитокінів, інтерферону- γ , IL-2 та TNF- α , які пов'язані з опосередкованим фагоцитозом, захистом від внутрішніх інфекційних агентів;
- ✓ QS21 (екстракт *Quillaja saponaria*, фракція 21), яка ініціює активацію дендритних клітин для індукції імунних відгалужень опосередкованих Т-клітинами.

До складу LS входить DOPC, холестерин, натрієві та калієві фосфатні солі, сахароза, полісорбат 80.

2.2.3. Вакцини, що містять пептиди різної структури

Ад'ювантну активність мають мікобактеріальні пептидоглікани, зокрема, мураміддипептид (MDP, англ. – muramyl dipeptide), його аналоги та стереоізомери. MDP – мінімальна структурна одиниця пептидоглікана, що входить до складу стінки грампозитивних і грамнегативних бактерій (рис. 2.9).

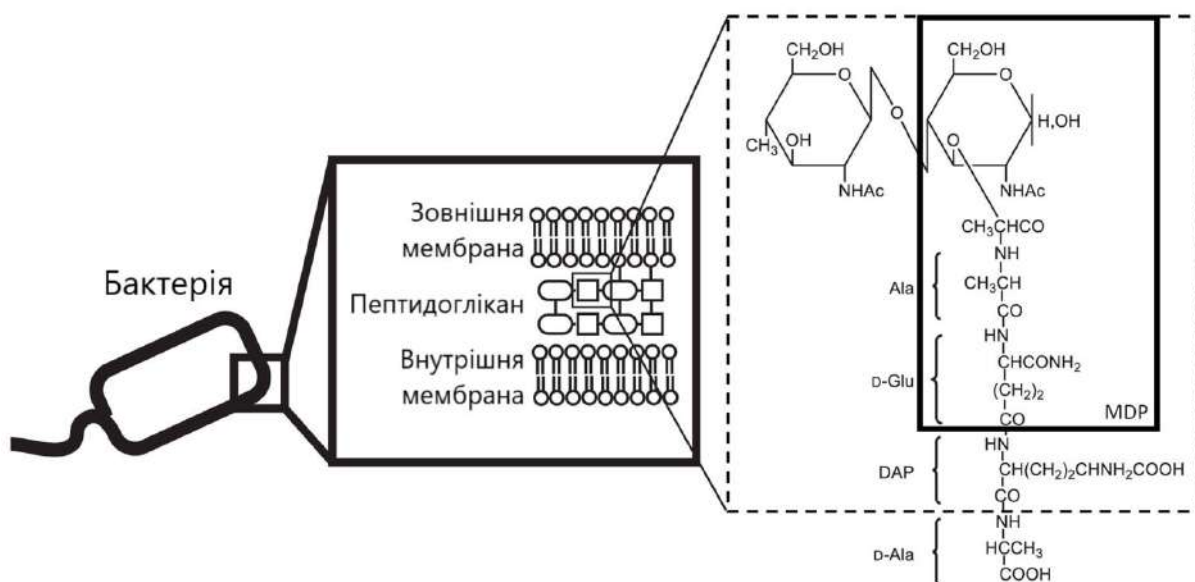


Рисунок 2.9 – Структура мураміддипептиду та його локалізація у бактеріальній клітині [Ogawa et al., 2011]

MDP здатний активувати системи вродженого та адаптивного імунітету. За багатьма властивостями MDP у складі LS дозволяє значно підвищити імунну відповідь і знизити його негативні властивості. Рядом авторів запропоновано використовувати MDP та його похідні – C18-MDP, C12-MDP, які є кон'югатами MDP з жирними кислотами, для підвищення антигенної активності низки антигенів при імунізації тварин. Показано, що введення C18-MDP є достатньо ефективним для створення захисного імунітету у мавп проти *P. falciparum*. Для дослідження ролі макрофагів при індукції утворення антитіл на антигени стафілококу застосовувалися LS, що містять C12-MDP. Миші, які отримували LS з C12-MDP, за два дні до ін'єкції α -токсину золотистого стафілококу демонстрували збільшення утворення протистафілококового анти- α -токсину імуноглобуліну (імуноглобуліни M та G). Встановлено, що похідні MDP або комплекс MDP з фосфатидилетаноламіном (PE, англ. – phosphatidylethanolamine) є ефективними агентами для активації макрофагів, спрямованих проти клітин пухлин або вірусів. LS комплекс MDP/PE, призначений для внутрішньовенного введення, знаходився на I-ій фазі вивчення. Необхідно відзначити, що на відміну від LS форми ліпиду A, LS комплекс MDP/PE є токсичним та пірогенним, що затримує його застосування як ад'юванта для Vac у медицині.

Мавп імунізували проти малярійного паразита *P. falciparum*. Дві ін'єкції антигеном, включеним у LS спільно з 6-0-стероїл-N-ацетилмураміл-D-аланіл-D-ізоглутаміном, захищали всіх тварин при зараженні летальною дозою збудника.

Проведено оцінку імуногенності *LS-Vac* з антигенними пептидами, отриманими з глікопротеїну вірусу лімфоцитарного хориоменінгіту. Інкапсульовані в LS пептиди мали високу імуногенність при підшкірному введенні і викликали захисний противірусний імунітет. Після підшкірної ін'єкції LS утворювали «депо» антигену, що полегшувало тривале завантаження антигену дендритними клітинами практично тільки в місцеві лімфовузли. Імуногенність LS пептидної Vac ще більше підвищувалася при введенні в LS імуностимулюючих олігонукліотидів, що призводило до значного активування дендритних клітин. Запропонована LS пептидна Vac викликала захисний протипухлинний імунітет. Враховуючи, що реакції протипухлинних і противірусних Т-клітин викликаються переважно дендритними клітинами, що транспортують антиген з периферії в організовані лімфоїдні тканини, можна припустити, що активація дендритів LS пептидними Vac свідчить про їх високу імуногенність і можливість створення захисної противірусної та протипухлинної імунної реакції.

Безперечно, перспективним є використання *LS-Vac*, які містять патогенні пептиди, за допомогою яких можна запобігти аутоімунним захворюванням без неспецифічного пригнічення реакцій Т-клітин, як це було показано при підшкірному введенні мишам LS, що містять пептид К-2, який відповідає залишкам 201–216 бичачого інтерфоторецептора ритеноїд-зв'язуючого білка.

Інтерес представляє *LS-Vac*, що містить пептид, виділений з пилей *Pseudomonas aeruginosa* (синегнійна паличка), як *B-epitop*. У LS також включали очищений гемаглютинін з вірусу грипу, як Th-епітоп, а також ад'ювант. Отримано імунну відповідь у вигляді продукції специфічних антитіл, здатних захистити від інфекції, викликаної *P. aeruginosa*.

LS як імунологічні ад'юванти були використані для отримання антитіл, специфічних до поліпептиду. LS були приготовлені з суміші ЕРС, холестерину, доцетилфосфату та α -токоферолу у молярних співвідношеннях 4 : 3 : 0,1 : 0,5 і мали негативний заряд. У LS поміщали негативно заряджений поліпептид, який внаслідок заряду не комплексувався з LS і знаходився всередині ліпідної структури. Найкращі результати отримані при внутрішньовенній або внутрішньочеревній імунізації.

2.2.4. Вакцини, що містять антигени мікобактерій туберкульозу

У культуральному фільтраті *Mycobacterium tuberculosis* знаходиться ранній секреторний антиген ESAT-6 з молекулярною масою 6 кДа. Цей білок кодується областю геному RD1 *M. tuberculosis*, втраченою в процесі тривалого культивування у вакцинному штамі БЦЖ (скор. від Бацила Кальмета-Герена, фр. – *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG)) (рис. 2.10).

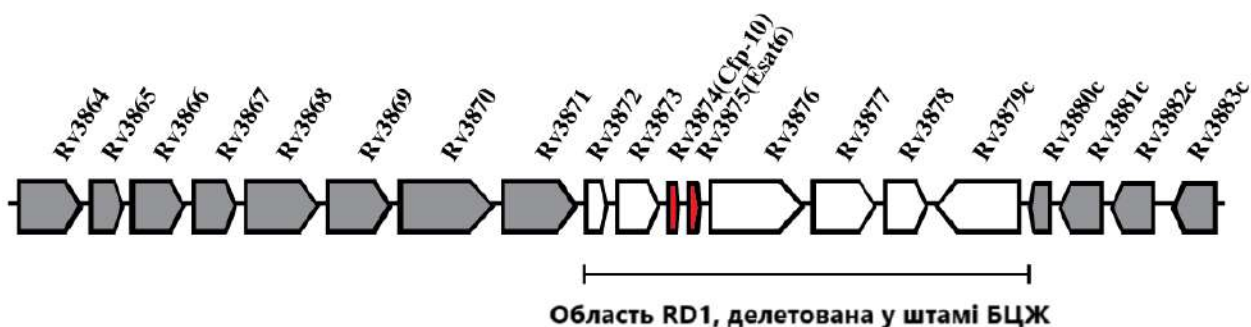


Рисунок 2.10 – Делетована у вакцинному штамі БЦЖ область геному *M. tuberculosis* RD1, яка кодує секреторні білки ESAT-6 (англ. – early secreted antigenic target) и CFP-10 (англ. – culture filtrate protein), що відповідають за вірулентність мікобактерій [Ganguly et al., 2008]

Результати доклінічних досліджень протективних властивостей антигену ESAT-6 у вигляді пептидних і ДНК Vac, а також у складі бактеріальних векторів на основі БЦЖ і *S. typhimurium* показали, що внаслідок недостатньої імуногенності білка ESAT-6 формування захисного ефекту імунізації визначається способом його введення та доставки в організм.

Субодиничні Vac складаються з очищеного білка та ад'ювантів. Крім антигену ESAT-6 в субодиничних Vac запропоновано використовувати й інші очищені білки – 85B та 85A. Обнадійливі результати отримані під час створення грипозних векторів, що експресують антиген ESAT-6. Одержання атенуєваних рекомбінантних штамів вірусу грипу А, що експресує ранній секреторний мікобактеріальний антиген ESAT-6 у модельних експериментах із зараження мишей туберкульозною інфекцією (2-кратна інтраназальна імунізація), продемонструвало кращий захисний ефект у порівнянні з класичною БЦЖ.

Запропоновано LS-Vac для лікування та попередження туберкульозу. Авторами запропоновано використовувати як антигени поліпептиди, виділені з вірулентних *M. tuberculosis* штаму МТВ-С NCTC 13536: HSP70 (70 kDa); 38 kDa; Ag85B (30 kDa); CFP 10 (10 kDa); ESAT-6M (6 kDa); LpqHM (19 kDa), інкапсульовані у LS розмірами 80–120 нм. До складу LS композиції також були введені ліпіди *M. tuberculosis* штаму МТВ-С. Ліпіди були представлені гліколіпідами, наприклад, ліпоарабіномананом. Продукт ліофілізують у присутності 5 % сахарози як кріопротектора. LS було отримано з використанням соєвого РС. LS-Vac при введенні мишам призводило до значного збільшення клітинної імунної відповіді *in vivo*. Наприклад, рівень імунної відповіді при використанні як антигену очищеного білкового похідного в LS-Vac перевищував титри антитіл у 4–8 разів, а при використанні Vac з Ag85B – у 8–14 разів порівняно з neLS антигенами. Vac також індукувала поліантигенну гуморальну відповідь, яка забезпечувала високий протективний ефект. Причому автори показали збільшення протективного ефекту при використанні LS-Vac, що містить сахарозу в 1,5 рази більше, ніж при використанні LS препарату без сахарози. При введенні Vac у дозі 50 мкг з сахарозою імунна відповідь була ідентична введенню 200 мкг без сахарози. Таким чином, запропонований LS препарат, призначений для лікування або попередження туберкульозу, за рахунок введення людині разової інокулюючої дози 25–50 мкг фрагментів клітинної стінки *M. tuberculosis* штаму МТВ-С у LS формі, що містить ліпіди штаму та природні фосфоліпіди. Ліпіди, виділені зі штаму БЦЖ, зв'язані зі злитим білком антигену Ag85B-ESAT-6 в ка-

тійонних LS, індукував значні рівні інтерферону- γ і титри відповідних антитіл (IgG2A), характерні для імунної Т-хелперної відповіді (Th1).

Катіонний ліпід диметилдоктадециламоній активно використовувався для отримання протитуберкульозних субодиничних LS-Vac.

2.2.5. Вакцини, що містять бактеріальні полісахариди

Запропоновано методи отримання LS-Vac для профілактики правцевої, гемофільної, менінгококової, стрептококової інфекції.

LS отримували з EPC зі ступенем чистоти 90 % або соєвого гідратованого PC зі ступенем чистоти 98 %. Оптимальний розмір LS становив 80–300 нм. Як полісахарид використовували капсульний полісахарид *Haemophilus influenzae*. Структура капсульного полісахариду, який грає важливу роль у вірулентності бактерій *H. influenzae*, встановлена як 3-В-D-рибофунарозил-(1-1)-D-рибітол-5-фосфат. Авторами були отримані LS, що містять капсульний полісахарид і білкові антигени ряду бактерій: дифтерійний анатоксин, правцевий анатоксин, білок менінгококу, що використовуються для виробництва комерційних Vac. Отримані авторами LS-Vac при підшкірному введенні мишам продемонстрували високий рівень специфічних захисних антитіл.

2.2.6. Рибосомальні вакцини

Рибосоми – органели, які продукують білок по матриці іРНК. Виділені рибосоми з матрицею в чистому вигляді і являють собою рибосомальну Vac.

Рибосомальні Vac являють собою рибосомальну фракцію, виділену з мікроорганізмів, яка має імуногенні властивості: здатність індукувати синтез антитіл і захищати людину і тварин від зараження відповідними мікроорганізмами. Протективна активність рибосомальних Vac може бути пов'язана з адсорбованими на рибосомах молекулами бактеріальних антигенів. У зв'язку з цим введення рибосомальних антигенів у LS дозволяє підвищити ефективність Vac. Відомо, що рибосомальні Vac ефективні в імунопрофілактиці низки інфекційних захворювань. Вивчена здатність рибосом, виділених зі штаму *Streptococcus sobrinus 6715* (посилює розвиток карієсу на зубах) і включених в LS на основі фосфоліпідів і холестерину, індукувати синтез специфічних антитіл IgA у слині щурів. Показано, що рівень IgA проти рибосом і цілих клітин *S. sobrinus 6715* був у імунізованих щурів значно вищий, ніж у контрольних тварин. Була також різко знижена колонізація *S. sobrinus 6715* у ротовій порожнині. Автори запропонували використовувати LS рибосомальні Vac для захисту від карієсу.

Так, наприклад, при введенні 12,5 мкг LS-Vac виявлено значні титри захисних антитіл, а введення чистої Vac без LS в дозі 250 мкг не продемонструвало імуногенності.

Запропонована Vac, в якій як антиген використані рибосоми *Candida albicans* (збудник кандидозу). LS отримували з DMPC і DMPG у молярному співвідношенні 9 : 1. Як ад'ювант використовували ліпід А. Проведено вивчення LS-Vac, що містить рибосоми, у порівнянні з Vac із ад'ювантом Фрейнда (один з найбільш поширених ад'ювантів, що містить убиті туберкульозні мікобактерії, суспендовані у масляній фазі водної емульсії) на мишах. Рівень імунної відповіді був вищим. Автори запропонували використовувати отриману Vac для імунізації людей.

2.2.7. Вакцини, що містять компоненти бактеріальної клітини

З метою підвищення імуногенності антигенів, що вводяться через слизову оболонку, автори включали гемаглютинін *Bordetella pertussis* (збудник кашлюка) в LS, що містять як модельний антиген глутатіон-S-трансферазу *Schistosoma mansoni* (кишечний паразит). Неінbredних мишей двічі інтраназально імунізували LS препаратом, що містить постійну дозу глутатіон-S-трансферази і зростаючі дози гемаглютиніну. Додавання 3 мкг гемаглютиніну до LS викликало більш ніж 10-кратне підвищення титру антитіл до глутатіон-S-трансферази. Присутність гемаглютиніну не змінювало гуморальної відповіді у тварин, а їх сироватки містили імуноглобуліни G (IgG1, IgG2a та IgG2b). Однак лише за наявності гемаглютиніну в зазначеній дозі спостерігалася поява антитіл до глутатіон-S-трансферази класу IgGA. Ці результати показують, що гемаглютинін має потенціал підвищення імуногенності антигенів, введених в LS.

Основний білок зовнішньої оболонки гонококу – протеїн I – був включений в LS, що складаються або з суміші DPPC і DOPC у співвідношенні 1 : 1, або з DPPC та DOPE у співвідношенні 1 : 1. Авторами виявлено, що практично весь білок був включений в ліпідний бішар, причому, істотних відмінностей у ступені включення в залежності від ліпідного складу не виявлено, причому близько 80 % білка було орієнтовано назовні, що нагадувало структуру бактеріальної мембрани гонококу. Середній діаметр везикул становив близько 0,5 мкм, але за рахунок додаткової екструзії міг бути помітно зменшений без втрати включення в бішар білка. Проведені дослідження зв'язування LS як з моноклональними антитілами проти даного білка, так і з антитілами, отриманими шляхом імунізації кроликів, продемонстрували досить близькі результати. Склад LS також не

визначав здатності до зв'язування. Досліджувалася імунозахисна дія білка, виділеного з фільтрату культури, з молекулярною масою 30 кД. Як ад'ювант були використані ліофілізовані LS з РС. Імунізація тварин приводила як до клітинних (проліферація Т-клітин і секреція цитокінів), так і до гуморальних реакцій. Враховували виживання та кількість живих мікобактерій в органах: селезінці, печінці, легенях. Результати авторів переконливо показують, що LS є ідеальною системою доставки Vac, яка може нести на собі секреторний білок мікобактерій туберкульозу. LS отримували з суміші фосфоліпідів, холестерину, дицетилфосфату в молярних співвідношеннях 2 : 1,5 : 0,22. Фосфоліпіди у більшості випадків були представлені DMPC. В LS включали ліпід А. Імунізація кроликів зазначеним комплексом приводила до вищого титру антитіл проти ліпиду А, ніж при імунізації чистим ліпідом А.

Очищений антиген Fi *Yersinia pestis* (збудник бубонної чуми), прикріплений до поверхні LS, при внутрішньочеревному введенні мишам стимулював високі титри антитіл у сироватці, а також викликав захисну реакцію при зараженні мишей через слизову оболонку мікробними клітинами в дозі 10^5 *Y. pestis*. Захисна реакція у тварин досягається вже при одноразовій імунізації.

Зі стимульованих мітогенів лімфоцитів щурів отримували безклітинні супернатанти культур, багаті фактором, що активує макрофаги (MAF, англ. – macrophage activating factor). MAF – стимулює макрофаги цитотоксичності до пухлин, секреції цитокінів або видалення патогенів. Отримані супернатанти інкапсулювали в LS різного розміру та ліпідного складу і порівнювали їх здатність надавати нормальним мишачим макрофагам цитотоксичність до пухлинних клітин з аналогічною здатністю неінкапсульованого MAF, який додавали у позаклітинне середовище. Нормальні макрофаги мишей ліній C57BL16, C3H/HeN, оброблені MAF у LS формі, проявляли значні цитотоксичні властивості *in vitro* проти сингенних і алогенних пухлинних клітин, але не вбивали непухлинні клітини. Показано, що LS-MAF роблять макрофаги токсичними для пухлин у 20 000 разів меншій концентрації, ніж вільний MAF.

На можливість використання LS-Vac вказують автори, що вивчають LS як потенційні імуностимулятори. Мишей імунізували антигеном, виділеним з фільтрату культури криптокока та емульгованим у повному ад'юванті Фрейнда. Другу групу тварин імунізували цим самим антигеном, інкапсульованим у LS на основі РС. Імуногенні властивості препаратів оцінювали за реакцією гіперчутливості уповільненого типу та за здатністю захищати тварин від внутрішньочеревного введення живої культури криптококів у кількості 10^5 . Пригнічення

розвитку культури оцінювалося через 7 днів шляхом підрахунку криптококових колонієутворюючих клітин у легенях, селезінці, печінці та головному мозку інфікованих мишей. Отримані результати підтвердили захисний ефект LS форми антигену. Однак при імунізації антигеном, емульгованим у повному ад'юванті Фрейнда, захисний ефект був більш вираженим. Незважаючи на отримані результати, автори оцінюють використання LS форми антигену як дуже перспективної при створенні LS-Vac.

2.3. Протипухлинні вакцини

На поверхні багатьох клітин в організмі існує молекула, що називається *Муцин-1* (MUC-1, англ. – Mucin-1).

MUC-1 – це білок, який експресується на поверхні епітеліальних клітин і є продуктом гіперекспресії у багатьох злоякісних пухлинах. Велика кількість MUC-1 характерна для багатьох ракових клітин. Аномалії в MUC-1 зафіксовані при раку молочної залози, передміхурової залози, яєчників, підшлункової залози та колотерального раку. Дослідження показали, що можна відрізнити антигени MUC-1, які є специфічними для клітин пухлини і нормальних тканин (рис. 2.11). Vac вводиться підшкірно у 4 ділянки тіла. До складу Vac входить імуноад'ювант монофосфорилліпід А – неспецифічний стимулятор, що забезпечує більш інтенсивну взаємодію Vac з клітинами імунної системи. Безпечність ліпиду А була підтверджена у клінічних дослідженнях. Так, наприклад, монофосфорилліпід А як допоміжну речовину введено у комерційну Vac проти папіломи – «Церварікс®» (виробник «Glaxo Smith Kline», Бельгія). Обидва компоненти включені в LS (MUC-1 та ліпід А). Препарат добре переноситься, і при використанні в дозах від 20 до 200 мкг виживання хворих становить від 5,4 до 14,6 місяців.

Слід зазначити, що у 94 % хворих на рак простати слизоутворюючий MUC-1 являє собою глікопротеїн, який пов'язаний зі злоякісною трансформацією та стійкістю до цитотоксичних агентів. Він індукує клітинну імунну відповідь, яка може забезпечити опосередковане імунне знищення пухлини. Vac при раку простати продемонструвала нешкідливість та ефективність.

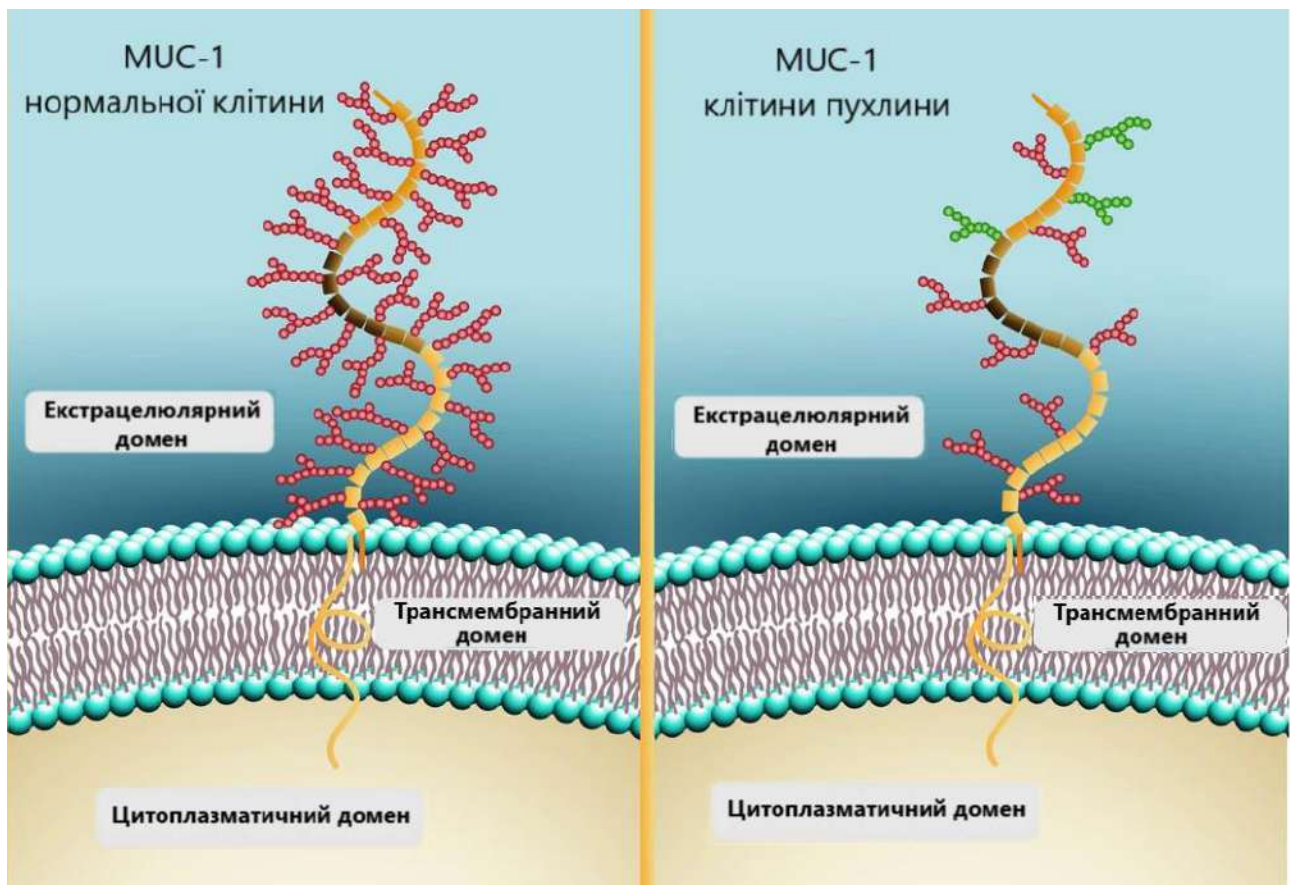


Рисунок 2.11 – Структура MUC-1 у нормальній та пухлинній клітині: MUC-1 гіперглікозилований у нормальних клітинах, а повторювана амінокислотна послідовність (чорна частина) прихована вуглеводними залишками, тоді як у ракових клітинах змінюється кількісний та якісний склад вуглеводів [Vafaei et al., 2022].

Ряд ракових клітин, включаючи клітини раку легенів, містять збільшену кількість пептиду MUC-1 (ці клітини – мішень для терапії).

Розпочато 3-й етап клінічного вивчення недрібноклітинного раку легень. Недрібноклітинний рак легень становить приблизно 75 % всіх ракових захворювань легень. Створена LS-Vac проти цього виду раку – L-BLP-25 («Stimuvaх®»). Доклінічне вивчення показало, що L-BLP-25 генерує потужні типи цитотоксичних Т-хелперів (Th1) для боротьби з MUC-1, має протипухлинну активність як *in vivo*, так і *in vitro* (рис. 2.12). Клінічні дослідження показали, що Vac покращує медіану виживання хворих на недрібноклітинний рак легень і забезпечує клінічно значущі покращення в профілі пухлини і якості життя імунізованих хворих. Клінічні випробування L-BLP-25 проводяться компанією «Merck Seromo Oncothyreon» (фаза IIb/III).

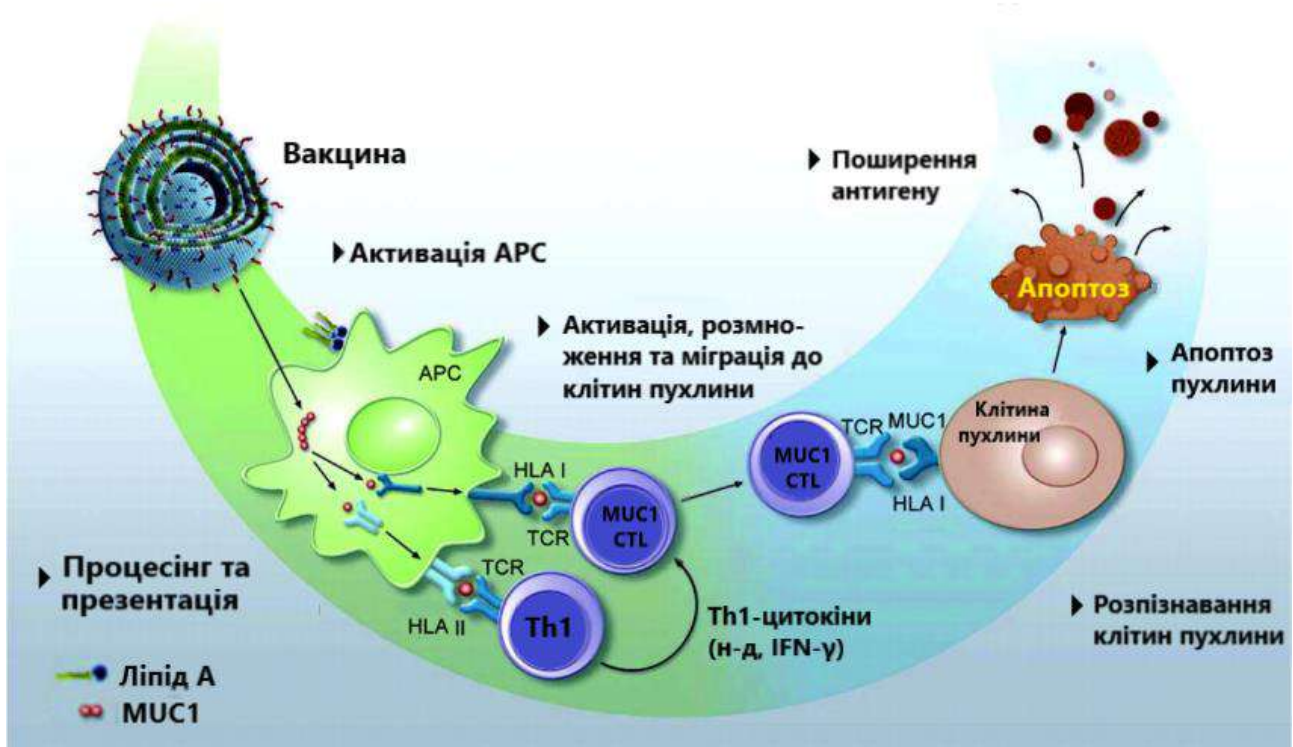


Рисунок 2.12 – Прогнозований механізм дії вакцини L-BLP-25 [Xia et al., 2014]. *Скорочення:* APC – антигенпрезентуюча клітина (англ. – antigen-presenting cell); MUC1 – Муцин-1 (англ. – Mucin-1); MUC1 CTL – MUC1-специфічний цитотоксичний Т-лімфоцит (англ. – cytotoxic T-lymphocyte); TCR – Т-клітинний рецептор (англ. – T-cell receptor); Th1 – Т-хелпер 1-го типу; IFN- γ – інтерферон- γ (англ. – interferon- γ); HLA – лейкоцитарний антиген людини (англ. – human leukocyte antigen).

Клінічні випробування L-BLP-25 проведено на 171 пацієнті віком від 17 до 41 року з недрібноклітинним раком легень. Встановлено відсутність токсичної дії препарату. Більше 54 % хворих були живі понад 24 місяці. Виявлено клінічні переваги LS-Vac. Побічні ефекти, що спостерігались при застосуванні L-BLP-25: почервоніння, больові відчуття в області ін'єкції, кашель, втома, задишка.

Для імунізації мишей використовували клітини мишачої аденокарциноми GZH1, в які був трансформований людський антиген MUC-1, включений в LS. Така імунізація забезпечує повний захист тварин як при підшкірній, так і при внутрішньовенній імунізації пухлинними клітинами.

Особливий інтерес представляють LS-Vac, що містять гліколіпіди – *гангліозиди* (Gang, англ. – ganglioside). Роль Gang у клітині постійно вивчається. У ссавців Gang є невід'ємним компонентом зовнішнього шару плазматичної мембрани, в якій вони взаємодіють з іншими сфінголіпідами, холестерином, трансмембранними білками, включаючи рецептори і переносники сигналів. Встанов-

лено, що Gang є ключовими молекулами у плазматичній мембрані, що беруть участь у процесі адгезії, проліферації та розпізнаванні клітин. Gang локалізуються переважно на поверхні мембран клітин і відіграють важливу роль у міжклітинних взаємодіях, у тому числі в імунологічних процесах. Відомо, що в пухлинній клітині порушено обмін Gang. Деякі з них можуть використовуватися як маркери (GD₂, GD₃, GM₃) та антигени пухлин людини та тварин. Встановлено, що Gang є високоефективними антигенами для отримання моноклональних антитіл та профілактичних Vac. Відомо, що Gang відіграють важливу роль у процесах клітинного диференціювання, рецепції деяких гормонів, бактеріальних токсинів. Gang можуть використовуватися як основа для отримання діагностичних систем та лікарських форм. У ряді пухлин нейроектодермального походження показана неоекспресія Gang, які, на думку ряду авторів, відіграють ключову роль у інфільтрації пухлинних клітин та утворенні метастазів, що робить Gang привабливими молекулами-мішенями для імунотерапії раку.

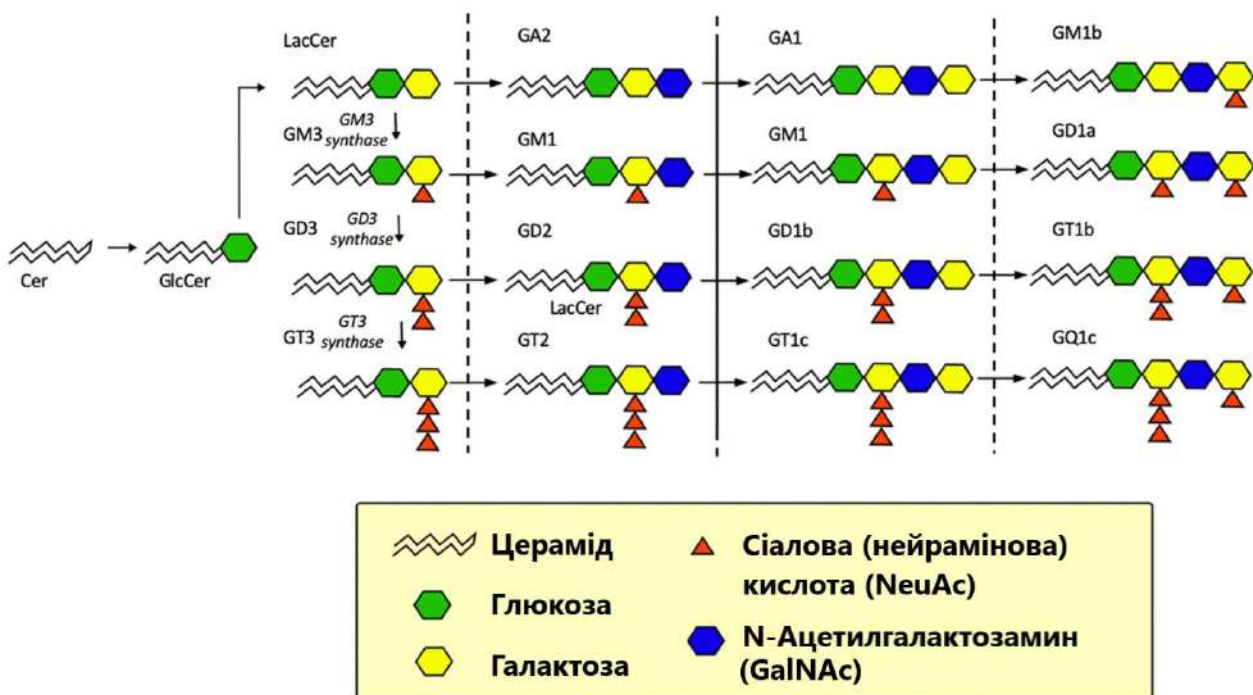


Рисунок 2.11 – Схематичне зображення структури та шляху біосинтезу гангліозидів [Cutillo et al., 2020]

З використанням різних методів очистки, включаючи хроматографічні, були отримані високоочищені фракції Gang мозку великої рогатої худоби (ідентифіковані GM₂, GT_{1b}, GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}) і селезінки (GT_{1b}, GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}). Із еритроцитів коней отримано Gang GM₃-NeuGc, з якого шляхом хімічної моди-

фікації був отриманий Gang GM₃-NeuAc. Вперше встановлено, що до складу олігосахаридної частини Gang GM₃-NeuGc з еритроцитів коней входить залишок N-гліколілнейрамінової кислоти, а церамід містить переважно сфінгозин 20 : 1 і жирну кислоту 24 : 0 . Вважається, що структура визначає фармакологічну активність екзогенного Gang. Отримані нами індивідуальні Gang були досліджені на різних біологічних моделях: при частковій гепатоектомії у щурів виявлено, що Gang GM₃ з еритроцитів коней посилює проліферацію гепатоцитів при індукованому гепатиті, при цьому здатність GM₃ збільшувати включення [3H]тимідину в ДНК не залежала від типу залишку нейрамінової кислоти: N-ацетилнейрамінова (NeuNAc) чи N-гліколілнейрамінова (NeuNGc). Введення щурам з частковою гепатоектомією Gang GM₃-NeuGc приводило до двукратного збільшення специфічної радіоактивності ДНК у порівнянні з контролем. Вплив GM₃ був специфічним, оскільки сумарні Gang мозку великої рогатої худоби, що містять GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b}, GQ, демонстрували відсутність впливу на проліферацію клітин, а ліпиди еритроцитів, з яких був видалений Gang GM₃, не впливали на проліферативну активність клітин.

Досліджено вплив Gang та фосфоліпідів на чутливість пухлинних клітин до цитостатичної та мембранотоксичної дії селезінкових ефекторів. Клітини-мішені обробляли розчином Gang та фосфоліпідними LS. Обробка клітин-мішеней фосфатидилетаноламіном (PE, англ. – phosphatidylethanolamine) викликала підвищення їх чутливості в мембранотоксичному тесті при концентрації ліпиду 200 і 20 мкг/мл. При цих же концентраціях спостерігалось підвищення чутливості пухлинних клітин і в цитостатичних тестах. Кардіоліпін та EPC як у мембранотоксичному, так і в цитостатичному тесті не підвищували чутливості клітин-мішеней до селезінкових ефекторів. Обробка клітин-мішеней препаратами мозкових Gang приводила до вираженого зниження їхньої чутливості до спленоцитів. Використання комбінації EPC/мозкові Gang призводило до різкого підвищення чутливості клітин-мішеней до клітин-ефекторів. Цей ефект залежав від дози Gang. Комбінація PE/мозкові Gang підвищували чутливість клітин-мішеней до спленоцитів у мембранотоксичному тесті меншою мірою, ніж комбінація EPC/мозкові Gang. У цитотоксичному тесті підвищення чутливості клітин-мішеней при використанні комбінації PE/Gang було менш виражено, ніж при використанні одного PE. Встановлено, що сам по собі EPC, введений в мембрану пухлинної клітини-мішені, не впливає на її чутливість до цитотоксичної та мембранотоксичної дії селезінкових ефекторів, а суміш Gang мозку знижує чутливість клітин-мішеней. Вперше показано, що введення в мембрану

клітин-мішеней ЕРС та суміші мозкових Gang істотно підвищує їх чутливість до цитотоксичної та мембранотоксичної дії селезінкових ефektorів. Gang мозку знижують, а тимусні підвищують чутливість пухлинної клітини до мембранотоксичної дії селезінкових ефektorів. Підвищення чутливості передусім обумовлено введенням у мембрану ненасичених жирних кислот і, частково, різницею у структурі полярних головок Gang. Можна припустити, що в цій роботі підвищення чутливості пухлинних клітин до цитотоксичної та мембранотоксичної дії селезінкових ефektorів також пов'язано передусім зі зміною її мембрани під впливом ненасичених жирних кислот ЕРС, а також істотною умовою впливу ефektorів клітин-мішеней є властивості вуглеводних головок Gang мозку, вбудованих у мембрану клітин.

Успішні протиракові Vac націлені на активацію цитотоксичних Т-клітин і, отже, повинні містити потужний антиген і ад'ювант. Було показано, що націлювання антигену на макрофаги CD169 селезінки викликає стійкі відповіді CD8 Т-клітин за допомогою перенесення антигену. Цікаво, що макрофаги CD169 також можуть активізувати природні Т-кілери 1 типу, активуючи їх через ліганди, такі як α -галактозилцерамід (α GalCer, англ. – α -galactosylceramide). α GalCer є природним ад'ювантом за рахунок активації дендритних клітин. Автори включали Gang GM₃ і α GalCer у LS, що містять білок овальбумін (OVA), для досягнення націлювання на CD169. Системна доставка LS з GM₃- α GalCer-OVA приводила до специфічного захоплення CD169 макрофагами селезінки та стимулювання високої продукції інтерферону природними Т-кілерами. Таким чином, LS з антигеном GM₃- α GalCer, є платформою для створення Vac. Дослідження проведено на мишах лінії C57BL/6. LS отримували методом екструзії із ліпідної плівки, отриманої з ЕРС, яєчного фосфатидилгліцерину і холестерину при співвідношенні (3,8 : 1 : 2,5). У хлороформний розчин перед упарюванням додавали 3 мол.% Gang GM₃, 30 мкг α GalCer. Після випарювання хлороформу плівку гідратували у розчині OVA з концентрацією 1 мг/мл. Використовуючи екструзію отримували наночастинки розміром близько 200 нм. LS зберігали при 4 °C протягом 2 місяців.

Підсумок. Наведені у цьому розділі матеріали демонструють використання LS форм Vac для профілактики бактеріальних, вірусних, паразитарних та грибкових інфекцій. Встановлено, що LS різного складу є ефективною системою доставки і презентації різних антигенів. Крім доставки, LS виконують функцію ад'ювантів і можуть використовуватися для створення Vac. Раніше нами

представлені основні принципи конструювання LS наноструктур у навчальних посібниках «Фармацевтична біотехнологія: Біонанотехнологія у фармації та медицині» (2011 р.) та монографії «Ліпосомальні форми лікарських препаратів: технологічні особливості отримання та застосування в клініці» (2016 р.). При отриманні LS конструкцій для створення Vac особливу увагу необхідно приділяти розміру і заряду наночастинок, ламелярній структурі, ліпідному складу LS: насиченості жирних кислот і температурі фазового переходу. Як було показано, розмір LS впливає на презентацію антигену, що у свою чергу може змінювати імунну відповідь організму. На зв'язування антигену з поверхнею LS або інкапсуляцію антигену може впливати поверхневий заряд наночастинок. Так, наприклад, для створення Vac надається перевага катіонним LS, оскільки вони ефективніше взаємодіють з аніонною мембраною клітин імунної системи. Також необхідно враховувати, що заряд, склад LS та структура взаємодії наночастинок/антиген може визначати ступінь інкапсуляції антигену та зниження внаслідок цього імунної відповіді організму. Крім того, необхідно враховувати, що аніонні антигени будуть ефективніше взаємодіяти з катіонними ліпідами. До складу LS входять природні та синтетичні фосфоліпіди. Склад ліпідів у LS може визначати плинність мембрани за рахунок використання ліпідів з різною температурою фазового переходу. Ліпіди з вищою температурою фазового переходу можуть збільшувати жорсткість мембрани наночастинок. У ряді випадків у LS присутній холестерин, який здатний змінювати плинність LS і посилювати гуморальну імунну відповідь. Необхідно зазначити, що ад'юванти відіграють важливу роль в активації та дозріванні антиген-презентуючих клітин для можливої активації Т і В-клітин. В даний час відомо ряд LS-Vac, які використовуються в клініці для попередження захворювань різної етіології, і десятки препаратів знаходяться на стадіях доклінічного та клінічного вивчення.

Контрольні запитання

1. Які вимоги висуваються до ад'ювантів вакцин?
2. Яку роль відіграють ад'юванти у формуванні імунної відповіді?
3. Які види ад'ювантів за походженням та фізико-хімічними властивостями Вам відомі?
4. Які рекомбінантні продукти використовують у складі ліпосомальних вакцин? Які переваги ліпосомальних рекомбінантних вакцин?
5. Що спільного між вірусною частинкою та ліпосоною?

6. Наведіть приклади ліпосомальних вірусних вакцин, опишіть їх структуру і властивості.

7. Наведіть приклади ліпосомальних бактеріальних вакцин, опишіть їх структуру і властивості. Які компоненти бактеріальної клітини використовують як антигени при створенні вакцин?

8. Наведіть приклад ліпосомальних вакцин, до складу яких входить ліпід А. Опишіть їх склад та структуру?

9. Дайте характеристику рибосомальних вакцин та їх ліпосомальних форм.

10. На прикладі ліпосом, які містять антиген MUC-I назвіть переваги ліпосомальних протипухлинних вакцин.

11. У чому перспективність використання гангліозидів як антигенів у складі протипухлинних вакцин?

12. Які переваги мають ліпосомальні вакцини у порівнянні з вакцинами класичного складу?

13. Які фосфоліпіди використовуються у складі ліпосомальної мембрани у вакцинах? Наведіть конкретні приклади?

Список джерел інформації

1. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Бионанотехнология в фармации и медицине : учебное пособие / Ю. М. Краснопольский, А. С. Дудниченко, В. И. Швец. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2011. – 227 с.

2. Швец В. И. Липосомальные формы лекарственных препаратов: технологические особенности получения и применение в клинике : монография / Ю. М. Краснопольский, А. С. Дудниченко, В. И. Швец. – Москва : Ремедиум, 2016. – 200 с.

3. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов : учебное пособие. / Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2009. – 351 с.

4. Богдашин И. В. Исследование действия некоторых ганглиозидов и фосфолипидов на чувствительность опухолевых клеток к цитостатическому и мембранотоксическому действию селезеночных эффекторов / И. В. Богдашин, В. И. Швец, Ю. М. Краснопольский, Б. Б. Фукс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1985. – Т. 50, № 8. – С. 237–239.

5. Краснопольский Ю. М. Исследования действия некоторых ганглиозидов на резистентность мышей к вирусу бешенства / Ю. М. Краснопольский,

В. И. Швец // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1987. – № 12. – С. 698–699.

6. Константинова И. В. Эффект липидных иммуномодуляторов / ганглиозидов и фосфолипидов при экспериментальной гриппозной инфекции у мышей. Клеточные основы противоопухолевого иммунитета. Гибридомы / И. В. Константинова, Р. Я. Подчерняева, В. И. Швец и др. // Тезисы докладов Всесоюзного симпозиума. – Москва, 1985. – С. 40–42.

7. Norling K. Studying the influence of the physicochemical properties of lipid nanoparticles for mucosal vaccine delivery / K. Norling. – Guthenberg, 2017. – P. 1–64.

8. Serrano L. O. Liposome vaccine formulations as prophylactic agents: design considerations for modern vaccine / L. O. Serrano, D. J. Bukhart // Journal of Nanobiotechnology. – 2017. – Vol. 15. – Article No. 83.

9. Патент RU 2648842 С2. Липосомальный препарат, предназначенный для лечения и предупреждения туберкулеза / П. Х. Кардона, И. Аамат, Б. Рейес, А. Селга. – № 2013136379; заявл. 04.01.2012; опубл. 28.03.2018, Бюл. №4.

10. Alving C. R. Army liposome formulation (ALF) family of vaccine adjuvants / C. R. Alving, K. K. Peachmen, G. Matyas et al. // Expert Review of Vaccines. – 2020. – Vol. 19, No. 3. – P. 279–292.

11. Yin X. G. Synthesis and evaluation of liposome anti-GM3 cancer vaccine candidates covalently and noncovalently adjuvanted by α -GalCer / X. G. Yin, J. Lu, J. Wang et al. // Journal of Medicinal Chemistry. – 2021. – Vol. 64, No. 4. – P. 1951–1965.

12. Twihaar M. N. Optimization of a GM3-containing liposomal vaccine that delivers antigen to CD169⁺ splenic macrophages / M. N. Twihaar, C. Colomol, J. Grabovska et al. // Journal of Immunotherapy Cancer. – 2020. – Vol. 8, No. 3. – P. A506.

13. Grabovska J. Liposomal nanovaccine containing α -galactosylceramide and ganglioside GM3 stimulates robust CD8⁺ T cell responses via CD169⁺ macrophages and cDC1 / J. Grabovska, D. A. Stolk, H. J. Twihaar et al. // Vaccines. – 2021. – Vol. 9, No. 1. – Article No. 56.

14. Гру-Дегрут С. Ганглиозиды при раке молочной железы: новые перспективы / С. Гру-Дегрут, И. Герардель, С. Жульен, П. Деланной // Биохимия. – 2015. – Т. 80, № 7. – С. 267–279.

15. Wang N. Liposomes used as a vaccine adjuvant-delivery system: From basics to clinical immunization / N. Wang, M. Chen, T. Wang // Journal of controlled

release : official journal of the Controlled Release Society. – 2019. – Vol. 303. P. 130–150.

16. Herzog C. Eleven years of Inflexal V-a virosomal adjuvanted influenza vaccine / C. Herzog, K. Hartmann, V. Künzi et al. // *Vaccine*. – 2009. – Vo. 27, No. 33. – P. 4381–4387.

17. Kaslow D. C. RTS,S: Toward a first landmark on the Malaria Vaccine Technology Roadmap / D. C. Kaslow, S. Biernaux // *Vaccine*. – 2015. – Vol. 33, No. 52. – P. 7425–7432.

18. Ogawa C. Muramyl dipeptide and its derivatives: peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy / C. Ogawa, Y. J. Liu, K. S. Kobayashi // *Current bioactive compounds*. – 2011. – Vol. 7, No. 3. – P. 180–197.

19. Ganguly N. Role of M. tuberculosis RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence / N. Ganguly, I. Siddiqui, P. Sharma // *Tuberculosis*. – 2008. – Vol. 88, No. 6. – P. 510–517.

20. Vafaei R. Comparison of mucin-1 in human breast cancer and canine mammary gland tumor: a review study : [Электронный ресурс] / R. Vafaei, M. Samadi, A. Hosseinzadeh et al. // *Cancer cell international*. – 2022. – Vol. 22, No. 14. – Режим доступа : <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02398-6>

21. Xia W. L-BLP25 as a peptide vaccine therapy in non-small cell lung cancer: a review / W. Xia, J. Wang, Y. Xu et al. // *Journal of thoracic disease*. – 2014. – Vol. 6, No.10. – P. 1513–1520.

22. Cutillo G. Physiology of gangliosides and the role of antiganglioside antibodies in human diseases / G. Cutillo, A. H. Saariaho, S. Meri // *Cellular & molecular immunology*. – 2020. – Vol. 17, No.4. – P. 313–322.

23. Avila-Perez G. Reverse Genetic Approaches for the Generation of Recombinant Zika Virus / G. Avila-Perez, A. Nogales, V. Martin et al. // *Viruses*. – 2018. – Vol. 10, No. 11. – Article No. 597.

24. Ebola Zaire Vaccine (rVSVΔG-ZEBOV-GP, live). EMA assessment report. – European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2019. – 117 p.

25. Kim I. J. Efficacy of an inactivated Zika vaccine against virus infection during pregnancy in mice and marmosets / I. J. Kim, P. A. Lanthier, M. J. Clark et al. // *NPJ Vaccines*. – 2022. – Vol.7, No.1. – Article No. 9.

26. Tebas P. Safety and Immunogenicity of an Anti-Zika Virus DNA Vaccine / Tebas P., Roberts C.C., Muthumani K. et al. // *The New England journal of medicine*. – 2021. – Vol.385, No.12. – Article No e35.

ГЛАВА 3. ФАРМАЦЕВТИЧНА РОЗРОБКА ЛІПОСОМАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ

Широкий інтерес до нанобіотехнологічних продуктів, зокрема до ліпосомальних (LS, англ. – liposome, liposomal) препаратів, у фармації цілком зрозумілий – ці засоби, маючи широкий спектр дії, інтенсивно використовуються для діагностики, профілактики та лікування захворювань різної етіології. *Створення LS препаратів є одним з перспективних напрямків сучасної нанофармакології, що обумовлено такими їх перевагами:*

- ✓ LS підвищують біодоступність інкапсульованих у них активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ), підвищуючи їх фармакологічну ефективність та дозволяючи зменшити ефективну дозу АФІ;
- ✓ LS пролонгують дію АФІ;
- ✓ LS дозволяють перевести ліпофільні АФІ у водорозчинну форму для парентерального введення (гідрофобні антибіотики та гормони, антраль, біофлаваноїди, поліфеноли та ін.);
- ✓ LS захищають АФІ від деградації ферментами та макрофагами організму;
- ✓ LS зменшують токсичний вплив АФІ на організм (протипухлинні препарати – іринотекану гідрохлорид, доксорубіцину гідрохлорид, препарати платини та ін.);
- ✓ LS повністю біодеградує в організмі людини.

Кількість LS лікарських форм на світовому фармацевтичному ринку становить понад 50 препаратів, 5 із яких розроблені та ліцензовані в Україні. Дослідження, розпочаті в Україні на початку 90-х років, привели до створення LS лікарських препаратів різної спрямованості: «Ліпін[®]» – порожні LS на основі фосфатидилхоліну яєчного жовтку (EPC, англ. – egg phosphatidylcholine) (пульмонологія, кардіологія, нефрологія, акушерство та гінекологія); «Ліподокс[®]» – LS форма доксорубіцину (онкологія); «Ліюлів[®]» – LS форма антралю (гепатопротектор); «Ліпофлавіон[®]» – LS форма кверцетину (випускається у двох лікарських формах: очні краплі (офтальмологія) і ін'єкційна форма (кардіологія, он-

кологія)). Зазначені LS препарати знайшли широке застосування в клініках України. У наступні роки колективом авторів були запропоновані технології отримання LS препаратів, що містять різні АФІ, вивчені їх фізико-хімічні та фармакологічні властивості: іринотекану гідрохлорид, цитохром С, коензим Q10, куркумін, цисплатин, доцетаксел, латанопрост і ряд інших продуктів, у тому числі і комплексних LS препаратів, що містять декілька АФІ.

Науковцями кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії НТУ «ХПІ» протягом останніх років проводяться дослідження з розробки технології та вивчення фармакологічних властивостей ліпосомальних препаратів різної направленості. Докладно способи одержання LS форм та основні етапи технологій окремих LS препаратів описані на сторінках навчальних посібників «Фармацевтична біотехнологія: Біонанотехнологія у фармації та медицині» (2011 р.), «Фармацевтична біотехнологія: Біотехнології виробництва готових лікарських форм» (2020 р.). Даний розділ присвячений деяким аспектам фармацевтичної розробки LS лікарських препаратів.

3.1. Вибір складу ліпосомальних препаратів

Провівши аналіз складу запропонованих за ці роки LS форм препаратів, необхідно зазначити, що до складу LS входять: АФІ, фосфоліпіди, холестерин (Chol, англ. – cholesterol), похідні поліетиленгліколю (PEG, англ. – polyethylene glycol), стабілізатори (кріопротектори); буферні системи, що забезпечують структуру LS, їхні фізико-хімічні та фармакологічні властивості. Найважливішим компонентом LS мембрани є фосфоліпіди.

Фосфоліпіди. Основними мембраноутворюючими компонентами LS препаратів є фосфоліпіди різної структури (природні та синтетичні), що відрізняються зарядом, насиченістю жирних кислот, властивостями полярних груп. Ефективність LS певною мірою залежить від властивостей самих фосфоліпідів.

Будова фосфоліпідів характеризується присутністю гідрофобних і гідрофільних фрагментів у складі однієї молекули, а також різноманітністю будови кожного з цих фрагментів, що значною мірою визначає роль фосфоліпідів у цілому ряді клітинних процесів (рис. 3.1): структурна функція – *суміш фосфоліпідів має утворювати стабільний бішар* для функціонування мембранних білків (до таких фосфоліпідів відносяться фосфатидилхолін (PC, англ. – phosphatidylcholine), фосфатидилгліцерин (PG, англ. – phosphatidylglycerol), сфінгомієлін, фосфатидилінозит (PI, англ. – phosphatidylinositol) та ін.), але водночас у

мембрані присутні деякі *фосфоліпиди*, які здатні до утворення *небіслойних структур* (фосфатидилетаноламін (PE, англ. – phosphatidylethanolamine), дифосфатидилгліцерин (DPG, англ. – diphosphatidylglycerol), фосфатидна кислота (PA, англ. – phosphatidic acid) та ін.). Утворення таких сильно викривлених ділянок мембрани необхідно при контакті між мембранами (процес злиття клітин) або при зв'язуванні певних білків у мембрані, що забезпечує існування мембрани в функціонально активному стані.

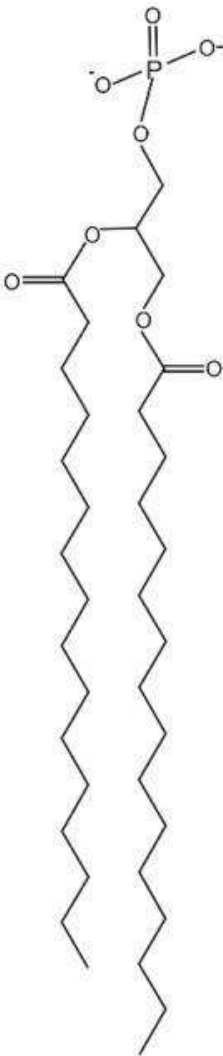

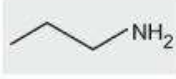
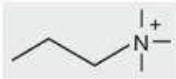
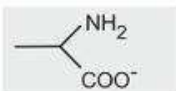
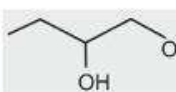
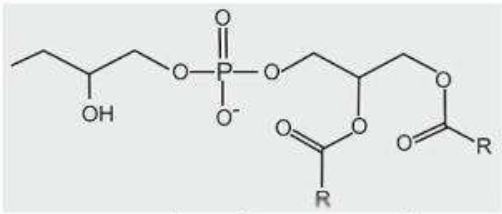
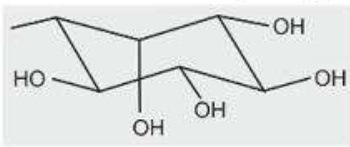
Базова структура фосфоліпідної молекули	Функціональна група	Фосфоліпід / Характеристика
	 Гідроген	PA Аніонний
	 Етаноламін	PE Цвітер-йон
	 Холін	PC Цвітер-йон
	 Серин	PS Аніонний
	 Гліцерин	PG Аніонний
	 Фосфатидилгліцерин	DPG Аніонний
	 Інозит	PI Аніонний

Рисунок 3.1 – Структура основних природних фосфоліпідів [Aktas et al., 2014]

При гідратації у водній фазі фосфоліпіди спонтанно утворюють LS завдяки своїм термодинамічним фазовим властивостям. При виборі фосфоліпідного компонента необхідно враховувати *температуру фазового переходу*, тобто температуру, при якій фосфоліпіди переходять з гелю у рідкокристалічну фазу. Температура фазового переходу залежить від структури молекули фосфоліпіду, насиченості жирних кислот і структури полярних груп. Необхідно враховувати, що природні фосфоліпіди, що містять у двох положеннях різні жирні кислоти, мають нестандартну температуру фазового переходу, тим більше, що природний, наприклад, ЕРС, представлений сімейством РС, що містять ряд жирних кислот, і не має чіткої температури фазового переходу. Фосфоліпіди з жирними кислотами з довгим ланцюгом мають вищу температуру фазового переходу. При використанні фосфоліпідів з температурою нижче температури фазового переходу вони знаходяться у гелевій фазі, що у свою чергу надає LS низьку плинність і проникність. При отриманні LS при температурі вище, ніж температура фазового переходу, фосфоліпіди знаходяться у рідкокристалічній фазі, що забезпечує більшу плинність і проникність. Необхідно відзначити, що така структура може одночасно ускладнювати проникнення гідрофільних АФІ через мембрану LS.

Самостійним питанням є вибір фосфоліпідів для основи LS. *При виборі мембраноутворюючих фосфоліпідів керуються рядом вимог:*

- ✓ максимальне включення АФІ у бішар або у водну фазу LS;
- ✓ стабільність LS як при отриманні емульсії LS, так і при гідратації після ліофілізації;
- ✓ стабільність LS та АФІ при зберіганні;
- ✓ відсутність небажаних реакцій та зниження побічної дії при введенні в організм та ін.

Були вивчені як природні (ЕРС, гідрогенізований соєвий фосфатидилхолін (HSPC, англ. – hydrogenated soybean phosphatidylcholine), фосфатидилхолін соняшника (SFPC, англ. – sunflower phosphatidylcholine)), так і синтетичні (дипальмітоїлфосфатидилхолін (DPPC, англ. – dipalmitoylphosphatidylcholine), диміристоїлфосфатидилхолін (DMPC, англ. – dimyristoylphosphatidylcholine), дистеароїлфосфатидилхолін (DSPC, англ. – distearoylphosphatidylcholine) та ін.) фосфоліпіди.

На думку ряду дослідників необхідно уникати використання ненасичених фосфоліпідів у зв'язку з тим, що вони схильні до процесів перекисного окислення. На нашу думку, можливе використання ненасичених фосфоліпідів, зок-

рема ЕРС, причому, використання даного ліпіда має ряд істотних переваг, у тому числі й економічних. Для запобігання перекисного окислення ЕРС використовують ряд захисних заходів:

- на етапі отримання ліпідної плівки та її гідратації використовують азот або аргон, а також проводять процес отримання LS у захисному середовищі зазначених газів;
- обмеження освітленості;
- у тих випадках, де це можливо, на технологічних етапах використовують режим зберігання рідкого препарату при температурі 2–8 °С;
- зберігання LS після ліофілізації протягом всього терміну зберігання при температурі близько мінус 10 °С;
- герметизацію ліофілізованих препаратів проводять в атмосфері захисного газу.

Вид АФІ також може визначати вибір того чи іншого фосфоліпіду. Водночас, на нашу думку, вплив структури АФІ не значно впливає на вибір фосфоліпіду. Так, при отриманні LS форм антрациклінів створено кілька LS лікарських форм, що не відрізняються за фармакологічною дією, але склад яких різний:

- ✓ «Doxil®» (HSPC : Chol : PEG-2000-DSPE у співвідношенні 56 : 38 : 5);
- ✓ «Myocet®» (ЕРС : Chol у співвідношенні 1 : 1);
- ✓ «Daune-Home®» (DSPC : Chol у співвідношенні 2 : 1);
- ✓ «Ліподокс®» (ЕРС : Chol у співвідношенні 0,85 : 0,15).

Як видно з наведених даних до складу LS форм антрациклінів введені різні фосфоліпіди: ЕРС, HSPC, DSPC. При визначенні фосфоліпідів для створення LS обов'язково має бути проведено вивчення впливу будови молекули та її заряду на властивості наночастинок, ступеня ненасиченості жирнокислотних залишків і продуктів перекисного окислення ліпідів та інших факторів.

У складі LS форм використовують фосфоліпіди:

- ✓ нейтральні (різні види РС);
- ✓ аніонні (DPG, PG, PA, PI);
- ✓ катіонні (PE, диолеїлфосфатидилетаноламін (DOPE, англ. – dioleoyl-phosphatidylethanolamine), 1,2-диолеїлокси-3-[триметиламоній]-пропан (DOTAP, англ. – 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane).

Наприклад, у складі препарату «Visudin®» міститься PG; «DepoCyt®» – дипальмітоїлфосфатидилгліцерин (DPPG, англ. – dipalmitoylphosphatidylglycerol); вакцина проти гепатиту А – DOPE.

Проведені дослідження із включення у бішар *LS* мембран аніонних фосфоліпідів при отриманні *LS* форм цитохрому *C*, доцетаксела, убіхінона, оксаліплатина, куркуміна та ін. продемонстрували наступні переваги:

- ✓ збільшення включення активної субстанції в *LS*;
- ✓ стабілізація і стандартизація *LS* емульсії;
- ✓ підвищення технологічності процесу за рахунок підвищення швидкості фільтрації *LS* емульсії;
- ✓ стабільність *LS* емульсії при регідратації ліофілізованого препарату.

Крім того, введення аніонних фосфоліпідів дозволяло пролонгувати дію лікарського препарату. Наприклад, включення DPPG до складу мембрани на основі EPC дозволяє збільшити відсоток включення цитохрому *C* у *LS* за рахунок взаємодії негативно зарядженого DPPG з позитивно зарядженим цитохромом *C*, що ґрунтується на специфічній взаємодії білкової молекули з аніонними фосфоліпідом. Показана ефективність *LS* форми цитохрому *C* у ряді фармакологічних моделей. Необхідно зазначити, що однозначної думки щодо використання негативних і позитивних фосфоліпідів не існує. На прикладі цитохрому *C* одні автори підтверджують ефективність аніонних фосфоліпідів, інші – катіонних.

Холестерин. У ряд *LS* лікарських препаратів було запропоновано вводити Chol. При аналізі вмісту Chol у *LS* препаратах звертає на себе увагу той факт, що Chol в основному міститься у продуктах, які містять гідрофільні АФІ («Doxil[®]», «ДероСут[®]», «Ліподокс[®]», *LS* форма іринотекану гідрохлориду та ін.). Chol є критичним компонентом як при утворенні *LS*, так і в процесі вивільнення гідрофільних молекул з *LS*. Chol впливає на плинність і проникність *LS* мембрани з EPC.

Chol був використаний при розробці *LS* лікарських форм, що містять гідрофільні АФІ: доксорубцін та іринотекан. Обидві лікарські форми отримані при використанні методу ліпідної плівки, гомогенізації високим тиском і методу градієнта рН. При вивченні залежності ступеня інкапсуляції іринотекану від складу *LS* виявлено таке включення АФІ:

- EPC (100% мас) – 33 %;
- EPC: Chol (95 : 5 % (мас.)) – 44 %;
- EPC : Chol (85 : 15% (мас.)) – 57 %;
- EPC : Chol (70 : 30 % (мас.)) – 71 %.

Зі збільшенням вмісту Chol зростає ступінь інкапсуляції іринотекану гідрохлориду. Однак при співвідношенні EPC : Chol 70 : 30 % (мас.) підвищується

жорсткість мембрани, що вимагає збільшення тиску при стерилізуючій фільтрації. Крім того, під час аналізу розміру частинок методом лазерної дифракції виявлено присутність частинок з діаметром більше 5 мкм, що свідчить про неоднорідність емульсії, а також впливає на можливість проведення стерилізуючої фільтрації. Ґрунтуючись на отриманих даних для подальших експериментів обрано співвідношення EPC : Chol (85 : 15 % (мас.)). Експеримент показав, що мембрани з EPC (100 %), EPC : Chol (95 : 5 %) не мають високого ступеня інкапсуляції, а також нестабільні при ліофілізації з використанням різних кріопротекторів. Також показано, що LS розміром понад 220 нм відсутні. Мембрана LS на основі EPC : Chol (85 : 15 %) демонструє високий ступінь інкапсуляції і стабільність при ліофілізації. Як кріопротектори використовували трегалозу в концентрації 6,0 %.

Аналогічні дані були отримані при розробці LS форми доксорубіцину. Chol зменшував вивільнення доксорубіцину з LS і при цьому збільшувалася протипухлинна активність. Встановлено, що включення Chol в LS може призводити до збільшення розміру частинок, отриманих при ліофілізації, а також зниження кількості АФІ, включеного в LS. Ймовірно, присутність Chol зменшує ступінь проходження гідрофільних АФІ в LS і вихід гідрофільних АФІ з LS.

Склад препарату також визначає технологічні параметри ліофілізації LS препаратів. Встановлено, що повільне заморожування LS призводить до збільшення відсотка включення АФІ після ліофілізації та регідратації у порівнянні зі швидким заморожуванням. Так, «жорсткі» LS, що містять Chol, більшою мірою зберігали свою структуру при повільному заморожуванні, ніж при швидкому. АФІ та фосфоліпідний склад LS визначає потребу наночастинок у Chol.

Розроблені нами LS препарати з ліпофільними АФІ в якості основного фосфоліпиду містять EPC, в якому представлені переважно ненасичені жирні кислоти. Ймовірно, ліпофільні компоненти, вбудовуючись у ліпідний бішар приводять до збільшення «жорсткості» мембрани і не вимагають стероїдного компонента у складі LS. Також, необхідно зазначити, що введення Chol в LS з ліпофільними компонентами істотно ускладнює процес стерилізуючої фільтрації емульсії через мембрани з розміром пор не більше 0,22 мкм, що може бути пов'язано з підвищенням «жорсткості» мембран LS. У зв'язку з тим, що наявність Chol в LS не приводила до збільшення включення АФІ в наночастинки і погіршувала технологічні параметри отримання LS, було прийнято рішення відмовитися від застосування стеринів для ліпофільних субстанцій: кверцетину («Ліпофлавон[®]»), антралю («Ліолів[®]»), куркуміну, коензиму Q10 та ін. Також

необхідно відзначити, що наявність високого вмісту Chol у мембрані LS призводило до зниження швидкості проникнення гідрофільної лікарської субстанції (антрациклінові антибіотики – доксорубцін, епірубіцин, ідарубіцин; фторурацил, препарати платини, іринотекан) у наночастинки.

Кріопротектори. Запропоновані LS препарати представлені ліофілізованими формами, що дозволяє стабілізувати нанорозміри і забезпечує триваліший термін зберігання. Для збереження нанорозмірів при ліофілізації необхідне введення до складу LS кріопротекторів. *При виборі кріопротектора та визначенні його концентрації керуються такими вимогами:*

- ✓ збереження нанорозмірів LS протягом терміну зберігання;
- ✓ продукт повинен легко розчинятися при введенні людині;
- ✓ не впливати на фізико-хімічні та фармакологічні властивості LS;
- ✓ не впливати на технологічні параметри отримання LS.

До складу розроблюваних LS препаратів як кріопротектори були введені дисахариди: лактози моногідрат і трегалози дигідрат у різних концентраціях. Кількість дисахаридів у запропонованих препаратах відрізняється. Вміст кріопротекторів у LS емульсії становить від 2,5 % до 6,0 % залежно від складу препарату, що забезпечує збереження нанорозмірів LS при ліофілізації та зберіганні.

Буферні системи – регулятори рН. Як компоненти буферного розчину використовують фосфатну буферну систему. Дана буферна система не токсична і широко використовується при виробництві лікарських препаратів. Для технології градієнта рН при включенні АФІ крім фосфатного сольового буфера був використаний цитрат, що входить до складу LS форми і міститься в організмі людини (цикл трикарбонових кислот). Зазначені буферні системи широко використовуються у фармацевтичній технології як стабілізатори рН. Використання буферних сумішей дозволяє стабілізувати рН як самих наночастинок, так і АФІ, що входять до їхнього складу. рН LS препаратів знаходився в межах від 5,0 до 7,4.

3.2. Комплексні ліпосомальні препарати

LS є ефективними наноконтейнерами для доставки ліків, крім того, LS дозволяють створювати комплексні препарати шляхом включення кількох АФІ. Останнім часом активно розробляються LS комплексні препарати, які містять два або більше АФІ. Такі препарати містять у своєму складі антибіотики, гор-

мони, антиоксиданти та ін. Як ліпідні компоненти використовують широкий спектр природних і синтетичних фосфоліпідів.

Безсумнівний інтерес викликають комплексні антиоксидантні препарати. Процеси перекисного окислення ліпідів беруть участь у регуляції функцій клітин та таких фізіологічних процесах, як окисне фосфорилування, мембранний транспорт йонів, мітоз, синтез простагландинів і стероїдів тощо. У разі інтенсифікації процесів перекисного окислення утворюються надлишкові активні форми кисню, які призводять до порушення цілісності ліпідного бішару клітинних мембран, наслідком чого стає пасивний транспорт йонів та метаболітів. Порушення рівноваги між синтезом і елімінацією вільних радикалів відіграє важливу роль у розвитку багатьох захворювань, у тому числі запальних, імунних, кардіологічних, онкологічних, офтальмологічних та ін. Враховуючи роль вільних радикалів у протіканні різних патологій, однією з найбільш перспективних стратегій в останні роки є підвищення ефективності вже відомих природних антиоксидантів. Серед таких природних речовин активно вивчаються біофлавоноїди, що представляють велику групу рослинних поліфенолів.

Нами запропоновано комплексний LS препарат на основі двох біофлавоноїдів – кверцетину та куркуміну. Роботи проведені на кафедрі біотехнології, біофізики та аналітичної хімії НТУ «ХП».

Куркумін – поліфенол рослинного походження, виділений із кореневища *Curcuma Longa L.* Протягом останніх років підтверджена його протизапальна, протипухлинна, гепатопротекторна, нейропротекторна, ранозагоювальна, антибактеріальна, антикоагулянтна та ін. фармакологічна активність. Ряд досліджень спрямовані на вивчення куркуміну як протипухлинного агенту, оскільки він приймає участь у регуляції ряду молекулярних механізмів, що відіграють важливу роль у процесі канцерогенезу: стимуляція апоптозу, інгібування факторів росту онкологічних клітин (наприклад, NF-κB) і прозапальних цитокінів, зв'язування активних форм кисню і зменшення запалення. Використання куркуміну в терапії цукрового діабету показало збільшення чутливості до інсуліну, регенерації β-клітин острівців Лангерганса, стимуляції секреції інсуліну і С-пептиду, активації глікогенезу в печінці, нормалізації ліпідного обміну, а також зниження інтенсивності всмоктування вуглеводів у травному тракті. Перспективним напрямком є застосування куркуміну як нейропротектору, зокрема при хворобі Паркінсона, Альцгеймера та інсульті. Показано, що куркумін може частково запобігати появі нових бляшок і значно зменшувати існуючі відкладення β-амілоїду.

Кверцетин являє собою високоактивний біофлавоноїд із доведеною антиоксидантною активністю, який блокує процеси ланцюгових реакцій вільнорадикального окислення, запобігаючи надмірному окисленню ліпідів, білків та нуклеїнових кислот та захищаючи клітинні мембрани від пошкодження оксидантами. Антиоксидантні та протизапальні властивості кверцетину обумовили його застосування у терапії серцево-судинних, нейродегенеративних, офтальмологічних, запальних захворювань печінки, діабету та ін. При лікуванні діабету кверцетин виявляв плейотропну дію, що включала інгібування абсорбції глюкози у кишечнику, інсулін-сенсibiliзуючу активність, покращення метаболізму глюкози у периферичних тканинах. Показана гепатопротекторна дія кверцетину на моделі ураження печінки щурів. Велика кількість робіт присвячена застосуванню кверцетину в кардіології. Він продемонстрував кардіопротекторну активність за рахунок зменшення наслідків оксидативного стресу та регуляції ліпідного обміну при атеросклерозі, ішемії-реперфузії міокарду, інфаркті міокарду та ін.

Враховуючи велику доказову базу відносно фармакологічної активності кверцетину та куркуміну, розробка комплексної LS композиції дозволить створити ефективний антиоксидантний засіб за рахунок синергізму цих двох АФІ, а LS форма дозволить створити ін'єкційну форму ліпофільних АФІ, тим самим підвищити їх біодоступність. Ефект синергізму кверцетину та куркуміну за рахунок підвищення загальної антиоксидантної активності та зниження рівня продуктів перекисного окиснення ліпідів був відмічений рядом авторів. Були виявлені мембранопротекторні властивості, що сприяють підвищенню захисного та адаптаційного потенціалу тіла щурів. Кверцетин та куркумін у вільній формі вводили *per os* з мишами з раком легенів, і було показано, що використання обох біофлавоноїдів як окремо, так і разом покращувало масу тіла мишей та сприяло зменшенню маси легень. Важливо, що спільне застосування кверцетину та куркуміну знижувало рівень продуктів перекисного окиснення ефективніше, що може бути пов'язано з тим, що ці два антиоксиданти впливають на різні ланки антиоксидантної системи (кверцетин впливає на активність глутатіон трансферази та відновлює вміст відновленого глутатіону, а куркумін – на активність антиоксидантних ферментів: супероксиддисмутази (СОД) і каталази та мають вищий терапевтичний ефект при комбінованому застосуванні.

Через гідрофобну природу застосування біофлавоноїдів обмежується прийомом *per os*, що характеризується низькою біодоступністю і потребує високих доз АФІ. Рядом вчених проводяться роботи зі створення комплексних LS

препаратів. У тому числі проводяться роботи зі створення комплексних LS форм на основі кверцетину, куркуміну та інших АФІ: отримано стабільні багаточастикові LS із куркуміну та вітаміну D₃; отримано LS наночастинки поліфенольних антиоксидантів кверцетину та епігалокатехін-3-галату та підтверджено їх синергетичний антиоксидантний ефект; соінкапсуляція леводопа та куркуміна у ліпідний бішар та СОД у водну фазу LS наночастинок, на думку авторів, дозволило підвищити ефективність профілактики хвороби Паркінсона. Нами підтверджено ефективність комплексного застосування LS форм антиоксидантів кверцетину та коензиму Q10 при окремому та комплексному введенні щурам лінії Vistar із моделлю ішемічної хвороби серця (ІХС). Застосування одразу двох LS антиоксидантів приводило до нормалізації більшості біохімічних маркерів оксидативного стресу у крові та серцевому м'язі щурів, чого не спостерігалось при введенні LS кверцетину та LS коензиму Q10 окремо.

Перед нами стояло завдання отримати комплексний LS антиоксидантний препарат, до складу якого входять куркумін і кверцетин. На нашу думку, *створення комплексних LS препаратів може реалізовуватися двома шляхами*: одночасне включення АФІ в бішар LS або включення кожного АФІ в LS з наступним об'єднанням двох стандартизованих емульсій наночастинок. Перший варіант, на нашу думку, є невиправданим, оскільки одночасне додавання двох АФІ в LS може призвести до їх конкуренції за включення в бішар наночастинок. Крім того, такий спосіб ускладнює стандартизацію продукту. Другий варіант дозволяє отримати дві наноемульсії стандартного складу з відомим розміром LS і з відомою кількістю інкапсульованого АФІ. У своїй роботі ми використовували другий підхід, отримавши попередньо дві стандартизовані наноемульсії куркуміну та кверцетину (рис. 3.2).

При створенні комплексного препарату були вивчені кілька фосфоліпідів: ЕРС, РС сої і соняшника. Визначено оптимальні співвідношення між біофлавоноїдами і РС. Причому, найбільш ефективним виявився ЕРС. Включення до складу LS Chol не приводило до покращення включення куркуміну та кверцетину у наночастинки і стабілізації LS. У той же час, введення в LS DPPG дозволило збільшити відсоток включення АФІ у LS, зберегти однорідність розмірів і покращити технологічність процесу отримання LS. Включення гідрофобних антиоксидантів у бішар LS становило не менше 85 %. Препарати ліофілізували, розмір наночастинок при гідратації становив не більше 300 нм.

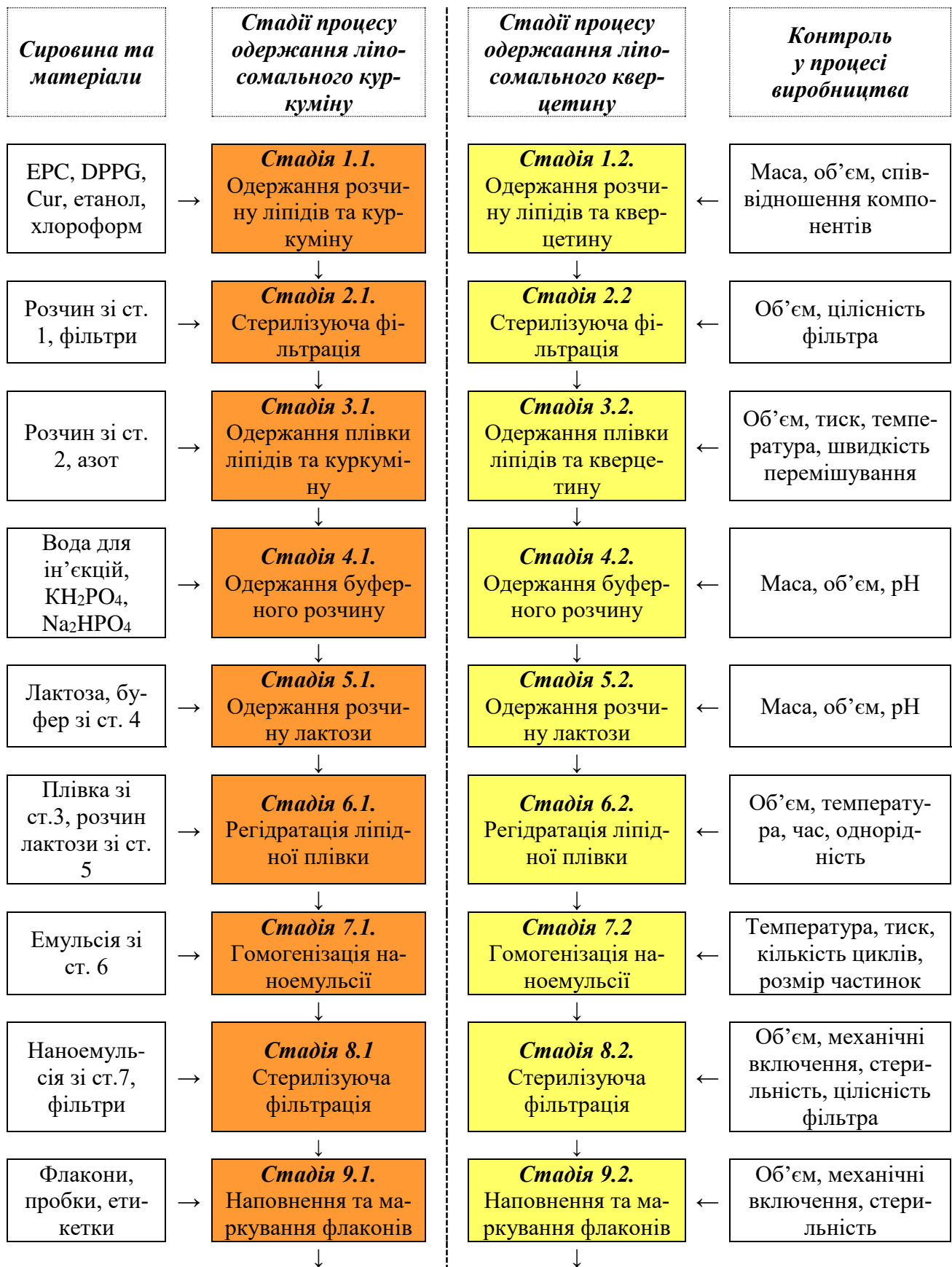


Рисунок 3.2 – Блок-схема технологічного процесу одержання комплексного LS препарату кверцетину та куркуміну

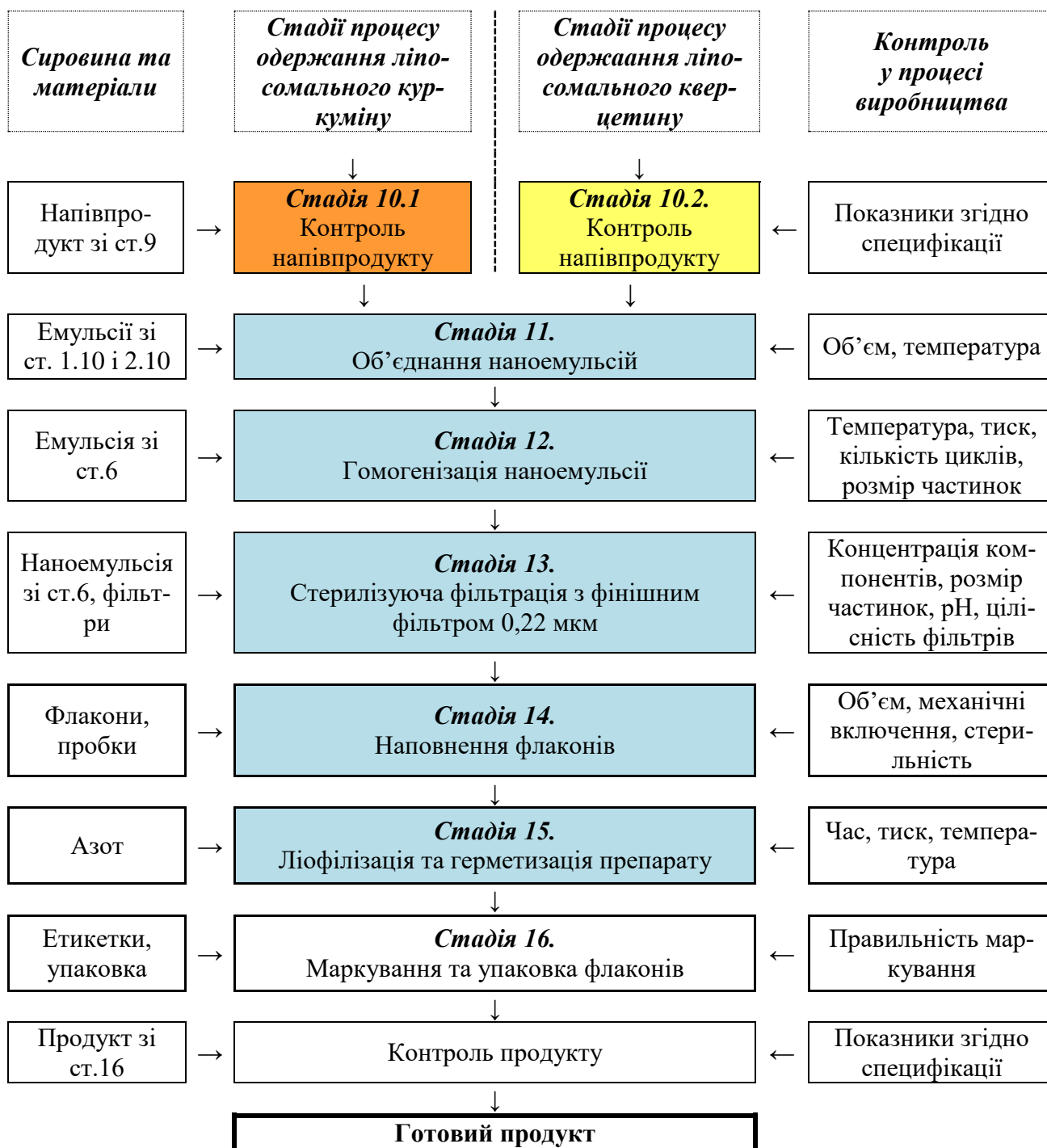


Рисунок 3.2 – Блок-схема технологічного процесу одержання комплексного LS препарату кверцетину та куркуміну (продовження)

При дослідженні фармакологічної активності комплексних препаратів особливу увагу необхідно приділяти вивченню синергізму АФІ шляхом порівняння антиоксидантної активності комплексних препаратів та LS препаратів, що містять лише один АФІ.

Досліджено вплив LS форм кверцетину, куркуміну та комплексного LS препарату на маркери окисного стресу на моделі ІХС щурів у дозі 10 мг/кг протягом 5 днів (табл. 3.1).

Таблиця 3.1 – Результати вивчення антиоксидантної активності LS препаратів кверцетину та куркуміну на моделі ІХС у сироватці крові щурів

Показник	Контроль	Модель ІХС	LS кверцетин	LS куркумін	Комплексний препарат
МДА, мкМ/л	2,09±0,07	5,87±0,08	2,54± 0,12	4,08± 0,10	1,80± 0,03
ДК, мкМ/л	51,33±0,65	88,87±0,38	59,53±0,62	77,69±0,71	47,83±0,32
СОД, у.о./сек./л	33,83±1,01	40,80±0,36	52,75±0,78	44,55±0,33	31,11±0,44
Каталаза, мкМ/л	20,62±0,37	27,68±0,29	38,77±0,34	32,54±0,39	19,22±0,26
SH-групи, мМ/л	12,91±0,12	7,16±0,17	7,73±0,23	10,05±0,38	13,54±0,29
ЗАА, %	52,32±0,64	31,18±0,47	57,04±0,42	47,48±0,50	49,54±0,37
ПБ, од./мг білка	0,127±0,01	0,336±0,02	0,101±0,01	0,206±0,01	0,108±0,01

Скорочення: МДА – малоновий диальдегід, ДК – дієнові кон'югати, СОД – супероксиддисмутаза, ЗАА – загальна антиоксидантна активність, ПБ – перекисноокислені білки, ІХС – ішемічна хвороба серця.

ІХС супроводжується окисним стресом та накопиченням продуктів перекисного окислення поліненасичених жирних кислот – малоновий диальдегід (МДА), дієнові кон'югати (ДК) та ін., а також зміною активності антиоксидантної системи. Детоксикація активних форм кисню в клітинах забезпечується як ферментативними, так і неферментативними системами, що складають антиоксидантну систему захисту. Антиоксиданти знижують рівень вільних радикалів за рахунок пригнічення активності або експресії ферментів, що генерують вільні радикали, або сприяючи активності та експресії ферментів антиоксидантної системи: СОД, каталаза, глутатіонпероксидаза, глутатіон регенеруючий фермент та ін.

Усі досліджувані препарати (LS форми кверцетину, куркуміну та комплексний препарат) продемонстрували виражені антиоксидантні та кардіопротекторні властивості, проте, у більшості випадків введення LS препаратів, які містять лише один антиоксидант (кверцетин або куркумін), не дозволило нормалізувати рівні досліджуваних маркерів окисного стресу (МДА, ДК, СОД, каталаза

та ін.) до рівня інтактного контролю. Підвищити ефективність лікування вдалося за допомогою комплексного препарату, який містить обидва антиоксиданти. Крім того, монопрепарати по різному впливають на різні ланки антиоксидантної системи. Наприклад, при введенні щурам з ІХС монопрепаратів LS кверцетин був більш ефективним відносно рівня МДА, ДК, перекисноокислених білків, а LS куркумін – відносно рівня SH-груп. Хоча у групі кожного із монопрепаратів рівень оксидативного стресу достовірно знижувався порівняно із щурами з ІХС, але рівня інтактного контролю досягти не вдалося. Однак введення комплексного препарату в тій самій дозі (10 мг/кг за АФІ) дозволило привести більшість показників у норму. Таким чином, показано, що антиоксидантна активність залежить як від дози використовуваних антиоксидантів, так і від їх взаємного впливу (синергізму).

Необхідно відмітити, що запропонований комплексний препарат містить антиоксиданти поліфенольної природи – куркумін та кверцетин, які інкапсульовані до LS оболонки, де носієм є РС, який виступає не тільки носієм АФІ, але й сам має відомі мембранопротекторні властивості. Дія РС як мембранопротектору продемонстрована для відновлення мембран серцевого м'язу, легень, периферійних нервів та ін. На сьогоднішній день відомий комерційний препарат «Ліпін[®]», який являє собою «порожні» LS на основі ЕРС, використання якого приводить до стабілізації мембран кардіоміоцитів та зменшення структурних ушкоджень клітинних мембран. Використання фосфоліпідів як основних компонентів ліпідного бішару для відновлення порушеної бар'єрної функції мембран та стабілізації мембранних білків є цілком обґрунтованим. У роботах останніх років показано, що LS з РС мають антиоксидантну, антигіпоксичну дію і сприяють підтримці енергетичного метаболізму тканин, що знаходяться у стані гіпоксії. В умовах експериментального гострого інфаркту міокарда при застосуванні «Ліпину[®]» відзначали стабілізацію мембран кардіоміоцитів, зменшення структурних пошкоджень внутрішньоклітинних органел і контрактурних скорочень міофібрил. Застосування препарату сприяло зменшенню зони некрозу і частоти розвитку порушень ритму.

3.3. Характеристика фізико-хімічних властивостей ліпосом

Вибір методів контролю якості LS форм є невід'ємним етапом фармацевтичної розробки. Вимоги до LS препаратів регламентовані у таких нормативних документах, як ДФУ, Фармакопея Сполучених Штатів, вимоги FDA та ін. У

таблиці 3.2 наведено специфікацію на готовий продукт на прикладі комплексного LS препарату кверцетину та куркуміну згідно вимог ДФУ до лікарських препаратів для парентерального застосування та включає наступні показники: опис, ідентифікація, час утворення емульсії, рН, сторонні домішки, втрата за масою при висушуванні, однорідність дозування, механічні включення, стерильність, аномальна токсичність, пірогенність, кількісне визначення АФІ та фосфоліпідів. Крім цього, для LS форм використовують специфічні показники якості: склад фосфоліпідів та продукти їх деградації, розмір частинок, ступінь включення, залишкові органічні розчинники.

Таблиця 3.2 – Специфікація на комплексну LS композицію гідрофобних антиоксидантів на основі кверцетину та куркуміну (ліофілізат для приготування розчину для інфузій, 15 мг у флаконі)

Показник	Вимоги нормативної документації	Метод
Опис	Аморфна маса жовтого кольору із характерним запахом	Візуально
Ідентифікація	<p><u>Ідентифікація куркуміну:</u> метод ТШХ: у системі хлороформ : метанол (98 : 2) на хроматограмі розділяються три плями жовтого кольору; фактор утримування, розмір та забарвлення плям на хроматограмах випробуваного та стандартного зразків мають співпадати;</p> <p>- УФ-спектр випробуваного розчину у діапазоні 200–450 нм повинен мати максимум при 420±5 нм.</p> <p><u>Ідентифікація кверцетину:</u> - УФ-спектр випробуваного розчину у діапазоні 210–450 нм має максимуми поглинання при довжинах хвиль 255±2 нм і 375±2 нм;</p> <p><u>Ідентифікація фосфоліпідів:</u> метод ТШХ: у системі хлороформ : метанол : вода (65 : 25 : 4) фактор утримування, розмір та забарвлення плям на хроматограмах випробуваного та стандартного зразків мають співпадати зі стандартними зразками РС і DPPG.</p>	ТШХ ДФУ 2.2.27; СФМ ДФУ 2.2.25

Показник	Вимоги нормативної документації	Метод
Час утворення та стійкість емульсії	Час утворення не більше 3 хв, має бути стійкою не менше 10 хв	Візуально
pH	Від 6,5 до 7,5	ДФУ 2.2.3
Розмір частинок	Середній діаметр LS має становити не більше 300 нм	Динамічне світлорозсіювання
Сторонні домішки	Сума домішок ліпідів: має становити не більше 5%: лізоРС – не більше 3%, вільні жирні кислоти – не більше 2%.	ТШХ ДФУ 2.2.27; ВЕРХ ДФУ 2.2.29
Механічні включення	Не більше 3000 частинок розміром ≥ 10 мкм у флаконі; не більше 300 частинок розміром ≥ 25 мкм у флаконі	ДФУ 2.9.19
Залишкові органічні розчинники	Етанол – ≤ 1000 ppm (0,1 %), хлороформ – ≤ 500 ppm (0,05 %)	ДФУ 2.2.24
Вода	Не більше 5%	ДФУ 2.2.32
Однорідність маси одного флакону	$18/20 \leq \pm 10\%$; $0/20 \geq \pm 20\%$	ДФУ 2.9.5
Стерильність	Має бути стерильним	ДФУ 2.6.1
Пірогенність	Має бути апірогенним	ДФУ 2.6.8
Аномальна токсичність	Має бути не токсичним	ДФУ 2.6.9
Кількісне визначення	Куркумін – від 6,75 до 8,25 мг у флаконі; Кверцетин – від 6,75 до 8,25 мг у флаконі; Фосфоліпіди – від 554,4 до 677,6 мг у флаконі; РС – від 504 до 616 мг у флаконі; DPPG – від 50,4 до 61,6 мг у флаконі	ВЕРХ ДФУ 2.2.29; СФМ ДФУ 2.2.25

Розмір частинок є важливим показником, специфічним для LS форм. Для його контролю зазвичай використовують такі методи: мікроскопія, лазерна дифракція та динамічне світлорозсіювання.

Електронна мікроскопія – найбільш точний метод визначення розміру частинок, що дозволяє розглянути кожну LS та отримати точну інформацію про профілі розподілу за розміром та формами LS. У разі, коли розмір частинок менше ніж 2 мкм, необхідно використовувати скануючу або трансмісійну електронну спектроскопію. Однак визначення цим методом – трудомісткий та не завжди доступний процес. Більш простим та доступним методом на даний час вважається метод лазерної дифракції або метод динамічного світлорозсіювання.

Метод лазерної дифракції заснований на аналізі діаграми розсіювання, яка формується при освітленні частинок монохроматичним світлом. Використовуючи цей метод можна виміряти розмір частинок в області від 3 нм до 3 мкм. Це досить швидкий та ефективний метод, який використовується для визначення розміру LS.

Метод динамічного світлорозсіювання також заснований на аналізі діаграми розсіювання. Використовуючи цей метод можна виміряти розмір частинок в області від 10 нм до 500 мкм. Це досить швидкий та ефективний метод, який використовується для визначення розміру LS.

Підсумок. Проведений аналіз даних, отриманих при розробці LS лікарських препаратів, дозволяє говорити про те, що фармацевтична розробка зазначеної форми лікарських препаратів вимагає проведення різнопланових експериментальних робіт: визначення оптимального співвідношення фосфоліпідних компонентів ліпідної мембрани та їх концентрації, заряду фосфоліпідів та їх жирнокислотного складу; вивчення виду кріопротектора і його вміст у препараті; величини рН, йонної сили буферної системи і т.д. Самостійним питанням є визначення необхідності включення Chol в мембрану LS, з огляду на його роль у підвищенні жорсткості ліпідної структури, що може призводити до появи гетерогенності розміру часток як при отриманні LS, так і в процесі ліофілізації. Крім того присутність Chol може знижувати ефективність стерилізуючої фільтрації. Склад ліпідної мембрани LS визначається також структурою АФІ і його вмістом у препараті. Конструювання LS лікарського засобу вимагає експериментального визначення режимів сублімації препарату, способу утворення наночастинок і технологічних способів завантаження АФІ в LS. Наведено специфікацію на комплексний LS препарат гідрофобних антиоксидантів, розроблений згідно вимог національних та міжнародних нормативних документів до LS лікарських форм. Невід’ємною частиною фармацевтичної розробки є вивчення токсичності та специфічної фармакологічної активності LS форм. Ефективність

комплексного препарату підтверджується при вивченні синергітичної дії компонентів комплексного препарату у модельних експериментах на тваринах у порівнянні з монопрепаратами.

Контрольні запитання

1. Якими перевагами ліпосомальних форм обумовлений інтерес до них сучасної формації? Наведіть приклади ліпосомальних препаратів, зареєстрованих в Україні.

2. Які компоненти входять до складу ліпосомальних препаратів? Яка їх функція?

3. Яким чином структура фосфоліпідів визначає їхні функції у складі ліпосомальної мембрани? Наведіть приклади фосфоліпідів, які використовують у складі ліпосомальних форм.

4. Які вимоги висувають до мембраноутворюючих фосфоліпідів?

5. Які технологічні підходи використовують для запобігання процесів перекисного окислення ліпідів ліпосомальних форм?

6. Як холестерин впливає на фізико-хімічні властивості ліпосомальної мембрани? Наведіть приклади використання холестерину у складі ліпосомальних препаратів?

7. Яку функцію виконують кріопротектори? Які вимоги висуваються до кріопротекторів?

8. Яким чином регулюють рН ліпосомальних препаратів?

9. У чому перевага комплексних ліпосомальних препаратів? Наведіть приклад.

10. Опишіть принцип одержання комплексного ліпосомального препарату, що містить два гідрофобні активні фармацевтичні інгредієнти?

11. Чи можна розглядати фосфатидилхолін не тільки як носій, але і як лікарську речовину? Обґрунтуйте свою думку?

12. Які параметри необхідно контролювати у ліпосомальних препаратах?

Список джерел інформації

1. Швець В. И. Липосомальные формы лекарственных препаратов: технологические особенности получения и применение в клинике / В. И. Швець, Ю. М. Краснопольский, Г. М. Сорокоумова. – М. : Ремедиум, 2016 – 200 с.

2. Technologies and perspectives of liposomal drug application in clinical practice / Y. M. Krasnopolskii, A. S. Grigor'eva, A. G. Katsai et al. // *Nanotechnology in Russia*. – 2017. – V. 12, № 7–8. – P. 461–470.
3. Bulbake U. Liposomal formulations in clinical use: an updated review / U. Bulbake, S. Doppalapudi, N. Kommineni, W. Khan // *Pharmaceutics*. – 2017. – V. 9, № 2. – 12 p.
4. Allen T. M. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical application / T. M. Allen, P. R. Cullis // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2013. – V. 65, № 1. – P. 36–48.
5. Стадниченко А. В. Липосомальные противоопухолевые препараты / А. В. Стадниченко, А. С. Дудниченко, Ю. М. Краснопольский. – Харьков : «Мадрид», 2018. – 256 с.
6. The Concept “Quality by Design” in development of liposomal cytostatics / A. V. Stadnichenko, Yu. M. Krasnopolsky, T. G. Yarnykh et al. // *Research Journal of Pharmacy and Technology*. – 2020. – V. 13, № 2. – P. 674–678.
7. Katsai O. G. Preparation and in-vivo evaluation of cytochrome C-containing liposomes / O. G. Katsai, O. A. Ruban, Y. M. Krasnopolskyi // *Pharmazie*. – 2017. – V. 72, № 12. – P. 736–740.
8. Katsai O. “Quality-by-Design” approach to the development of a dosage form the liposomal delivery system of cytochrome C / O. Katsai, O. Ruban, Y. Krasnopolskyi // *Pharmakeftiki*. – 2018. – V. 30, № 1. – P. 76–87.
9. Shakhmaiev A. E. Preparation and cardioprotective effect analysis of liposomal coenzyme Q10 / A. E. Shakhmaiev, T. V. Gorbach, L. A. Bobritskaya, Yu. M. Krasnopolsky // *The Pharma Innovation Journal*. – 2015. – V. 4, № 9. – P. 22–26.
10. A Study of oxidative stress markers when using the liposomal antioxidant complex / D. M. Pylypenko, T. V. Gorbach, O. G. Katsai et al. // *Pharmakeftiki*. – 2019. – V. 31, № 1. – P. 40–47.
11. Krasnopolsky Y. M. Experimental study of liposomal docetaxel incorporation and stability / Y. M. Krasnopolsky, A. S. Dudnichenko // *Experimental oncology*. – 2017. – V. 39, № 2. – P. 121–123.
12. Актуальные проблемы биотехнологии и биоинженерии / под ред. А. Н. Огурцова. – Харьков : «Типография Мадрид», 2019. – 240 с.
13. Krasnopolsky Yu. M. “Quality By Design” in liposomal drugs creation / Yu. M. Krasnopolsky, D. M. Pylypenko // *Biotechnologia ACTA*. – 2020. – V. 13, No 6. – P. 5–12.

14. Пилипенко Д. М. Розробка складу та технології ліпосомальної комплексної композиції гідрофобних антиоксидантів мембранопротекторної дії [Електронний ресурс] : дис. ... д-ра філософії : спец. 162 : галузь знань 16 / Д. М. Пилипенко. – Харків : Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», МОН України, 2021. – 228 с.

15. Стадніченко О. В. Наукове обґрунтування та розробка ліпосомальних протипухлинних лікарських засобів на основі іринотекану і оксаліплатину [Електронний ресурс] : дис. ... д-ра фарм.наук : спец. 15.00.01 – технологія ліків, організація фармацевтичної справи та судова фармація / О. В. Стадніченко. – Харків : Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, 2019. – 360 с.

16. Степанов А. Е. Физиологически активные липиды / А. Е. Степанов, Ю. М. Краснопольский, В. И. Швец. – М. : Наука, 1991. – 136 с.

17. Швец В. И. Фосфолипиды в биотехнологиях / В. И. Швец // Вестник МИТХТ. – 2009. – Т. 4, № 4. – С. 4–25.

18. Aktas M. Membrane lipids in *Agrobacterium tumefaciens*: biosynthetic pathways and importance for pathogenesis : [Електронний ресурс] / M. Aktas, L. Danne, P. Möller, F. Narberhaus // *Frontiers in plant science*. – 2014. – Vol. 5, No. 109. – Режим доступу : <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00109>

19. Pylypenko D. Nanobiotechnological obtaininig of liposomal forms of antioxidant preparations based on bioflavonoide / D. Pylypenko, V. Prochorov, O. Dudnichenko, Y. Krasnopolsky // *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. – 2019. –V. 6, № 22. – P. 11–15.

20. Шахмаєв А. Е. Розробка технології одержання ліпосомальної шн акційної форми убідекаренону, що має кардіопротекторну дію : дис. ... канд. фарм. н. / А. Е. Шахмаєв. – Харків : Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», МОН України, Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, 2017. – 225 с.

21. Кацай О. Г. Розробка технології отримання ліпосомальної форми цитохрому С для лікування офтальмологічних захворювань : дис. ... д-ра філософії : спец. 226 «Фармація» / О. Г. Кацай – Харків : Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, 2020. – 217 с.

22. Pylypenko D. Study of antioxidant activity of liposomal forms of quercetin and curcumin in ischemic heart disease / D. Pylypenko, T. Gorbach, Yu. Krasnopolsky // *BioTechnologia*. – 2020. – V. 101(4). – P. 273-282.

23. Павлова Е.А Влияние антиоксидантной терапии на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты при ишемической болезни сердца / Е.А Павлова // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2017. – Т. 1, № 47. – С. 154–157

24. Middleton E. Jr. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer / E. Jr. Middleton, C. Kandaswami, T. C. Theoharides // Pharmacological Review. – 2000. – V. 52, № 4. – P. 673-751.

25. Lü J. M. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems / J. M. Lü, P. H. Lin, Q. Yao, C. Chen // Journal of Cellular and Molecular Medicine. – 2010. – V. 14, № 4. – P. 840-60.

26. The influence of separate and combined supplementation with curcumin and quercetin on the protective capacity in rats / A. S. Balakina, I. V. Aksenov, N. V. Trusov et al. // Voprosy pitaniia. – 2017. – V. 86, № 2. – P. 1–22.

27. Liu Y. Protective effects of curcumin and quercetin during benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in mice / Y. Liu, Y.-M. Wu, P.-Y. Zhang // European Review for Medical and Pharmacological Sciences. – 2015. – V. 19, № 9. – P. 1736–1743.

28. Ravichandiran V. Quercetin-decorated curcumin liposome design for cancer therapy: in-vitro and in-vivo studies / V Ravichandiran., K. Masilamani, B. Senthilnathan et al. // Current Drug Delivery. – 2017. – V. 14, № 8. – P. 1053–1059.

29. Sadeghi Ghadi Z. Preparation, characterization and in vivo evaluation of novel hyaluronan containing niosomes tailored by Box-Behnken design to co-encapsulate curcumin and quercetin / Z. Sadeghi Ghadi, R. Dinarvand, N. Asemi et al. // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2019. – V. 130. –P. 234–246.

30. Chaves M. A. Structural Characterization of multilamellar liposomes coencapsulating curcumin and vitamin D3 / M. A. Chaves., P. L. O. Filho, C. G. Jange et al. // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2018. – Vol. 549. – P. 112–121.

31. Chen W. Co-encapsulation of EGCG and quercetin in liposomes for antioxidant activity / W. Chen, M. Zou, X. Ma et al. Food Science. 2019. Vol. 84, № 1. P. 111–120.

32. Esteban E. G. A comparative study of stabilising effect and antioxidant activity of different antioxidants on levodopa-loaded liposomes / E. G. Esteban, M. J. Cozar-Bernal, A. M. Rabasco-Alvarez, M. L. Gonzalez-Rodríguez // Journal of Microencapsulation. – 2018. – Vol. 35, № 4. – P. 357–371.

ГЛАВА 4. БІОТЕХНОЛОГІЯ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ

4.1. Характеристика пробіотиків людини

Кишковий мікробіоценоз – складна екосистема. Пробіотики відновлюють пристінне травлення та колонізаційну резистентність. У кишечнику людини, ссавців та птахів мешкає понад 500 видів мікроорганізмів, які виконують різні функції. Відомо, що мікробіома людини налічує 500–700 видів мікроорганізмів загальною масою близько 1 кг, при цьому співвідношення бактеріального геному до геному людини становить 150. За чисельністю та фізіологічною значимістю переважають біфідо- та лактобактерії.

Лактобактерії – аеротолерантні аероби, *біфідобактерії* – облигатні анаероби. У нормі вони заселяють шар, що прилягає до клітин ворсинок нижніх відділів тонкого та товстого кишечника. Постійно перебуваючи там, вони беруть участь у примембранному травленні, створюють колонізаційну резистентність, закріплюючись на поверхні слизової оболонки, перешкоджають її заселенню патогенною та умовно-патогенною мікрофлорою. У жінок лактобацили та біфідобактерії також колонізують нижні відділи генітального тракту, причому у жінок репродуктивного віку біфідобактерії виявляються порівняно рідко (у 10–15 % випадків), і основний нормобіоценоз представлений асоціацією представників *Lactobacillus* із сапрофітними стрептококами, каталазопродукуючими корінобактеріями та стафілококами.

Як приклад розглянемо штам *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis BB12*, який на сьогоднішній день є одним з найбільш вивчених пробіотичних штамів. Ця бактерія є грампозитивною, анаеробною паличкою. У 2010-му році геном штаму BB12 був повністю секвенований. З 1985-го року штам BB12 пройшов вивчення у 130 клінічних дослідженнях починаючи від недоношених дітей та закінчуючи літніми пацієнтами. На сьогоднішній день BB12 є найбільш вивченою, ефективною та безпечною біфідобактерією і їй надано статус безпечного штаму на рівні виду (FDA). Виявлено багато корисних якостей BB12. Ці бактерії добре переносять дію кислотного середовища шлунка, а також жовчних кис-

лі та солей, можуть ефективно закріплюватися на слизовій оболонці кишечника після перенесених кишкових інфекцій, причому як вірусних, так і бактеріальних. Застосування ВВ12 знижує не тільки тривалість гострої діареї, але й її розвиток, частоту респіраторних інфекцій у дітей, збільшує швидкість регенерації слизової оболонки кишечника, впливає на синтез антитіл до патогенних властивостей мікроорганізмів, активізує фагоцитоз, синтез лізоциму, інтерферонів. Висока ефективність штаму *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis BB12* дала основу для створення препарату «Лінекс-Бєбі[®]».

Штами пробіотиків знайдені у ротовій порожнині людини, різних відділах кишечника, грудному молоці, у нижніх відділах генітального тракту у жінок. У ротовій порожнині знаходяться пробіотичні штами *Streptococcus salivarius K12*, що відноситься до здорової мікрофлори порожнини рота та носоглотки – ефективно колізує порожнину рота та носоглотки. Антагонізм даної бактерії пов'язаний із синтезом антибактеріальних бактерицинів: саліваріцин А та саліваріцин В. Використання препарату «Vactoblis[®]» (Швеція) дозволяє відновити мікрофлору ротової порожнини.

Для відновлення мікрофлори ротової порожнини та носоглотки запропоновано препарат «BioGaia[®]» (Швеція), який містить 2 штами: *Lactobacillus reuteri 17938* та *Lactobacillus reuteri ATCC PTA5289*. Ці бактерії антогоністично витісняють збудників карієсу, періодонтиту, гінгівіту. Аналізуючи присутність пробіотичних бактерій в організмі людини, можна припустити, що різноманітність штамів та їх колонізація в різних відділах шлунково-кишкового тракту пов'язана з навколишніми умовами. Мікробний склад змінюється від переважно аеробних бактерій у роті (рН – 7,0; рО₂ – близьке до атмосферного) до мікроаерофільних бактерій у шлунку (рН – 1,0–4,0; рО₂ – 77 мм.рт.ст.); у тонкому кишечнику рН стає більш лужним (рН – 5,0–5,5; рО₂ – зменшується ще більше до 33 мм.рт.ст.) – у цьому відділі ростуть факультативні анаеробні бактерії. У товстій та прямій кишці рН збільшується до значень більше 7,0, а рівень кисню падає нижче 33 і 1 мм рт.ст., відповідно.

На кафедрі біотехнології, біофізики та аналітичної хімії НТУ «ХПІ» у 2012–2017 роках проведено роботи зі створення комплексного пробіотичного препарату, що містить біфідобактерії та лактобацили. Для забезпечення можливості спільного росту культивування проводили з використанням регуляції розчиненого кисню у поживному середовищі та коригування рН у процесі росту.

Оскільки мікробіома кишечника людини містить кілька штамів мікроаерофільних та анаеробних бактерій, дуже важливою є наявність усіх цих типів

штамів при розробці пробіотиків для біотерапевтичних цілей. Однак, оскільки ці штами потребують дуже різних поживних речовин, рН, рівней кисню, їх не можна вирощувати в одному біореакторі. Штами зазвичай вирощують в окремих біореакторах, виділяють, ліофілізують, а потім змішують у сухому вигляді, що призводить до підвищення ціни продукту. Крім того, можливе контамінування при змішуванні різних штамів та їх подальшій упаковці. Проте з точки зору хімічної інженерії кишечник можна розглядати як розділений на відсіки біореактор. Ряд авторів вважає, що такий принцип культивування пробіотичних штамів дозволяє спроектувати біореактор із різними відсіками, взаємопов'язаними як у кишечнику людини. Конструкцію реактора можна використовувати для регулювання рН і кисню, складу поживного середовища у реакторі, щоб вони відповідали умовам кишечника людини. При створенні такого реактора та досягненні можливості контролю зазначених показників біореактор можна засіяти різними аеробними та анаеробними кишковими бактеріями з біотерапевтичним потенціалом.

Важливим етапом виробництва пробіотичних препаратів є інкапсуляція бактерій. Інкапсуляція пробіотиків визнана ефективним способом їх стабілізації у висушеній формі. Створюючи фізичний бар'єр для захисту від несприятливих умов, інкапсуляція прямо впливає на стабільність, доставку та функціональність. Встановлено, що сам метод інкапсуляції впливає на морфологію поверхні, життєздатність та виживання бактерій.

Пробіотики є непатогенними мікроорганізмами, які використовують для підтримки та покращення балансу кишкових мікробів та захисту господаря від інфекційних агентів. *Пробіотичні штами мікроорганізмів виконують кілька функцій в організмі, основні з яких:*

- 1) підтримка епітеліального бар'єру кишечника;
- 2) модулювання вродженого та набутого імунітету;
- 3) інгібування росту патогенів за рахунок виробництва бактеріоцинів, гідроген пероксиду та інших протимікробних агентів.

Корисні властивості пробіотиків загально визнані. До них належать: метаболізм лактози, покращення травлення, синтез вітамінів, виробництво антимікробних факторів, антимікотичні ефекти, антиканцерогенна дія, посилення імунної відповіді організму людини, зниження рівня холестерину та ін.

4.2. Біотехнологія рекомбінантних пробіотичних штамів

Одним із завдань біотехнології та біоінженерії є розробка нових імунобіологічних препаратів як на основі природних штамів, так і створення рекомбінантних пробіотиків. За останні 20 років були створені різні рекомбінантні пробіотики для доставки через слизові оболонки терапевтичних і профілактичних молекул, включаючи ДНК, пептиди, цитокіни, ферменти та ряд інших.

Основними перевагами пробіотичних бактерій як системи доставки є:

- ✓ їх здатність колонізувати поверхню слизової оболонки шлунково-кишкового тракту (ШКТ) людини;
- ✓ толерантність до кислого середовища шлунка і солей жовчних кислот, що забезпечує виживання і проходження через ШКТ;
- ✓ стійка колонізація та тривалий захист від збудників захворювань кишечника людини.

Крім того, пероральні рекомбінантні пробіотики мають ряд переваг:

- безпосередня доставка активної молекули до поверхні слизової оболонки без необхідності біорозділення активних молекул;
- збільшення терміну зберігання та стабільності продукту;
- низькі витрати на доставку;
- простота трансферу технології продукту після його розробки.

Штами пробіотиків стикаються зі стресом під час виробництва, зберігання та проходження через ШКТ, а саме: з температурою, кислим та сольовим середовищем, різною аерацією та водним балансом в окремих відділах ШКТ. Наприклад, для покращення стресостійкості пробіотичних штамів ген-транспортер бетаїну (*betL*) з *Listeria Monocytogenes* був клонований в *Lactobacillus salivarius* під контролем промотора, що індукується низином. Таким чином, накопичення бетаїну в рекомбінантній *Lactobacillus salivarius* дозволило йому бути осмо толерантним і витримувати концентрацію хлористого натрію 7 %, а також бути кріотолерантним. Так само клонування гена синтезу трегалози (*astAB*) з *E. coli* в *Lactococcus lactis* захищає рекомбінантні бактерії при ліофілізації, токсичності компонентів жовчі та забезпечує стійкість до кислого середовища шлунка. Крім того, клонування *betL* у *Bifidobacterium breve* сприяло його виживанню у шлунковому соку, що покращило терапевтичні властивості продукту. *Lactobacillus casei*, створений для експресії людського лактоферину, проявляє антимикробну активність у шлунково-кишковому тракті проти кишечних патогенів як *in vitro*, так і *in vivo*. Цей рекомбінантний штам

захищає тканини від пошкодження, спричиненого патогенами. Були розроблені пробіотичні штами для доставки вакцин на поверхню слизової оболонки. Перша рекомбінантна пробіотична вакцина була розроблена шляхом експресії фрагмента С правцевого токсину в *Lactococcus lactis*, що експресує білок інтерналіну А з *Listeria monocytogenes* (інтерналін А – фактор патогенності *Listeria monocytogenes*), що дозволило цьому неінвазивному пробіотику потрапити у тонкий кишечник і доставити імуностимулюючу молекулу всередину епітеліальних клітин.

Таким чином, перспективним напрямком біотехнологічних досліджень є створення рекомбінантних препаратів на основі пробіотиків. Після того як було встановлено, що ряд бактерій здатні проявляти пробіотичні властивості і позитивно впливати на здоров'я людини, розпочалося використання технології рекомбінантних ДНК з метою отримання генетично змінених штамів і створення пробіотичних або виробничих культур із заданими унікальними властивостями.

Безсумнівний інтерес представляє один з перших рекомбінантних пробіотиків, розроблених фахівцями Київського НДІ мікробіології та вірусології НАН України та Російського НДКТИ біологічно активних речовин «Вектор» – «Субалін[®]». «Субалін[®]» являє собою мікробну масу живих антагоністично активних бактерій *Bacillus subtilis* 2335(105). У штамі *B. subtilis* 2335(105) методом генної інженерії введена плазмідна ДНК з геном лейкоцитів людини, відповідальним за синтез α -2-інтерферону. Запропонований препарат, крім високої антагоністичної активності по відношенню до патогенних і умовно-патогенних бактерій, проявляв антивірусну активність завдяки введенню генетичної інформації, яка кодує продукцію антивірусної субстанції – α -2-інтерферону. З цією метою були відібрані кілька штамів *B. subtilis*. Трансформацію відібраних бактеріальних культур проводили плазмідами рВМВ, які кодують синтез секреторного (рВМВ 105) та внутрішньоклітинного (рВМВ 104) інтерферону. Зазначені плазмідні містять ген інтерферону у вигляді хімічно-синтезованого аналога гена людського лейкоцитарного α -2-інтерферону. У структурі плазміди рВМВ 105 ген інтерферону зв'язаний з «геном» сигнального пептиду – гомологічної послідовності гена альфа-амілази, який забезпечує ефективну секрецію з клітин гетерологічного білка. Плазмідна рВМВ 104 не має у своїй структурі такої послідовності нуклеотидів у зв'язку з чим білок, який продукується, залишається всередині клітини. При вивченні стабільності плазмід у різних штамів бацил встановлено, що максимальною стабільністю характеризується плазмідна рВМВ 105 у штамі *B. subtilis*. Навіть через 10 пасажів спостерігалось 100 % збереження

плазміди. На різних експериментальних інфекціях тварин досліджено і підтверджено ефективність і безпечність препарату «Субалін[®]» при пероральному введенні. α -2-інтерферон людини був виявлений у всіх тестованих органах лабораторних тварин. Максимальна кількість інтерферону зареєстрована у печінці, легенях та кишечнику. Цікавими є дані про вплив «Субаліну[®]» на імунну відповідь при вакцинації. Встановлено, що навіть одноразове пероральне введення препаратів перед вакцинацією обумовлює триваліший і вищий рівень специфічної імунної відповіді на дифтерійний та правцевий антигени вакцини АКДП (адсорбована кашлюково-дифтерійно-правцева вакцина).

Плазмідні вектори використовують для створення рекомбінантних штамів біфідобактерій. Наприклад, в Японії проведені дослідження з використання модифікованих генно-інженерними методами штамів біфідобактерій для терапії онкологічних захворювань. Підставою для цього є той факт, що штами біфідобактерій після системного введення здатні селективно локалізуватися і швидко проліферувати в межах солідних пухлин. Використовуючи анаеробні та непатогенні бактерії *Bifidobacterium longum* в експериментах, вдалося доставити у пухлину визначені терапевтичні гетерологічні гени, у тому числі компоненти системи «проліки-фермент-ліки». З цією метою була сконструйована плазміда pBLES100-S-eCD, що включає ген цитозиндезамінази.

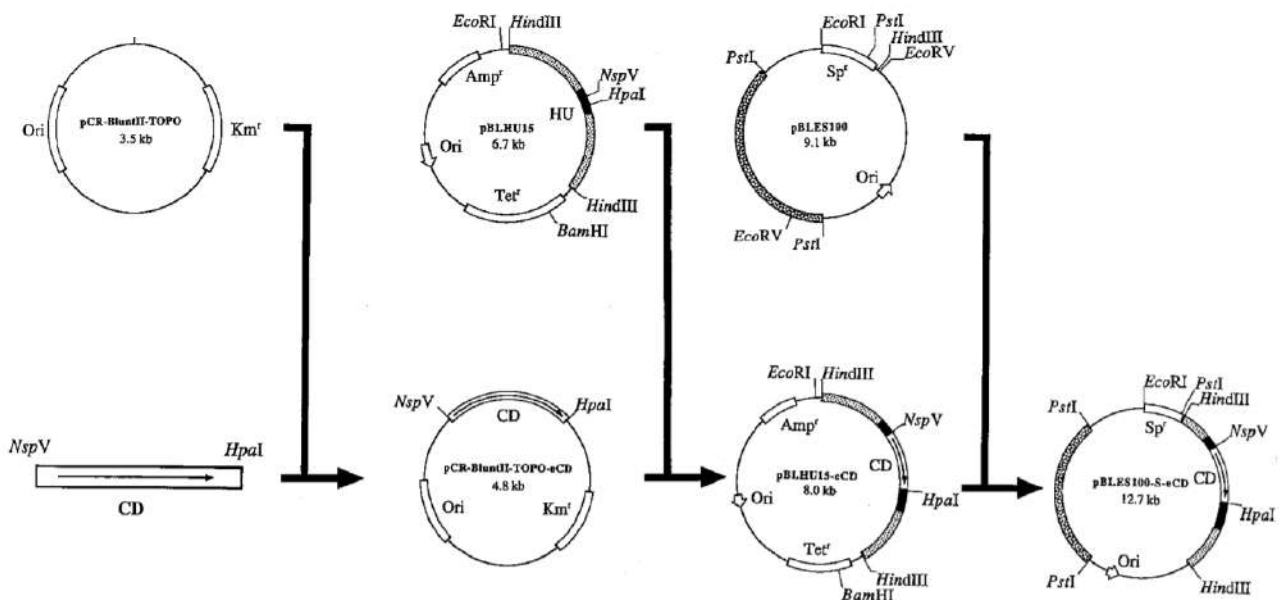


Рисунок 4.1 – Конструювання плазміди pBLES100-S-eCD: 1) ампліфікований ген цитозин дезамінази (CD) був клонований у pCR-BluntII-TOPO з утворенням pCR-BluntII-TOPO-eCD; 2) pCR-BluntII-TOPO-eCD розщепили рестриктазами HpaI і NspV. Фрагмент, що містить ген CD, було вбудовано в pBLHU15 з утворенням pBLHU15-

eCD; 3) pBLHU15-eCD розщепили рестриклазою HindIII, а фрагмент HindIII- HindIII зшили з pBLES100 з утворенням pBLES100-S-eCD [Nakamura et al., 2002]. *Скорочення*: Ori – сайт початку реплікації; Km^r – ген стійкості до канаміцину; Amp^r – ген стійкості до ампіциліну; Tet^r – ген стійкості до тетрацикліну; Sp^r – ген стійкості до стрептоміцину.

Трансформовані цією плазмідною *B. longum* були здатні продукувати цитозин дезаміназу в гіпоксичних пухлинах, що приводило до локальної конверсії системно вводимого нетоксичного 5-фторцитозину в токсичну для тканин сполуку – 5-фторурацил. Протипухлинний ефект від застосування цього продукту був продемонстрований на моделі пухлини молочних залоз щурів при введенні трансформованих *B. longum* безпосередньо в область пухлини або внутрішньовенно. При цьому анаеробна *B. longum* накопичується в гіпоксичних солідних пухлинах (анаеробне середовище пухлини). В даний час проходить випробування протипухлинний препарат рекомбінантних біфідобактерій, які продукують цитозиндезаміназу, під кодовою назвою APS001, що селективно накопичується в гіпоксичному середовищі пухлини.

В Японії фірмою Snow Brand Milk Products на основі двох штамів біфідобактерій *B. longum* M 205 (виділений з тканини людини і активно знижує рівень холестерину в крові) і *Bifidobacterium pseudolongum* BT290 (виділений з тканин тварин, стійкий до кисню та кислотного середовища) створено новий рекомбінантний штам біфідобактерій, який виробник планує використовувати для профілактики та лікування атеросклерозу та пов'язаних з ним захворювань серцево-судинної системи людини.

У роботах біотехнологів з Китаю для проведення терапії пухлин у *B. longum* була вбудована плазміда pBV22210 для доставки за допомогою вектора ендостатину. Зазначені плазмідні у *B. longum* показали сильну інгібуючу дію на зростання перевитої пухлини у печінці щурів. Отриманими результатами автори підтвердили, що плазмідні можуть бути досить стабільним вектором, причому наявність плазмід не впливає на біологічні характеристики *B. longum*. Проводиться скринінг плазмід, отриманих для біфідобактерій. Наприклад, плазміда pBC1 *Bifidobacterium catenulatum* L48 містить 2540 п.н. із вмістом G+C (64,0 %), а плазміда pMG1 *Bifidobacterium longum* – 3682 п.н. із вмістом G+C (65,1 %).

Слід зазначити, що фахівці, які займаються штамми пробіотиків, стурбовані проблемою, пов'язаною з можливою роллю молочно-кислих бактерій у поширенні генів стійкості до лікарських речовин. Так, R. Temmerman та спів-

авт. (2003) при вивченні 187 культур, виділених з різних йогуртів, що виробляються у 8-ми країнах Європейського союзу, виявлена стійкість до канаміцину у 79 % ізолятів, до ванкроміцину у 65 %, до тетрацикліну у 26 %, до пеніциліну у 23 %, до еритроміцину у 16 %, до хлорамфеніколу у 11 %. При цьому більшість культур (68,4 %) характеризувалася множинною стійкістю до антибіотиків. Крім того, у дослідях *in vitro* показана можливість передачі R-плазмід від диких культур *Lactobacillus sp.* різних видів грампозитивних бактерій. Продемонстровано передачу плазмиди рAM-b від *Lactobacillus reuteri* до *Enterococcus faecalis* у процесі виготовлення молочної продукції.

Розглядаються можливості створення рекомбінантних біфідобактерій-продуцентів ферментів: альфа-амілази та глутамат-дегідрогенази. Безперечний інтерес становлять роботи зі створення штаму *B. longum* – продуцента бактеріоцину з *Pediococcus spp.*, активного відносно *Listeria monocytogenes*. При отриманні зазначених рекомбінантних штамів пробіотиків найчастіше використовують реплікон, отриманий безпосередньо з біфідобактерій.

Створено рекомбінантний штам *Bacillus licheniformis* 2836/105 за допомогою трансформації вихідного штаму *Bacillus licheniformis* 2836 плазмідною рВМВ 105. Сконструйований штам здатний продукувати α -2-інтерферон людини в мікроаерофільних умовах і характеризується антагоністичною активністю відносно патогенної і умовно патогенної мікрофлори.

Шведські вчені розробили *систему пасивної імунотерапії*, в якій рекомбінантні лактобактерії експресують нейтралізуючі фрагменти варіабельного домену важких ланцюгів антитіл проти ротавірусів, що викликають діарею. Важкі ланцюги експресувалися *Lactobacillus paracasei* як у вільній формі, так і зв'язані з клітиною. Автори вказують на можливість використання рекомбінантних пробіотиків для боротьби з вірусною формою діареї.

Бактерії роду *Escherichia* сприяють гідролізу лактози, беруть участь у розщепленні білків та вуглеводів, у метаболізмі холестерину, жирних та жовчних кислот, синтезують вітаміни групи В, біотин, вітамін К, нікотинову та пантотенову кислоти, а також коліцини. Однак штам *E. coli* M17 має знижену антагоністичну активність через втрату здатності синтезувати коліцин В, а також чутливість до антибіотиків. Водночас цей штам використовується для виробництва колібактерину та біфіколу. Це привело до створення штаму *E. coli* M17/pColap, здатного синтезувати коліцин E1, що відповідає за підвищену антагоністичну активність і стійкість до ампіциліну.

Лікування хронічних запальних захворювань, таких як запальні захворювання кишечника, являє собою серйозну медичну проблему. Декілька дослідників продемонстрували вирішальну роль протеаз у підтримці хронічної запальної реакції ШКТ. Отже, інгібітори ендогенних протеаз можуть мати вирішальне значення для контролю запальних реакцій кишечника. Протягом багатьох років пропонувалося використання пробіотиків для лікування запальних захворювань кишечника. Стратегія дослідників рекомбінантних непатогенних пробіотиків як засобів доставки протизапальних молекул на рівні слизової оболонки використовувалася для доставки інтерлейкіну-10 (IL-10). Перша фаза клінічних випробувань продемонструвала, що пероральне введення штаму *Lactococcus lactis*, який експресує цитокін IL-10 було безпечним. Проте у пацієнтів із хворобою Крона прийом рекомбінантного *Lactococcus lactis* не давав суттєвого зниження активності захворювання. У зв'язку з цим авторами запропоновано використання рекомбінантних пробіотиків для доставки протизапальної молекули, такої як траппін-2, що забезпечує більшу ефективність та безпечність, ніж існуючі методи лікування (доставка антипротеазного траппіну-2 в кишечник). Дослідження захисного ефекту мутантних штамів були проведені на мишах з моделлю коліту.

Траппін-2 (попередник елафіну) – інгібітор протеази, який грає важливу роль як протизапальний медіатор на поверхні слизової оболонки. Крім того, траппін-2/елафін має антибактеріальну активність щодо грампозитивних і грамнегативних бактерій і грибів. Спочатку транслюється білок з молекулярною масою 12,3 кДа, що складається з 117 амінокислотних залишків, потім відбувається відділення сигнального пептида, що призводить до утворення зрілого білка (траппін-2/елафін) з молекулярною масою 9,9 кДа. Сигнальні пептиди – це короткі пептиди, що спрямовують знов синтезовані білки певним шляхом. Ці N-кінцеві сигнальні послідовності притаманні всім еукаріотам і прокаріотам. Сигнальні пептиди відіграють важливу роль у виробництві рекомбінантних білків. Вибір і модифікація сигнального пептиду – два основні методи оптимізації секреції рекомбінантного білка. Роль сигнального пептиду полягає в тому, щоб спрямовувати формуючий препротейн до каналу секреції, щоб підтримувати білок у незгорнутому компетентному Sec-залежному стані секреції і захистити транслоказу алостеричним чином.

Verypoll та співавт. (2014) запропонували метод клонування елафіну в рекомбінантних молочнокислих бактеріях: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*. Ген, що кодує елафін, ампліфікували за допомогою ПЛР з плазміди DK6-

elafin(14) із використанням таких праймерів: 5`-прямий елафін і 3`-зворотний елафін. Праймери були сконструйовані для видалення перших кодонів області елафіну, що кодують сигнальний пептид, і були замінені на сигнальний пептид білка Usp45, основного секретованого білка *Lactococcus lactis*. З цією метою продукт ПЛР розщеплювали, очищали та клонували у pSEC-векторі секреції *Lactococcus lactis*. Використовувані інструменти (реплікони, промотори, сигнальний білок) є функціональними у штаммах лактобацил, таких як *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*. Ці штами були обрані через свою здатність зберігатися у травному тракті до 4 діб, на відміну від *Lactococcus lactis*, що зберігається не більше 24–48 годин. Ефективність отриманих рекомбінантних штамів доведена на моделі індукованого коліту.

У матеріалах Американської Діабетичної Асоціації опубліковано матеріал, що підтверджує використання ангіотензину-(1-7), отриманого на рекомбінантних пробіотиках, для лікування діабету та його ускладнень. Численні дослідження на тваринах підтверджують позитивний вплив ангіотензину-(1-7) при діабеті і пов'язаних з ним ускладненнях, однак, найбільшою перешкодою для його клінічного застосування є відсутність великомасштабного виробництва ангіотензину-(1-7) з підвищеною біодоступністю в тканині. Ангіотензин-(1-7) експресується як секретований злитий білок з трансепітеліальним носієм у *Lactobacillus paracasei*, щоб забезпечити попадання до кровотоку та тканини-мішені. Дорослим діабетичним мишам щодня вводили через шлунковий зонд 1×10^9 КУО *L. paracasei*, який секретує ангіотензин-(1-7). Як контроль вводили нерекомбінантний штам *L. paracasei*. Обидва препарати вводили протягом 8 тижнів. Метаболізм глюкози оцінювали за допомогою стандартних методик та гістохімічних методів. Пероральне введення *L. paracasei*, який секретує ангіотензин-(1-7), значно знижувало рівень глюкози в крові тварин натще, покращувався тест на толерантність до глюкози при внутрішньовенному введенні у порівнянні з контрольною групою мишей. Миші, які отримували рекомбінантний штам *L. paracasei*, показали вищий рівень інсуліну в плазмі та експресію інсуліну в острівках β -клітин порівняно з контрольними тваринами. Застосування рекомбінантного *L. paracasei* значно знижувало апоптичну загибель клітин у нирках, покращувало викликані діабетом відкладення колагену в клубочках та каналцевому епітелії у мишей з діабетом. Лікування *L. paracasei*, який секретує ангіотензин-(1-7), також значно знижувало гліоз сітківки, запалення, загибель нейрональних клітин та втрату судинних капілярів сітківки. Пероральне введення рекомбінантних пробіотиків, що секретують ангіотензин-(1-7), по-

кращувало толерантність до глюкози за рахунок підвищення рівня інсуліну і зменшувало індуковане діабетом ушкодження нирок і сітківки.

Бактерії роду *Lactococcus* не є типовими представниками мікроорганізмів ШКТ людини, проте пробіотики на їх основі толерантні до дії компонентів жовчі і здатні пригнічувати розвиток хвороботворних ентерококів.

Перспективним є використання рекомбінантних штамів ентерококів, які можуть бути використані як живі вакцини, наприклад, пробіотичні штами, що містять плазміди та експресують поверхневі антигенні білки патогенних бактерій.

Таким чином, рекомбінантні бактерії на основі різних форм пробіотиків дозволяють розширити застосування цієї групи препаратів за рахунок створення протипухлинних лікувальних препаратів, включення в пробіотики векторів, що дозволяють створювати противірусні та антибактеріальні продукти, у тому числі і створення оральних вакцинних препаратів.

Пробіотики повною мірою можна віднести до розряду перспективних розробок препаратів майбутнього. Не викликаючи побічних ефектів і ускладнень, що є неминучим при застосуванні будь-яких хіміопрепаратів та антибіотиків, пробіотики мають високу терапевтичну активність і безпечність застосування.

Сьогодні можна з впевненістю говорити про те, що найближчим часом на світовому фармацевтичному ринку з'являться нові бактерійні препарати для лікування дисбактеріозів різної етіології, представлені пробіотиками, пребіотиками та комплексними препаратами-симбіотиками, що містять як пробіотичні, так і пребіотичні компоненти. Терапія пробіотиками є високофізіологічною, оскільки здійснює регулюючий вплив на симбіонтні відносини організма-господаря та його мікрофлори і зводить практично до мінімуму можливість побічних ефектів від лікування. Тому препарати, що діють на основі стимуляції росту кишкової мікрофлори організму-господаря, справедливо можна віднести до засобів нового покоління управління флорою товстої кишки.

Навіть простий перелік ефектів, до яких призводить застосування пробіотиків доводить виправданість їх використання у терапії:

- ✓ відновлення нормобіоценозу;
- ✓ продукція амінокислот, лізоциму, бактеріоцинів, протеаз, ліпаз, амілаз та інших біологічно активних сполук;
- ✓ активація макрофагів;
- ✓ посилення синтезу імуноглобулінів;

- ✓ індукція ендogenous інтерферону;
- ✓ висока антагоністична активність до умовно-патогенної та патогенної мікрофлори;
- ✓ активізація росту природної нормальної мікрофлори кишечника людини;
- ✓ виражена противиразкова дія;
- ✓ стимулювання імунної системи (протипухлинна та противірусна активність);
- ✓ підвищення всмоктування заліза, кальцію, вітаміну D та ін. сполук.

Бурхливий розвиток досліджень з розробки нових біопрепаратів та подальше вивчення механізму їх лікувально-профілактичної дії дає підстави стверджувати, що у XXI столітті пробіотики значною мірою можуть потіснити на ринку традиційні препарати. В даний час йде активний пошук нових систем експресії рекомбінантних генів у клітинах найрізноманітніших мікроорганізмів. Однак необхідно контролювати використання модифікованих організмів, щоб запобігти їх безперешкодному поширенню. Крім того, важливо враховувати їх біологічну безпечність та здатність викликати алергію при тривалому застосуванні.

Контрольні запитання

1. Яка роль пробіотиків у організмі людини?
2. Назвіть та охарактеризуйте основні види пробіотиків кишечника людини.
3. Які препарати на основі лактобацил Вам відомі?
4. Які препарати на основі біфідобактерій Вам відомі?
5. Яким чином можна проводити одночасне вирощування кількох штамів пробіотиків? У чому переваги такого способу культивування?
6. З якою метою створюють рекомбінантні пробіотики?
7. Наведіть приклади активних фармацевтичних інгредієнтів, які можна доставляти в організм використовуючи рекомбінантні пробіотики?
8. У чому переваги пробіотичних бактерій як системи доставки ліків?
9. Які переваги мають пероральні рекомбінантні пробіотики?
10. Наведіть приклади використання рекомбінантних пробіотиків у імунотерапії.
11. Чому пробіотики можна віднести до перспективних препаратів?

Список джерел інформації

1. Сорокоулова И. Б. Сравнительное изучение биологических свойств биоспорина и других коммерческих препаратов на основе бацилл / И. Б. Сорокоулова // Микробиологический журнал. – 1997. – Т. 19, № 6. – С. 43–49.
2. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов : учебное пособие. / Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2009. – 351 с.
3. Amalazadjou A. Bioengineered probiotics a strategic approach to control enteric infection / A. Amalazadjou, M. A. Koshni, A. Bhunia // Bioengineered. – 2013. – Vol. 48, No. 1. – P. 379–387.
4. Старовойтова С. А. Пробиотики на основе трансгенных механизмов / С. А. Старовойтова, О. И. Скромная // BioTechnologia Acta. – 2013. – Т. 6, № 1. – С. 34–45.
5. Хижняк О. С. Біотехнологічні аспекти отримання комплексного препарату, який містить різні штами пробіотичних культур / О. С. Хижняк, Ю. М. Краснопольський // Вісник НТУ «ХПІ». – 2013. – № 4(978). – С. 113–120.
6. Jungersen M. The science behind the probiotic strain bifidobacterium animalis subsp. Lactis BB 12 / M. Jungersen, A. Wind, E. Johangen et al. // Microorganisms. – 2014. – Vol. 2, No. 2. – P. 91–110.
7. Anne J. Protein secretion in gram-positive bacteria: from multiple pathways in biotechnology / J. Anne, A. Economou, K. Bernaerts // Current Topics in Microbiology and Immunology. – 2016. – Vol. 404, No. 2. – P. 267–308.
8. Patent US 20150073125 A1. Recombinant probiotic for the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome / N. Verynoll, J. M. Sallenave, N. Langella, L. B. Hamarun. – No. 14/490,161; appl. 18.09.2014; publ. 12.03.2015.
9. Hamed M. B. Streptomyces protein secretion and its application in biotechnology / M. B. Hamed, J. Anne, S. Karamanou, A. Economou // FEMS Microbiology Letters. – 2018. – Vol. 365, No. 22. – 10 p. – Режим доступа : <https://doi.org/10.1093/femsle/fny250>
10. Li Q. Recombinant probiotics expressing angiotensin-(1-7) improves glucose metabolism and diabetes-induced renal and retinal injury / Q. Li, K. Xu, T. Du et al. // Diabetes. – 2018. – Vol. 67, Suppl. 1. – Режим доступа : <https://doi.org/10.2337/db18-33-LB>

11. Квашнина А. В. Место пробиотиков на примере штамма BB12 в формировании иммунного ответа и лечение заболеваний желудочно-кишечного тракта / Л. В. Квашнина, И. Н. Матвиенко // Гастроэнтерологія. Гепатологія. Колопроктологія. – 2018. – № 4 (50). – С. 13–14.
12. Mettu S. Perspective on constructing cellulose-hydrogel-based gut-like bioreactors for growth and delivery of multiple-strain probiotic bacteria / S. Mettu, Z. Hathi, S. Athukoralalage et al. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2021. – Vol. 69, No. 17. – P. 4946–4959.
13. Yoha K. S. Targeted delivery of probiotics perspectives on research and commercialization / K. S. Yoha, S. Nida, S. Dutta et al. // Probiotics and Antimicrobial Proteins. – 2021. – Vol. 27, No. 1. – P. 1–34.
14. Temmerman R. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products / Temmerman R., Pot B., Huys G., Swings, J. // International journal of food microbiology. – 2003. – Vol. 81, No. 1. – P. 1–10. – Режим доступа : [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00162-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00162-9)
15. Nakamura T. Cloned cytosine deaminase gene expression of *Bifidobacterium longum* and application to enzyme/pro-drug therapy of hypoxic solid tumors / Nakamura T., Sasaki T., Fujimori M. et al. // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2002. – Vol. 66, No. 11. – P. 2362–2366.

ГЛАВА 5. ФАКТОРИ ЗГОРТАННЯ КРОВІ

5.1. Фактори згортання крові

Найважливішою перевагою рекомбінантних факторів згортання крові (BCF, англ. – blood coagulation factor) є те, що вони не несуть у собі ризику гемотрансмісійних інфекцій, можливих при роботі з препаратами з крові людини. Із прогресом біотехнологічного виробництва молекулярна структура рекомбінантних препаратів стає більш ідентичною природним білкам за структурою та функціональною активністю.

Проблема зупинки кровотеч є актуальною для багатьох напрямів медицини. Світові тенденції останнього часу передбачають використання препаратів крові, а не її компонентів, а також використання продуктів генно-інженерних технологій, які стають альтернативою продуктам донорської крові.

Перш ніж розглянути конкретні рекомбінантні препарати необхідно представити *сучасну модель згортання крові*, що складається з трьох основних стадій (рис. 5.1):

1-ша фаза – ініціація процесу згортання крові, яка розвивається за рахунок утворення комплексу тканинного фактора (ТФ, англ. – tissue factor) і фактора згортання VIIa на поверхні субендотеліальних клітин у місці пошкодження судинної стінки та призводить до утворення незначної стартової кількості тромбіну. Тканинний фактор ТФ експресується у багатьох типах клітин, у тому числі у гладком'язових, фібробластах, макрофагах, які не контактують із кров'ю. За нормальних умов більшість клітин, що перебувають у прямому контакті з кров'ю, позбавлені ТФ. До них відносять ендотеліальні клітини кровоносних судин і тромбоцити, хоча ряд авторів сьогодні заперечують цей факт. Характерною властивістю ТФ є його здатність зв'язуватися з фактором VII з утворенням комплексу ТФ:VII. Важливо, що на відміну від інших прокоагулянтів, що циркулюють у крові в неактивній формі, у здорової людини від 0,01 % до 1 % від усієї кількості фактора VII знаходиться у кровотоку в активованій формі – VIIa.

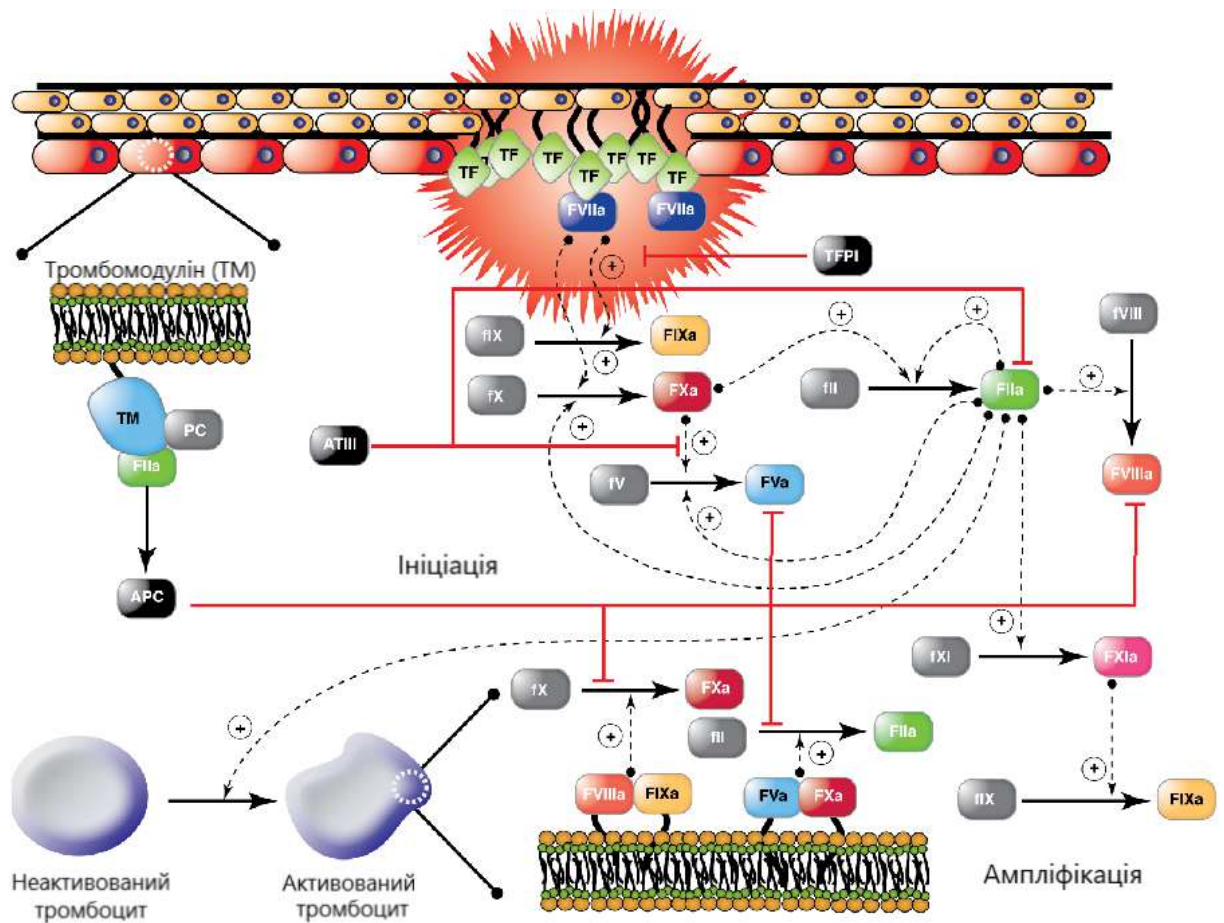


Рисунок 5.1 – Схема процесу згортання крові [Kazemi, 2011]

2-га фаза – посилення процесу згортання крові за рахунок активації тромбоцитів та цілого ряду коагуляційних факторів тромбіном, який утворюється під впливом комплексу TF:VIIa.

3-тя фаза – поширення процесу згортання крові з формуванням теназного та протромбіназного комплексів на поверхні активованих тромбоцитів. В результаті утворюється значна кількість тромбіну, здатного сформувати потік фібрину. Цьому процесу сприяють унікальні властивості тромбоцитів, які пояснюються наявністю на поверхні високоафінних рецепторів для факторів XI, XIa, IX, IXa, VIII, VIIIa, V, Va, X, Xa, протромбіну і тромбіну. Формування теназного комплексу (VIIIa:IXa) потребує наявності активних форм двох факторів – IXa та VIIIa. Встановлено, що активація фактора IX досягається двома шляхами. Перший шлях – це активація фактора IX комплексом TF:VIIa. Фактор IXa, що утворюється при цьому, переходить з клітин, які несуть TF, на поверхню поруч розташованих тромбоцитів, практично не втрачаючи своєї активності, оскільки він не чутливий до дії інгібітору шляху тканинного фактора і дуже повільно інгібується антитромбіном та іншими плазмовими інгібіторами протеаз.

Однак критичну кількість активного фактора ІХ, яка потрібна для зупинки кровотечі, утворюється іншим шляхом – під впливом фактора ХІа, пов'язаного з тромбоцитами.

Сьогодні для терапевтичних цілей досить широко використовуються плазмові фактори, отримані з донорської крові. Враховуючи роль зазначених факторів у системі згортання крові зрозумілою є актуальність створення рекомбінантних препаратів, що беруть участь у коагуляції. Метою досліджень є створення технології виробництва рекомбінантних білків – факторів згортання крові – аналогів білків донорської крові, як альтернатива виробництву лікарських препаратів, одержуваних шляхом фракціонування крові.

Гемофілія А/В – це Х-зчеплене порушення згортання крові, викликане дефіцитом або дисфункцією VCF-VIII і ІХ, що характеризується зниженням або уповільненням утворення тромбіну, що порушує утворення згустку і веде до геморагічного діатезу.

VCF-VIII застосовують при захворюванні на гемофілію А, хворобу Віллебранда (лікування та профілактика кровотеч, у тому числі під час хірургічних втручань), набутий дефіцит VCF-VIII, захворювання, що супроводжуються утворенням антитіл до VCF-VIII.

VCF-ІХ застосовують при геморагічному синдромі при дефіциті VCF-ІХ (вродженому або набутому), гемофілії В та А (монотерапія або у поєднанні з інгібіторами VCF-VIII), передозуванні антикоагулянтів кумаринового ряду або необхідності проведення втручань на фоні їх застосування.

У 1950–1960 рр. лікування хворих на гемофілію ґрунтувалося на переливанні цільної крові або свіжої плазми. У 1964 р. VCF були ідентифіковані. Автор докладно описав процес згортання крові, назвавши його каскадом коагуляції. На жаль лікування було малоефективним, оскільки у використовуваних продуктах (кров і плазма) була недостатня кількість факторів VIII та ІХ, щоб зупинити серйозну внутрішню кровотечу. Більшість хворих на гемофілію помирали в дитинстві або ранньому дорослому віці. Першим великим проривом у лікуванні гемофілії стає кріопреципітат (відкритий доктором Д. Полом у 1964 р.). Було виявлено, що при повільному відтаюванні замороженої плазми утворюється осад, що містить VCF-VIII. Це дозволило вводити більшу кількість кріопреципітату хворому внутрішньовенно у меншому об'ємі. Кріопреципітат став доступним для хворих на гемофілію та для пацієнтів з хворобою Віллебранда.

Наприкінці 1960-х років у промисловості почали розробляти різні методи відділення факторів VIII і IX від об'єднаної плазми, у результаті отримували концентрований ліофілізований препарат факторів VIII і IX. На жаль ці препарати могли містити віруси гепатиту та ВІЛ.

5.2. Біотехнологія рекомбінантного активованого фактора VII

Активований VCF-VIIa займає унікальне місце у забезпеченні гемостазу. По-перше, безпосередньо у місці пошкодження судини VCF-VIIa, з'єднавшись з TF, активує VCF-IX та VCF-X (рис. 5.1). VCF-Xa у цьому ж місці перетворює невеликі кількості протромбіну на тромбін. Ця невелика кількість тромбіну є достатньою для дисоціації комплексу, що складається з VCF-VIII та фактора Віллебранда, та активації тромбоцитів для забезпечення можливості зв'язування VCF-IXa з відповідними рецепторами тромбоцитів. По-друге, VCF-VIIa може безпосередньо активувати VCF-X за відсутності TF, але за наявності достатньої кількості фосфоліпідів на поверхні активованих тромбоцитів.

Таким чином, VCF-VIIa запускає процес коагуляції шунтуючим шляхом, активуючи VCF-X в обхід VCF-VIII і IX, тобто VCF-VIIa стимулює утворення тромбіну без факторів VIII і IX.

VCF-VII є білком-протеазою з молекулярною масою 50 кДа. Він належить до групи вітамін К-залежних коагуляційних протеаз. VCF-VII складається з одного пептидного ланцюга з 406 амінокислот. Активація VCF-VII відбувається завдяки специфічному розщепленню у точці Arg 152.

Препарат рекомбінантного VCF-VIIa «NovoSeven[®]» (Novo Nordisk, Данія) використовується хворими на інгібіторну форму гемофілії А і В, і в багатьох випадках він ефективний у ситуаціях, коли всі інші методи лікування інгібіторної форми гемофілії виявляються нерезультативними. Крім того, VCF-VII застосовується у пацієнтів з тяжким ступенем недостатності VCF-VII; хворобою Віллебранда; дефіцитом VCF-XI; кровотечею на тлі набутих коагулопатій; кровотечею на тлі тромбоцитопенії різного генезу (хвороба Гланцмана, синдром Бернара-Сульє); передозуванням кумаринів (ятрогенний дефіцит VCF-VII внаслідок інгібування гамма-карбоксилювання у печінці). Одержання рекомбінантного VCF-VIIa «NovoSeven[®]» проводять на культурі клітин нирок хом'яка.

У Росії сьогодні випускається препарат VCF-VII людини «Коагил-VII[®]» (Фармстандарт), до складу якого входить субстанція ептаког-альфа (активована-

на) – BCF-VIIa (молекулярна маса 50 кДа), отримана методом генної інженерії з клітин нирок хом'ячків.

Цікаві дані, отримані вченими Гематологічного наукового центру РАМН, інституту біоорганічної хімії ім. М. М. Шемякіна та Ю. А. Овчиннікова та фармацевтичної компанії ЗАТ «Мастерклон». Авторами запропонована плазмідна ДНК рEFZeoF7, що містить послідовність поліпептиду коагуляційного BCF-VII людини. Отримано штам ВНК/F7 еукаріотичних ВНК-клітин, що містять рекомбінантну плазмиду ДНК рEFZeoF7, яка кодує BCF-VII людини. Запропонована вченими експресійна конструкція, що містить послідовність поліпептиду BCF-VII людини, відрізняється від відомих конструкцій за такими даними:

- складається з 6296 п.н., молекулярна маса – 4,16 МДа;
- включає XhoI-BglIII/BamHI фрагмент плазмиди рEFZeoF7, що містить ген Amp(R), що забезпечує стійкість трансформованих клітин до ампіциліну; ген, що забезпечує стійкість трансформованих клітин до зеоцину;
- унікальні ділянки впізнавання рестриктаз NotI (31 п.н.); XhoI (61 п.н.); pstI (1142 п.н.); BamHI (1946 п.н.).

Вихід рекомбінантного BCF-VII людини становить близько 4 мкг на 1 мл культурального середовища, що в чотири рази вище, ніж в інших виробників. Застосування рекомбінантних препаратів дозволяє звільнитися від трансмісійних інфекцій.

5.3. Біотехнологія рекомбінантного фактора VIII

У 1984 р. кДНК фактора VIII була клонована, що дозволило отримати рекомбінантний BCF-VIII та уникнути можливості вірусної контамінації. Це був прорив у лікуванні гемофілії А. У 1992 р. ліцензовано перший рекомбінантний BCF-VIII – «Recombinante®».

В наш час біотехнологічною промисловістю виведено на ринок 12 рекомбінантних комерційних препаратів BCF-VIII та 6 рекомбінантних комерційних препаратів BCF-IX.

Перший рекомбінантний BCF-VIII (rBCF-VIII) – rBCF-VIII_{Fc} – являє собою рекомбінантний злитий білок BCF-VIII з альбуміном як стабілізатором. Він був ліцензований у 1992 році. Пізніше було створено препарат другого покоління (з делецією В-домену), що не містить альбуміну. Обидва препарати розроблені з використанням клітин тваринного походження, білків у клітинному культуральному середовищі та сироваткового альбуміну людини в кінцевій

композиції – це перше покоління VCF. Ці препарати мають ризик зараження трансмісійними агентами (віруси без оболонки, гепатит А, парвовірус В19 і невідомі агенти). Цей факт призвів до розробки VCF другого покоління, в яких використовували поживне середовище з додаванням білків людини замість білків тваринного походження (фетальна бича сироватка), а в кінцевий продукт не додавали альбумін. У цьому випадку були використані нові технології для стабілізації молекул VCF-VIII, наприклад, сахарозою або трегалозою. До продуктів третього покоління відносять ті, у яких не використовуються людські або тваринні білки для культивування або очищення клітин.

Деякі дослідники показали, що пацієнти, які отримували препарати rVCF-VIII другого покоління, мали вищий ризик розвитку інгібіторів порівняно з препаратами третього покоління. Інгібітор VCF-VIII являє собою IgG, що виробляється в організмі пацієнта та має високу поліклональну спорідненість, спрямовану проти білків VCF-VIII. Інгібуючі антитіла зазвичай спрямовані проти доменів A2, A3 і C2 фактора VIII. Зв'язування інгібітора у цих доменах призводить до стеричної блокади функціональних епітопів VCF-VIII.

Для лікування гемофілії використовують кілька препаратів, що містять rVCF-VIII: «Kogenate[®]FS» (Bayer Corporation); «Helixate[®]FS» (Aventis-Behring); «Recombinate[™]» (Baxter Hyland Immuno); «ReFacto[®]» (Genetics Institute). Ці препарати знаходяться на фармацевтичному світовому ринку з 2000 року.

Спочатку для препаратів, наприклад, «Kogenate[®]FS» (молекулярна маса – 80 кДа, отриманий на культурі нирок хом'ячків) використовувалося середовище для клітинної культури, що містить розчин білків плазми крові людини і рекомбінантний інсулін. Процес очищення включав етап вірусної інактивації з використанням сольвент/детергентної обробки; етапи іонообмінної хроматографії та імуноафінної хроматографії з моноклональними антитілами. Виробники препаратів провели валідаційні дослідження та довели, що запропоновані методи очищення дозволяють усунути інфективність препарату, яка гарантує прояв трансмісійних інфекцій (модельні експерименти проведені на губчастій енцефалопатії та ряді вірусів).

Незважаючи на нижчий ризик розвитку інгібіторів у деяких продуктах третього покоління використовують мишачі моноклональні антитіла під час подальших обробок (афінна хроматографія). Незважаючи на ефективність використаної афінної очистки мишачі моноклональні антитіла можуть бути присутніми у промивних водах через вилуговування з матриці носія, що використовується під час хроматографії. Крім того, очищення на основі моноклона-

льних антитіл пов'язане з більшими економічними витратами та проблемами, пов'язаними зі стабільністю, оскільки сайт зв'язування антитіла може бути неприйнятним для жорстких умов, необхідних для дезінфекції колонки.

У останніх схвалених технологіях для одержання rVCF-VIII («Eloctate[®]», «Nuwiq[®]», «Kovaltry[®]») використовують рекомбінантні білки, що продукуються *S. cerevisiae*, як ефективний ліганд або пептиди, щоб уникнути наведених вище недоліків. Використання пептидів замість моноклональних антитіл для афінної хроматографії може забезпечити вищу ефективність та селективність.

Незважаючи на якість препаратів третього покоління, rVCF-VIII з точки зору біодоступності та ефективності лікування покращує ці продукти, однак, його використання обмежене коротким періодом напіввиведення (8–12 годин), оскільки для профілактики та лікування необхідні ін'єкції 3 рази на тиждень через день. Продукти з пролонгованим періодом напіврозпаду, такі як «Eloctate[®]», «Adynovate[®]» мають перевагу – зменшення частоти введення, тим самим покращується комплаєнтність пацієнтів та збільшується тривалість періоду. Також у пацієнтів відсутні втрати крові. «Eloctate[®]» був розроблений шляхом злиття димерних доменів CH₂-CH₃ Fc-фрагменту людського IgG1 з rVCF-VIII з видаленим доменом В. У клінічних випробуваннях «Eloctate[®]» продемонстрував збільшення в 1,5 рази періоду напіввиведення, а також зменшення середньорічної частоти крововтрат порівняно з його незлитим аналогом. «Adynovate[®]» був розроблений за допомогою технології ПЕГильовання з рекомбінантного полірозмірного VCF-VIII. Період напіввиведення був збільшений у 1,8 разів у приматів у порівнянні з неПЕГильованим «Adynovate[®]». Було показано, що ПЕГильовання знижує імуногенність рекомбінантних білків у тварин порівняно з неПЕГильованим. Ці продукти можна розглядати як VCF четвертого покоління.

Необхідно відмітити, що виробники зазначених препаратів проводять постійне вдосконалення технології та підвищення рівня якості продукту. Так, зі складу «Kogenate[®]FS» та «ReFacto[®]» було видалено альбумін. У 2008 р. було отримано rVCF-VIII, у технології якого відбулися такі зміни: культивування клітинної лінії проводилося без присутності альбуміну; при проведенні афінної хроматографії моноклональні антитіла було замінено на синтетичний поліпептидний ліганд; стадія нанофільтрації проведена на фільтрі з розміром пор 35 нм.

Таким чином, на стадії високоселективної афінної хроматографії використовується синтетичний ліганд, розроблений для усунення потенційного зара-

ження мишачими вірусами. Визначення низькомолекулярних лігандів проводиться за допомогою методу докінгу *in silico* – скринінгу бібліотек хімічних сполук для пошуку нових афінних сорбентів на основі низькомолекулярних пептидів або нових лікарських засобів. Синтетичний ліганд зафіксовано на смолі для хроматографії. Ліганд відомий під назвою TN 8.2. При порівнянні ефективності проведення афінної хроматографії з синтетичним лігандом та мишачими моноклональними антитілами виявлено такі переваги ліганду: вихід становить 85 %, а при використанні – антитіл 63 %. Видалення білків яєчника хом'ячків при використанні ліганду в 1,15 рази вище, ніж при роботі з антитілами.

За даними професора Брайана Колвіна з Великобританії рівень TN 8.2 у лікарській субстанції вкрай низький – не більше 1 промілю. TN 8.2 не токсичний при надлишку в 300 млн. разів на тваринній моделі і не створює перешкод щодо коагуляційної активності при надлишку в 1 млн. разів. Крім того, достатньо однієї обробки продукту для видалення TN 8.2. В результаті розробки одержано препарат rVCF-VIII високого ступеня очищення: домішки ДНК клітин хом'ячків – не більше 10 пг/МО; домішки протеїну клітин хом'ячків – трохи більше 80 пг/МО.

Як приклад розглянемо препарат «Nuwiq®» (Octapharma, США), який експресовано на лінії НЕК 293 у 2015 р. (перший препарат четвертого покоління). «Nuwiq®» – rVCF-VIII з видаленим доменом В являє собою глікопротеїн з молекулярною масою 170 кДа, що включає домени VCF-VIII A1-A2 (так званий важкий ланцюг з молекулярною масою 90 кДа) та A3-C1-C2 (так званий легкий ланцюг з молекулярною масою 80 кДа), а домен В видалено. Містить 1440 амінокислотних залишки. Оскільки при виробництві «Nuwiq®» використовуються клітинні лінії нирок ембріона людини посттрансляційні модифікації є таким самим як у VCF-VIII, отриманого з плазми крові людини. Відсутні епітопи Neu5Gc і 1,3-Gal, які присутні у продуктах, які продукуються клітинами тварин. Культивування клітин проводили з використанням поживних середовищ без сироватки і без додавання білків тваринного або людського походження, таким чином, ризик зараження вірусами практично відсутній. Процес очищення включає кілька стадій: стадію афінної хроматографії з використанням рекомбінантного білку як ліганду та 2 стадії очищення від вірусів: обробкою розчинником/детергентом і нанофільтрація (фільтрація через фільтри з розміром пор 20 нм) для видалення будь-яких вірусів, що теоретично зустрічаються. Клітини НЕК 293 були обрані через здатність до гамма-карбоксилювання та процесингу

пропептиду в порівнянні з іншими клітинами ссавців. В даний час обмежена кількість компаній використовує клітини НЕК 293 у комерційному виробництві, але вони широко використовуються у лабораторних дослідженнях. «Nuwiq®» – апірогенний, стерильний та ліофілізований продукт. У препараті міститься VCF-VIII у кількості 250-2000 МО/мл. Як допоміжні компоненти в 1 мл містяться: 18 мг натрію хлориду, 5,4 мг сахарози, 5,4 мг L-аргініну гідрохлориду, 0,3 мг хлориду кальцію дигідрату, 1,2 мг поліксомера-188, 4,2 мг натрію цитрату дигідрату. Активність препарату – 8124 МО на 1 мг загального азоту.

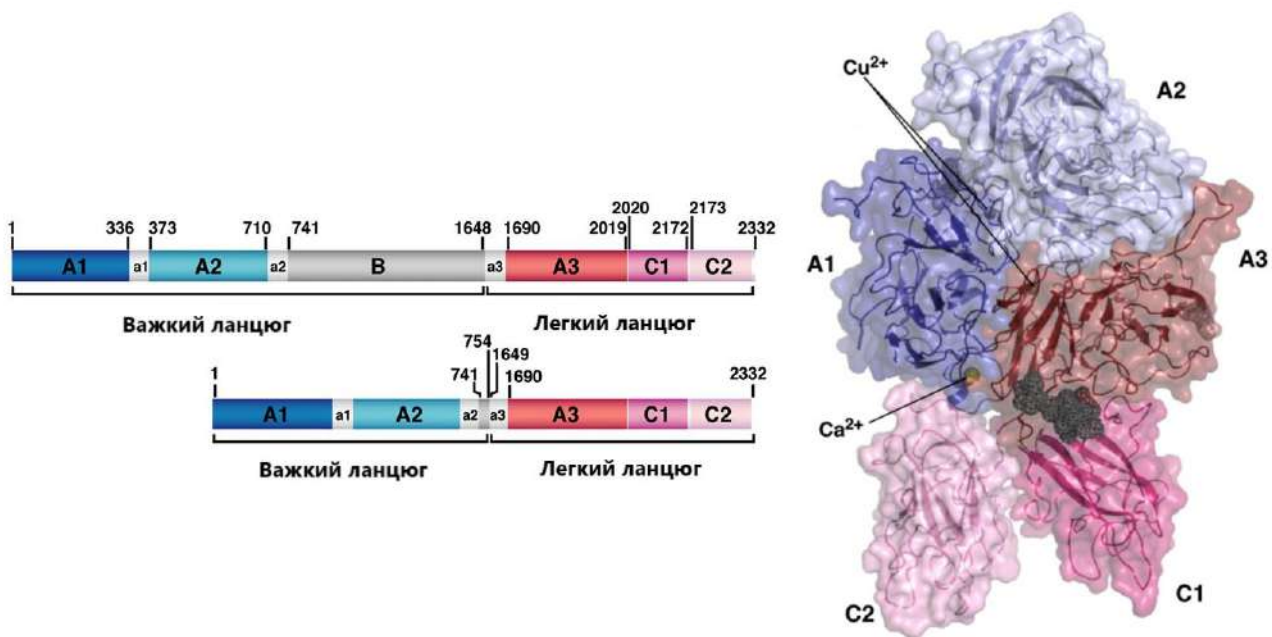


Рисунок 5.2 – Фактор згортання крові VIII з делетованим доменом В [Ngo et al., 2011]

Технологія отримання rVCF-VIII людини з делетованим доменом В. VCF-VIII людини представлений поліпептидом, що складається з 2332 амінокислотних залишків і включає структурні домени А1-А2-С1-С2. Домен-В є високоглікозилюваною структурою і може брати участь у процесах внутрішньоклітинного транспорту попередника фактору VIII та його процесингу. Експериментально встановлено, що видалення домену (делеція) призводило до збільшення рівня секреції функціонально-активного VCF-VIII. Ці дані призвели до створення плазмиди для експресії rVCF-VIII людини з видаленим В-доменом у культурі клітин ссавців, наприклад, у нирках китайського хом'ячка (СНО) або культурі ембріональних нирок людини (НЕК).

Експресійну плазмиду, що кодує rVCF-VIII людини з делецією В-домену, вирощували в препаративних кількостях у штамі *E. coli TOP 10*, очищали, ліне-

аризували ендонуклеазою рестрикції з руйнуванням гена бета-лактамази і стерилізували. Трансфекцію лінеаризованої плазмиди проводили, наприклад, за допомогою ліпосомального реагенту. Культуру вирощували протягом 48 годин, переносили на лунки планшета і проводили відбір клітин з оптимальними для технології властивостями. Лінії клітин з оптимальною характеристикою були використані для субклонування шляхом обмежуючого розведення та додаткової характеристики для вибору виробничої клональної клітинної лінії – клітини ділилися без гіпоксантину і тимідину. Створену генну конструкцію плазмиди використовували для отримання лінії продуцента. Лінії клітин з оптимальною характеристикою були використані для субклонування шляхом обмежуючого розведення та додаткової характеристики для вибору виробничої клональної клітинної лінії. Лінія клональних клітин, вирощена для виробництва, була розширена для створення банку послідовних клітин, з яких потім був отриманий основний банк клітин. Основний банк клітин був джерелом отримання робочого банку клітин. Клітини банків були проаналізовані на ідентичність, чистоту та відсутність сторонніх агентів. Досліджено послідовність, що кодує трансген, число колоній та патерни інтеграції генів (генетичні шаблони). Після закінчення виробничого процесу, проводили порівняння, яке використовувалося для оцінки та підтвердження інтеграції трансгену та стабільності клітинної лінії в ході виробничого процесу. Щоб охарактеризувати продукт, отриманий з цієї клітинної лінії, rBCF-VIII_{Fc} аналізували на наявність двох гліканів, що не належать людині: термінальної галактози (α -1,3-2-галактози) та N-гліколілнейрамінової кислоти. α -1,3-2-галактозу виділяли за допомогою α -(1-3,4-G)-галактозидази, міченої 2-амінобензойною кислотою, і хроматографували за допомогою ультраефективної рідинної хроматографії (UPLC, англ. – Ultra-Performance Liquid Chromatography) з флуоресцентним детектором. N-гліколілнейрамінову кислоту виділяли за допомогою 50мМ H₂SO₄, мітили 1,2-діаміно-4,5-метилендіоксибензолом та аналізували за допомогою UPLC з флуоресцентним детектором.

Для отримання лікарського препарату rBCF-VIII людини з делетованим В-доменом переважно використовувати безсироваткове середовище для культивування. У зв'язку з цим трансформовані клітини (СНО, НЕК 293Н) вирощували у безсироватковому середовищі. До складу живильного середовища вводили гідролізати сої, вітаміни, амінокислоти, макро- та мікроелементи. Один флакон робочого банку клітин використовували для виробництва однієї серії. Принципова технологічна схема отримання rBCF-VIII представлена на рис. 5.3.

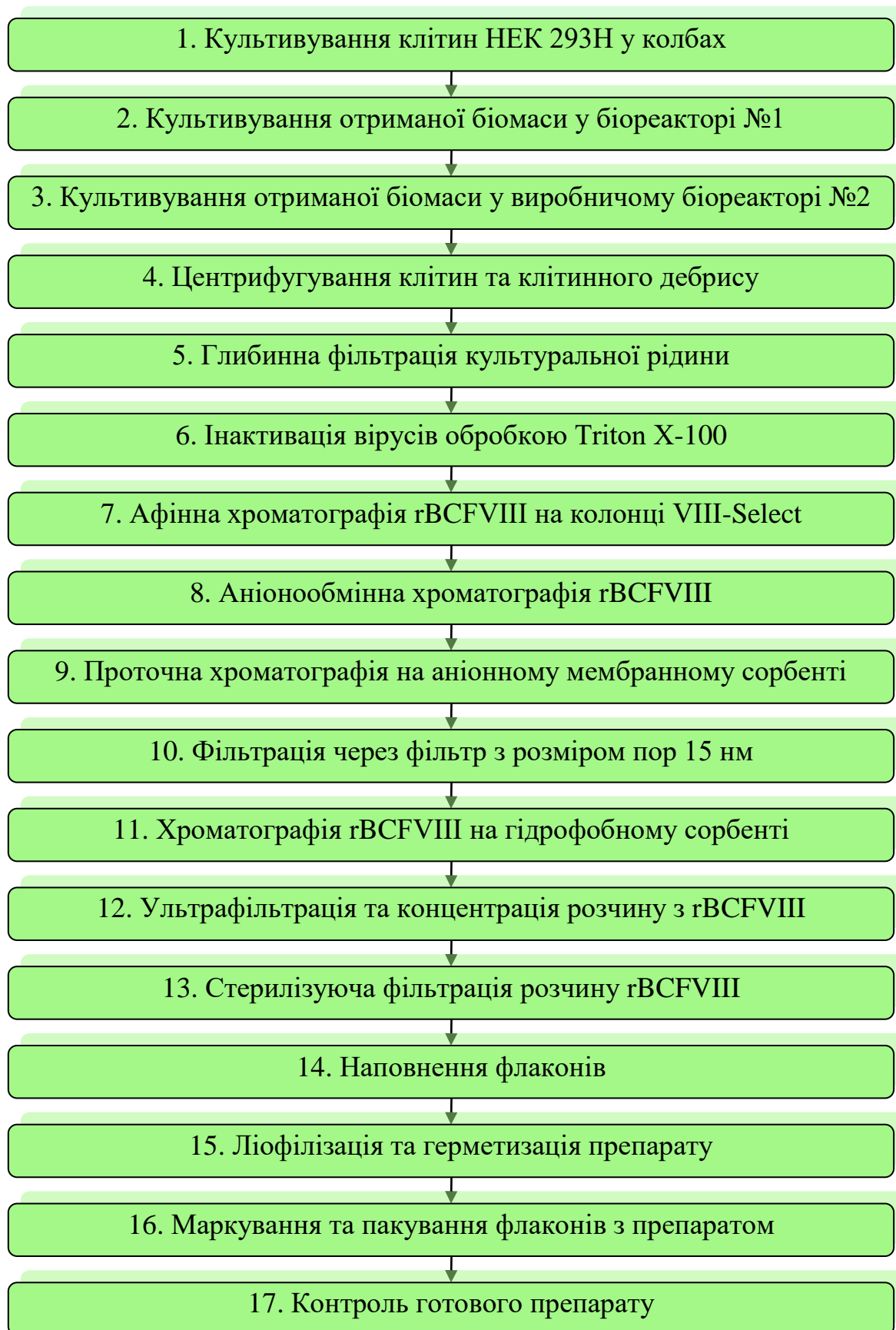


Рисунок 5.3 – Технологічна схема отримання rBCF-VIII

Стадія 1. Заморожену культуру у флаконі відтають та пересівають на поживне середовище у колбах. Культивування у колбах проводять при перемішуванні при температурі 30–38 °С.

Стадія 2. Колби з вирощеною культурою об'єднують і використовують для інокуляції біореактора №1. Культуру посівного матеріалу в реакторі перемішують у періодичному режимі з контролем перемішування, тиску, температури, рН та розчиненого кисню.

Стадія 3. Культуру, що виросла у реакторі №1, використовують як інокулянт для виробничої серії продукту. Отриманою культурою інокують виробничий біореактор №2, наприклад, об'ємом 1000 л або 2000 л. Вирощування культури в біореакторі №2 проводять у періодичному режимі перемішування при температурі 30–38 °С. Контролюють основні технологічні параметри: рН, температуру, швидкість перемішування, тиск та кількість розчиненого кисню. Вирощування може здійснюватися в аеробних умовах із підвищеним вмістом вуглекислого газу (8 %) протягом 24–96 годин. Цей процес приводить до накопичення цільового продукту rBCF-VIII людини у культуральному середовищі або цитоплазмі клітини.

Стадія 4. Клітини культури та клітинний дебрис видаляють центрифугуванням при температурі 6–10 °С.

Стадія 5. Отриману культуральну рідину піддають глибинній фільтрації. На цій стадії одержують частково очищений розчин цільового продукту rBCF-VIII.

Стадія 6. З метою інактивації вірусів, які можуть бути присутніми в освітленій культуральній рідині, отриманий розчин обробляють детергентом (Triton X-100). Одержаний продукт очищують, використовуючи кілька видів хроматографії:

- ✓ специфічною для фактора VIII афінною хроматографією з використанням колонки VIII Select (**стадія 7**);

- ✓ у даній технології на стадії афінної хроматографії моноклональні антитіла замінені антигенним лігандом, що є синтетичним поліпептидом, розробленим для усунення потенційного зараження мишачим вірусом. Найкращою альтернативою традиційним імуносорбентам є афінні сорбенти з іммобілізованими синтетичними лігандами, наприклад, VIII Select. VIII Select є афінним лігандом на основі іммобілізованого рекомбінантного пептиду специфічного для фактора VIII, який є одночасно високоефективним і не містить компонентів тваринного походження, таких як моноклональні антитіла мишей. Адсорбент VIII Select

зв'язується з частиною легкого ланцюга rVCF-VIII, а потім продукт десорбують за допомогою буферного розчину при нейтральному рН, що гарантує цілісність rVCF-VIII;

✓ аніонообмінна хроматографія rVCF-VIII, що ґрунтується на заряді (*стадія 8*);

✓ використання проточного аніонного мембранного сорбенту (*стадія 9*).

Стадія 10. Потім продукт rVCF-VIII фільтрують через фільтр із розміром пор 15 нм (для видалення вірусів).

Стадія 11. Продукт додатково очищають з використанням останньої стадії хроматографії на сорбенті з гідروفобною взаємодією.

Стадія 12. rVCF-VIII концентрують і замінюють буфером з використанням ультрафільтрації (буфер містить натрію хлорид, сахарозу, гістидин, дигідрат кальцію хлориду, полуксамер).

Стадія 13. Отриманий розчин rVCF-VIII фільтрують через мембрани з розміром пор 0,2 мкм.

Стадія 14. Стерильним розчином наповнюють флакони та заморожують при температурі -70 °С.

Стадія 15. Ліофілізація та герметизація препарату.

Стадія 16. Маркування та пакування препарату.

Стадія 17. Контроль готового препарату.

5.4. Біотехнологія рекомбінантного фактора ІХ

Препарат рекомбінантного VCF-IX був розроблений у 1997 р. після клонування відповідного гена та ліцензований у 1999 р. Цей білок відрізняється від природного кількістю посттрансляційних модифікацій та фармакокінетикою, що зумовлює більшу дозу. Сьогодні на світовому фармацевтичному ринку присутні 5 рекомбінантних VCF-IX. Ключові стадії виробництва рекомбінантного VCF-IX можна визначити як:

1) стабільне вбудовування генів VCF-IX в клітини яєчників китайського хом'ячка;

2) відбір клітинної лінії, здатної експресувати велику кількість активного рекомбінантного VCF-IX при культивуванні в біореакторі в живильному середовищі, яке повністю звільнене від продуктів крові або плазми;

3) очистка рекомбінантного VCF-IX з використанням нанофільтрації та хроматографії без застосування моноклональних антитіл на Q-сефарозі FF. Нанофільтрація на мембранах «Віресол-70» включена для підвищення рівня вірусної безпечності та видалення протеїнів та вірусів з молекулярною масою понад 70 кДа. Стадія хроматографії та нанофільтрації пройшли валідацію у плані доказу видалення вірусів з використанням модельних експериментів за участю 3–4 видів вірусів.

Хоча рекомбінантний VCF-IX менший і менш складний, ніж VCF-VIII (415 амінокислот, одноланцюгова молекула), як вітамін К-залежний білок, крім загальної для глікопротеїдів посттрансляційної модифікації, потребує гамма-карбоксилювання та протеолітичного процесингу.

Перший комерційний продукт «VeneFix[®]», випущений у 1997 р. компанією Pfaizer (використовувалися білки тваринного чи людського походження), належить до третього покоління препаратів.

«Rixubis[®]» та «Ixinity[®]» схвалені в 2013 та 2015 рр. відповідно, обидва продукти відносяться до третього покоління, що продукуються в лінії клітин CHO на відміну від інших VCF-IX, що несуть поліморфізм Ala-148, має первинну амінокислотну послідовність з поліморфізмом Thr-148. У VCF-IX, отриманому із плазми людини, виявляються обидва варіанти.

В даний час ліцензовано 6 рекомбінантних VCF-IX: «Alprolix[®]», «VeneFix[®]», «Idelvion[®]», «Ixinity[®]», «Rebinyn[®]» (ПЕГильований продукт), «Rixubis[®]». Вони отримані на клітинах CHO і очищені різними видами хроматографії та фільтрації через мембрани з розміром пор 15-30 нм. Препарати містять від 250 до 3000-4000 МО/мл VCF-IX. Продукти апірогенні, стерильні ліофілізовані. Як допоміжні компоненти використовуються: цукри (трегалоза, сахароза, манітол), амінокислоти (L-гістидин або гліцин), полісорбат (твін 20 або 80), натрію хлорид, кальцію хлорид дигідрат, натрію цитрат.

Підсумовуючи, необхідно зазначити, що біотехнологічні виробничі процеси отримання рекомбінантних VCF постійно вдосконалюються для оптимізації складу продуктів, підвищення їх ефективності та зниження вартості продукції, що дозволить зробити цю групу фармацевтичних препаратів доступнішою для пацієнтів з порушеннями системи згортання крові.

Контрольні запитання

1. Назвіть переваги та недоліки препаратів рекомбінантних та отриманих із донорської крові факторів згортання крові?

2. Опишіть сучасну модель згортання крові?
3. При яких патологічних станах використовують препарати факторів згортання крові?
4. Чим відрізняються покоління препаратів факторів згортання крові?
5. Які культури клітин використовують для одержання рекомбінантних факторів згортання крові?
6. У чому перевага рекомбінантного фактору згортання крові VIII порівняно з нативним білком?
7. Опишіть основні стадії процесу одержання рекомбінантного фактору згортання крові VIII?
8. Назвіть ключові стадії технології одержання рекомбінантного фактору згортання крові IX?

Список джерел інформації

1. Swiech K. Production of recombinant coagulation factors: the humans the best host cells / K. Swiech, W. Picanco-Castro, D. T. Covas // Bioengineered. – 2017. – Vol. 8, No. 5. – P. 462–470.
2. Авдеева Ж.И. Лекарственные препараты фактора VIII, актуальные вопросы разработки, клинического исследования и применения / Ж. И. Авдеева, А. А. Солдатов, В. П. Бондарев и др. // БИОпрепараты: Профилактика, диагностика, лечение. – 2021. – Т. 21, № 1. – С. 39–49.
3. Подоплелова Н. А. Свертывание крови в 21 веке новые знания, методы и перспективы для терапии / Н. А. Подоплелова, В. Б. Сулимов, А. С. Тащилова и др. // Вопросы гематологии. – 2020. –Т. 19, № 1. – С. 139–157.
4. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ. Часть I : учебное пособие. / Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2012. – 303 с.
5. Патент RU 2561466 С2. Плазмида для экспрессии рекомбинантного фактора свертываемости крови VIII человека с deletированным В-доменом в клетках CHO, клетка CHO – продукт рекомбинантного фактора свертываемости крови VIII человека с deletированным В-доменом и способ получения указанного фактора / Н. А. Орлова, С. В. Ковнер, И. И. Воробьев, А. И. Воробьев. – № 2013123459/10; заявл. 22.05.2013; опубл. 27.08.2015, Бюл. №24.
6. Орлова Н. А. Фактор свертывания крови VIII от эволюции к терапии / Н. А. Орлова, С. В. Ковнер, И. И. Воробьев и др. // Acta Naturae. – 2013. – Т. 5, № 2. – С. 19–39.

7. Macfarlane R. G. An Enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier / R. G. Macfarlane // *Nature*. – 1964. – Vol. 202. – P. 498–499.

8. European Patent No. 0306968 B2. Process for producing recombinant human factor VIII / T. Sugiyama, K. Masuda, Y. Tajima, H. Yonemura. – No. 88114769.8; appl. 15.03.89; publ. 01.12.93, Bull. 93/48.

9. Patent US 9120873 B2. Recombinantly produced human factor VIII and IX / H. Sandberg, P. Stenlund, C. Schroder. – No. 12/737,815; appl. 21.08.2009; publ. 01.09.2015.

10. Шурко Н. О. Препарати фактора згортання крові VIII та способи їх отримання / Н. О. Шурко, М. І. Вороняк, Т. В. Даниш // *Біологічні студії*. – 2014. – Т. 8, № 1. – С. 197–204.

11. Products Licensed in the US [Електронний ресурс]. – National Hemophilia Foundation. – Режим доступу : <https://www.hemophilia.org/healthcare-professionals/guidelines-on-care/products-licensed-in-the-us>

12. Kazemi B. Using Factor VII in Hemophilia Gene Therapy [Електронний ресурс] / B. Kazemi // *Targets in Gene Therapy*. – IntechOpen, 2011. – Режим доступу : <https://doi.org/10.5772/17695>

13. Ngo J. C. Crystal structure of human factor VIII: implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex / J. C. Ngo, M. Huang, D. A. Roth et al. // *Structure*. – 2008. – Vol. 16, No. 4. – P. 597–606.

ГЛАВА 6. БІОТЕХНОЛОГІЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЇ МЕДИЦИНИ

Регенеративна медицина є міждисциплінарною областю, яка прагне розвивати науку та технології, які мають допомогти відновити або замінити пошкоджені (хворі клітини та тканини людини) для відновлення їх нормальних функцій. Це може включати трансплантацію стовбурових клітин (SC, англ. – stem cell), клітин-попередників, стимулювання власних процесів відновлення або використання клітин як систем доставки терапевтичних агентів, таких як гени або цитокіни.

Регенеративна медицина – це напрям медицини, що вивчає відновлення пошкодженої або ураженої хворобою тканини за допомогою ендогенних SC або трансгенних клітин.

У нашому організмі міститься певна кількість SC. Саме завдяки їм відбувається постійне оновлення організму: росте волосся, шар за шаром оновлюється шкіра, загоюються переломи та рани, відновлюються органи та тканини, що постраждали від хвороби. На жаль, відомі ситуації, коли і самі SC схильні до змін, наприклад, при онкологічних захворюваннях. Добре, якщо пухлину можна видалити на ранньому етапі її розвитку. Гірше, якщо в процесі лікування доводиться використовувати хіміотерапію, в результаті якої страждає кістковий мозок, кровотворна система та інші клітини організму. У цих випадках проводиться трансплантація SC. Потрапляючи у хворий організм, вони знаходять собі «специфічне місце» і включаються у звичну їм роботу. Але для того, щоб ввести клітини в організм, який хворіє, їх необхідно отримати. Один із варіантів – це збирання крові або кісткового мозку, їх кріоконсервація та зберігання. Після проведення хіміотерапії заготовлені клітини повертаються господареві. Понад 50 років тому було розпочато роботи з трансплантації кісткового мозку.

Водночас у всьому світі проводяться роботи з отримання SC, де як джерело використовується *кордова (пуповинна) кров*. Встановлено, що у пуповинній крові міститься певна кількість SC. Ці клітини сьогодні використовуються в онкогематології, наприклад, при лейкозі, аутоімунних захворюваннях, інфаркті

міокарда та серцевій недостатності, діабеті, інсульті та інших захворюваннях. У порівнянні з традиційними джерелами, *пуповинна кров має низку переваг*:

- ✓ біологічна «молодість» клітин;
- ✓ низька ймовірність інфікування різними контамінуючими агентами;
- ✓ можливість швидкого та своєчасного транспортування, оскільки не кожен пацієнт може чекати на наявність своєчасного донора кісткового мозку;
- ✓ використання кордової крові пов'язане з меншим ризиком відторгнення, що дозволяє використовувати її при частковій несумісності донора та реципієнта. Крім того, самій дитині, навіть після довгого часу, у дорослому віці клітини підійдуть за визначенням, оскільки це її власні клітини.

З цією метою у всьому світі (тепер і в Україні) створюються високоспеціалізовані медичні установи – *Банки стовбурових клітин*. У SC пуповинної крові є одна беззаперечна перевага – абсолютна генетична ідентичність тканин дитини, з пуповинної крові якої вони були отримані, і часткова для її кровних родичів. У батьків, що чекають народження дитини, є лише одна можливість зберегти її власні SC – під час пологів. Цей напрямок біотехнології виник у середині 90-х років і активно розвивається в більшості економічно розвинених країн світу. Сам факт наявності клітин пуповинної крові у криогенному сховищі Банку стовбурових клітин означає, що у разі потреби вони можуть бути використані негайно, без втрати часу на пошук сумісного донора. Чим раніше почнеться лікування SC, тим більше шансів перемогти захворювання чи зупинити його прогресування.

6.1. Класифікація стовбурових клітин

Стовбурові клітини класифікують за такими ознаками:

- *за здатністю до регенерації* виділяють: ембріональні, мезенхімальні, пуповинні SC, тканиноспецифічні SC-попередники, SC кісткового мозку;
- *за здатністю до диференціювання* виділяють: тотипотентні, плюрипотентні, мультипотентні та уніпотентні SC;
- *класифікація SC на основі стадії їх еволюційного розвитку* включає ембріональну, фетальну, пуповинну кров, а також дорослі SC.

Трансплантація SC може бути аутогенною, аlogenною і сингенною.

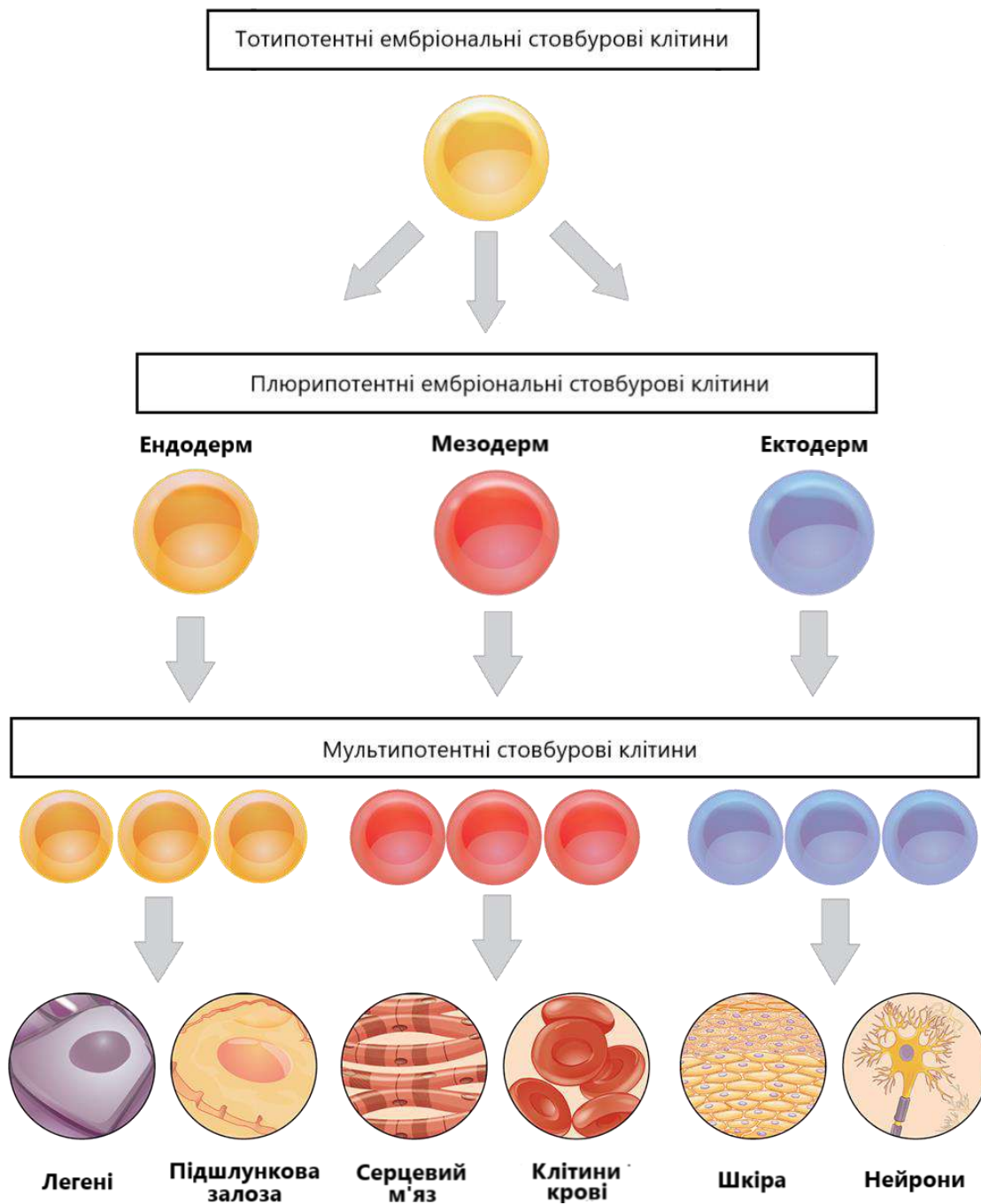


Рисунок 6.1 – Види стовбурових клітин [MacDonald, 2018]

Ембріональні SC – найменш диференційовані з усіх SC, можуть бути виділені з внутрішньої маси бластоцисти (рання стадія розвитку ембріона) на 5–6 день після штучного запліднення яйцеклітини. Бластоциста людини складається з 50–150 клітин. В результаті культивування з них можуть бути отримані лінії «істинних» ембріональних SC, що поєднують практично необмежений потенціал до росту та диференціювання. Проте їхнє клінічне застосування поки що породжує більше суперечок, ніж сподівань. Це пов'язано не лише з етичними

проблемами, але й з високим ризиком злоякісного переродження, розвитку імунних ускладнень та реакції відторгнення, високою ймовірністю інфікування вірусними та іншими агентами. Ембріональні SC є *плюрипотентними*, тобто, можуть диференціюватися на всі типи клітин, крім зовнішніх ембріональних тканин. Це означає, що вони можуть диференціюватися у всі три первинні зародкові листки: ектодерму, ентодерму та мезодерму. Таким чином, утворюється понад 200 видів клітин. Властивість плюрипотентності відрізняє ембріональні SC від поліпотентних клітин, які можуть дати початок лише обмеженій кількості видів клітин.

Фетальні SC отримують з матеріалу плода після абортів (зазвичай термін гестації, тобто внутрішньоутробного розвитку плода становить 9–12 тижнів). Звичайно, вивчення та використання такого біоматеріалу також породжує етичні проблеми. У деяких країнах, наприклад, в Україні та у Великій Британії, продовжуються роботи з їх вивчення та клінічного застосування. Наприклад, британська компанія ReNeuron досліджує можливість використання фетальних SC для терапії інсульту. Ці клітини вже почали диференціювання, отже, кожна з них, по-перше, може пройти лише обмежену кількість поділів і, по-друге, дати початок не будь-яким, а лише певним видам спеціалізованих клітин. Так, з клітин фетальної печінки можуть розвинути спеціалізовані клітини печінки та кровотворні клітини. З фетальної нервової тканини відповідно розвиваються більш спеціалізовані нервові клітини.

Постнатальні SC – SC, отримані з різних тканин постнатального походження (тобто після пологів) або з дорослого організму. Ці клітини мають менші можливості, оскільки вже вичерпали частину закладеного в них від природи потенціалу. Тим не менш, *саме постнатальні SC є найбільш адекватним матеріалом для клітинної терапії на сучасному етапі її розвитку*. До постнатальних SC відносяться:

➤ *Гемопоетичні (кровотворні) SC* утворюють всю різноманітність клітин крові, що забезпечують транспорт кисню, роботу системи згортання, захист від чужорідних агентів, бактерій і вірусів, що визначають імунну відповідь і несприятливість до великого числа захворювань;

➤ *Мезенхімальні (стромальні) SC* здатні формувати компоненти практично всіх відомих «твердих» тканин організму людини: від кісткової та хрящової тканини до клітин серця та печінки, скелетних м'язів та нервової системи. На відміну від кровотворних SC, для отримання «терапевтичної дози» мезенхімальні клітини необхідно додатково розмножувати, використовуючи біотехноло-

гічні методи культивування. Мезенхімальні SC виділяють із жирової тканини, кісткового мозку, пуповини, навколоплідних вод та ін.;

➤ *Тканиноспецифічні прогеніторні клітини (клітини-попередники)* – малодиференційовані клітини, які розташовуються в різних тканинах та органах та відповідають за оновлення їх клітинної популяції, тобто заміщають загиблі клітини. До них, наприклад, відносяться міосателітоцити (попередники м'язових волокон), клітини-попередники лімфо- та мієлопоезу. Ці клітини є оліго- та уніпотентними, а їхня головна відмінність від інших SC полягає у тому, що клітини-попередники можуть ділитися обмежену кількість разів, тоді як інші SC здатні до необмеженого самооновлення, тому їхня приналежність до істинних SC піддається сумніву. Окремо досліджуються *нейральні стовбурові клітини*, які також відносяться до групи тканиноспецифічних. Вони диференціюються в процесі розвитку ембріона та у період плода, внаслідок чого відбувається формування всіх нервових структур майбутнього дорослого організму, включаючи центральну та периферичну нервові системи. Ці клітини були виявлені і в центральній нервовій системі дорослого організму, зокрема, в субепендимальній зоні, гіпокампі, нюховому мозку і т.д. Незважаючи на те, що більшість загиблих нейронів не заміщається, процес нейрогенезу в дорослій центральній нервовій системі все-таки можливий за рахунок нейральних SC, тобто популяція нейронів може «відновлюватися», однак це відбувається в такому обсязі, що не позначається на результатах патологічних процесів;

➤ *Клітини пуповинної крові* – наймолодші та найменш диференційовані з усіх клітин постнатального походження. У пуповинній крові містяться передусім кровотворні SC, але є й інші унікальні різновиди, здатні в певних умовах дозрівати у клітини м'язів та судин, печінки, серця, нервової, ендокринної та інших систем організму. Пуповинна кров є ідеальним джерелом мезенхімальних SC, тому що їх легше отримувати неінвазивним способом, ніж з кісткового мозку.

В Україні дозволено проведення клінічних випробувань (Наказ МОЗ України № 630 «Про проведення клінічних випробувань стовбурових клітин», 2007 р.) щодо лікування таких патологій із застосуванням SC: панкреонекроз, цироз печінки, гепатити, опікова хвороба, цукровий діабет 2-го типу, розсіяний склероз, критична ішемія нижніх кінцівок.

SC можна виділити з багатьох тканин (рис. 6.2): пульпи зуба та менструальної крові, м'язової та нервової тканини, периферичної крові та судинної стінки, амніотичної рідини (навколоплідні води) та інших тканин.



Рисунок 6.2 – Джерела виділення мезенхімальних стовбурових клітин [Macrin et al., 2017]

Однак *практичне значення для виділення клітин з метою їхнього подальшого клінічного застосування мають лише тканини, що містять реальні кількості клітин-попередників:*

- ✓ кістковий мозок – джерело гемопоетичних та мезенхімальних SC;
- ✓ пуповинна (кордова) кров – джерело гемопоетичних SC;
- ✓ строма пуповини та плаценти – джерело гемопоетичних SC;
- ✓ жирова тканина – багате джерело мезенхімальних SC.

6.2. Приклади роботи зі стовбуровими клітинами

Наводимо приклади отримання культивованих мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини людини (ASCs, англ. – adipose-derived stem cells) та культивованих мультипотенних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку людини (BMSCs, англ. – bone marrow-derived stem cells). Методи розроблено та створено в Інституті проблем криобіології та криомедицини НАН Украї-

ни. Весь процес отримання культивованих клітин проводиться в умовах стерильності.

За деякими даними, концентрація SC у жировій тканині майже в 100 разів перевищує їх концентрацію у кістковому мозку. Жирова тканина має очевидну перевагу перед іншими джерелами SC через легкість, з якою можна отримати доступ до підшкірної жирової тканини, а також легкість виділення з неї SC. ASCs мають досить широку плюрипотентність і можуть диференціюватися в остеогенні, хондрогенні, міогенні, нейрогенні і, звичайно, в адипогенні прогеніторні клітини.

Розроблено методи культивування ASCs. Обмеженням застосування ASCs у клінічній практиці є недовговічність транспортованих в організмі ASCs.

6.2.1. Отримання культивованих клітин жирової тканини

Враховуючи відносну простоту отримання жирової тканини людини, ми зупинимося на технології отримання культивованих мезенхімальних SC на прикладі жирової тканини людини.

1. Процесинг жирової тканини. Жирову тканину, що надійшла у вигляді цілого фрагменту чи ліпоаспірату, ретельно відмивають від крові розчином Хенкса, видаляють великі судини і прошарки сполучної тканини і за необхідності подрібнюють до шматочків розміром 2–3 мм³. Далі до подрібнених фрагментів або аспірату жирової тканини додають 0,05 %-вий розчин колагенази в об'ємному співвідношенні 1 : 3, суспензію інкубують протягом 1–1,5 годин при 37 °С і постійному струшуванні зі швидкістю 200 об./хв. Отриману суспензію клітин центрифугують при 2000 об./хв протягом 10 хв, супернатант видаляють. Осад ресуспендують у 10 мл розчину Хенкса та фільтрують через систему для переливання кровозамінників. Очищену від детриту суспензію центрифугують при 1500 об./хв протягом 10 хв, після чого проводять визначення в осаді кількості виділених ядровмісних клітинних елементів та їх життєздатності. Отримана суспензія клітин стромально-васкулярної фракції є вихідним матеріалом для культивування та кріоконсервування, а також може самостійно використовуватись у медико-біологічних дослідженнях.

2. Культивування стромальних клітин жирової тканини. Отриманий осад ресуспендують у середовищі альфа-MEM доповненому 15 % ембріональної сироватки великої рогатої худоби, 2 мМ L-глутаміну, 50 од./мл пеніциліну і 50 мг/мл стрептоміцину, після чого переносять у пластикові флакони (N2,

США) щільністю посіву 2×10^5 клітин/см² і культивують у CO₂-інкубаторі при 37 °С, 5 % CO₂ і 95 % вологості. Першу заміну поживного середовища з видаленням клітин, що не прикріпилися, проводять через 24 год культивування і далі кожні 3 доби. Первинна культура клітин стромально-васкулярної фракції шлунково-кишкового тракту характеризується гетерогенністю. У ній представлені, поряд з подовженими та відростковими фібробластоподібними клітинами, великі клітини-макрофаги, преадипоцити, а також дрібні ендотеліальні клітинні елементи, які під час перебування в умовах культивування поступово елімінуються.

При досягненні первинними культурами адгезивних клітин жирової тканини стану субконфлуентного (майже суцільного) моношару їх знімають з поверхні пластику, у якому проводилась культивування, сумішшю 0,02 %-вого розчину Версена і 0,25 %-ого розчину трипсину, що знаходяться в об'ємному співвідношенні 4 : 1. При цьому ростове середовище із культуральних ємностей видаляють, клітини обережно відмивають розчином Хенкса і заливають вказаною сумішшю розчинів Версена та трипсину на 4–5 хв при 37 °С. Суспензію клітин, що відокремилися, центрифугують зі швидкістю 700 об./хв протягом 7 хв. Супернатант видаляють, а отриманий осад ресуспендують у поживному культуральному середовищі. Кількість клітин підраховують у гемоцитометрі та після розведення культуральним середовищем розсіюють у пластикові матраци з низькою посівною дозою (не більше 20 клітин/см²) для утворення колоній. Культивування проводять у CO₂-інкубаторі при 37 °С, 5 % CO₂ у повітрі та 95 % вологості.

Через 2-3 тижні утворені колонії знімають шляхом трипсинізації з дна матраца, отриману клітинну суспензію переносять в культуральні ємності з коефіцієнтом пересіву 1 : 3 і культивують до утворення субконфлуентного моношару з щоденним візуальним контролем клітинного моношару за допомогою інвертованого мікроскопа. Після 2-х і 3-х пасажів культивовані клітини уніфікуються і морфологічно не відрізняються від фібробластоподібних. Швидкість формування моношару за описаних умов зазвичай становить 3–4 доби. Отримана поліклональна культура являє собою мезенхімальні SC, що характеризуються клонгенним ростом, специфічним імунофенотипом, високим проліферативним потенціалом та здатністю до індукованих диференціювань.

3. Підготовка мезенхімальних ASCs до використання. Відділення клітин від дна флаконів проводять за допомогою суміші Версена з трипсином як описано раніше. Клітинну суспензію об'єднують з 10 мл розчину Хенкса і

центрифугують при 700 об./хв протягом 7 хв. Супернатант видаляють, осад ресуспендують у розчині Хенкса з 2 % сироватки до концентрації $1-2 \times 10^6$ клітин/мл. Підготовлену суспензію передають до використання у герметичному стерильному контейнері або піддають кріоконсервуванню. При транспортуванні суспензії незаморожених мезенхімальних ASCs необхідно забезпечувати температурний режим 0–4 °С. Час перебування клітин у суспензії до використання не повинен перевищувати 18–20 годин. Перед використанням температуру контейнера слід довести до 18–20 °С.

4. Кріоконсервування культивованих мезенхімальних ASCs. Кріоконсервування культивованих мезенхімальних ASCs рекомендується проводити на 2–4 пасажах, залежно від індивідуальних особливостей донорського матеріалу.

При кріоконсервуванні клітинної суспензії мезенхімальних ASCs як кріопротектор використовують димексид (ДМСО), який додатково очищають до повного зникнення специфічного запаху. Консервуючий розчин, що містить 2,8 моль/л ДМСО, готують безпосередньо перед роботою з клітинами на розчині Хенкса без фенолового червоного.

У стерильних умовах клітинну суспензію мезенхімальних ASCs з відомою концентрацією клітинних елементів повільно по краплях, об'єднують з середовищем заморожування (розчин ДМСО) в об'ємному співвідношенні 1 : 1. Підготовлену до заморожування клітинну суспензію розливають в кріопробірки по 1–1,5 мл, закривають кришками, герметизують, маркують та поміщають у камеру програмного заморожувача. Процес кріоконсервування реалізують в універсальному програмному заморожувачі. Заморожування ведуть у 2 етапи: охолоджують зразки до мінус 80 °С зі швидкістю 1 °С/хв, а потім занурюють у рідкий азот при мінус 196 °С. Після заморожування кріопробірки вилучають із рідкого азоту і переносять у спеціальне сховище, обладнане касетами з ячейками для кріоконтейнерів, де зберігають при температурі мінус 196 °С.

5. Контроль культивованих мезенхімальних ASCs проводять за такими показниками:

- контроль матеріалу на стерильність (бактерії та дріжджі) та вірусологічний контроль методом ПЛР;
- визначення життєздатних клітин;
- визначення фенотипових характеристик культивованих мезенхімальних ASCs – на належність культивованих фібробластоподібних клітин жирової тканини до мезенхімальних стромальних клітин вказують їх морфологічні

ознаки в умовах моношарового культивування та характеристика імунофенотипу клітинної суспензії;

➤ контроль зовнішнього вигляду культур проводиться прижиттєво за допомогою інвертованого мікроскопа. Моношар субкультивованих мезенхімальних ASCs повинен бути сформований з переважно веретеноподібних сплюснених клітин з прозорою цитоплазмою та невеликим округлим ядром, які в міру заповнення дна культуральної ємності схильні утворювати характерний малюнок у вигляді «потоків» та «завитків»;

➤ для визначення фенотипу отриманого моношару суспензію культивованих клітин забарвлюють моноклональними антитілами до CD29, CD45, CD105, CD34, CD38, CD44, CD73, CD90. Клітинний склад суспензії мезенхімальних ASCs повинен характеризуватись імунофенотипом CD29+, CD45+, CD105+, CD34+, CD38+, CD44+, CD73+, CD90+;

➤ визначення колонієутворюючої здатності мезенхімальних ASCs проводять шляхом посіву з щільністю 4–40 клітин/см² і культивують протягом 14 діб. Після закінчення зазначеного періоду культури фіксують, фарбують азуром-еозином та підраховують загальну кількість колоній. Ефективність колонієутворення визначають як відношення кількості утворених колоній до кількості посіяних клітин.

6.2.2. Отримання стовбурових клітин із кісткового мозку людини

1. Отримання первинної культури BMSCs. Суспензію клітин кісткового мозку отримують вимиванням кісткових циліндрів середовищем 199 з подальшим центрифугуванням. Отриманий осад клітин ресуспендують у повному ростовому середовищі α -MEM, доповненому 2мМ L-глутаміну, 13 % ембріональної сироватки великої рогатої худоби, 50 од./мл пеніциліну та 50 мкг/мл стрептоміцину і висівають у культуральні флакони з концентрацією 1,2–1,8 млн ядровмісних клітин в 1 мл культурального середовища для ініціації первинної культури BMSCs. Кількість ядровмісних клітин визначають стандартним підрахунком у камері Горяєва. Культивування проводять при 27 °С, 5 % CO₂ та 95 % вологості. Через 48 годин культивування здійснюють першу заміну середовища. Далі середовище замінюють через кожні 3 доби. У цих умовах формується первинна культура BMSCs, що містить характерні колонії фібробластоподібних клітин. На 10–12 добу культивування колонії знімають за допомогою суміші 0,02 %-вого розчину Версену та 0,025 %-вого розчину трипсину (співвідношен-

ня 4 : 1). Після відділення клітини переносять у ємність, що містить сироватку великої рогатої худоби, для інактивації трипсину. Після центрифугування клітини пересівають для субкультивування та експансії в умовах 27 °С, 5 % CO₂ та 95 % вологості.

2. Експансія та культивування мезенхімальних BMSCs. Після досягнення культурою 70 % конфлуенту проводять пасажування моношару та подальше культивування мезенхімальних SC. Моношар промивають 0,02 %-вим розчином Версена та 0,025 %-вим розчином трипсину (співвідношення 4 : 1). Після відділення клітини переносять у ємність, що містить сироватку великої рогатої худоби, для інактивації трипсину. Суспензію відокремлених клітин центрифугують. Надосадну рідину видаляють, а осад ресуспендують у поживному культуральному середовищі. Концентрацію клітин визначають у гемоцитометрі, і після розведення культуральним середовищем розсіюють у пластикові матраци з коефіцієнтом 1 : 3. Культивування проводять при 27 °С, 5 % CO₂ та 95 % вологості.

Швидкість формування 70 % субконфлуентного моношару за зазначених умов – 5 діб. Для напрацювання кількості клітин, достатньої для подальшого застосування (щонайменше 5 млн), потрібно 3–5 пасажів. Отримана культура клітин кісткового мозку являє собою поліклональну культуру мезенхімальних SC, що характеризуються здатністю до клоногенного росту, специфічним імунофенотипом та мультилінійним диференціувальним потенціалом.

3. Підготовка культивованих мезенхімальних BMSCs до використання. Відділення клітин від дна флаконів проводять за допомогою 0,02 %-вого розчину Версена та 0,025 %-вого розчину трипсину (співвідношення 4 : 1). Суспензію клітин об'єднують із розчином Хенкса з 2 % сироватки великої рогатої худоби до концентрації 1–2×10⁶ клітин/мл. Підготовлену суспензію передають до використання у герметичному стерильному контейнері або піддають кріоконсервуванню.

4. Кріоконсервування культивованих мезенхімальних BMSCs. Процес кріоконсервування проводять аналогічно до процесу кріоконсервування ASCs.

5. Контроль культивованих мезенхімальних BMSCs проводять аналогічно контролю ASCs.

Дані про виділення та застосування SC з'являються постійно. Останнім часом роботам щодо клінічного застосування SC присвячені тисячі наукових досліджень.

6.2.3. Приклади комерційних препаратів, що містять стовбурові клітини

В даний час регенераційна медицина, що використовує SC різного походження, активно розвивається. Існує можливість придбання препаратів SC у комерційних структур. Нижче наведено комерційні препарати на основі SC, які пропонуються як для терапії, так і для наукових досліджень.

Компанія «Bone Therapeutic» (Бельгія) пропонує препарат «ALLOB», що отримується з кісткового мозку здорових донорів і перетворює їх на кісткоутворюючі клітини. Продукт знаходиться на проміжній стадії клінічних випробувань для пацієнтів з важкими переломами великої гомілкової кістки. «ALLOB» є аlogenним препаратом, отриманим від здорових донорів, та виробляється з можливістю масштабування.

Компанія «Innovita Research» пропонує мезенхімальні SC із пуповинної крові. Усі виробничі етапи проводяться відповідно до вимог GMP. Препарати готові до внутрішньовенної інфузії, випускаються в ємності об'ємом 24 мл і вводяться в необхідній концентрації в розчині ДМСО-декстран з 15 %-вим розчином альбуміну людини. У складі продукту міститься 100 млн. мезенхімальних SC (CD45, CD13+, CD90+, CD105+). Продукт заморожений. Життєздатність препарату після розморожування – 79 %. Продукт пропонується лише для наукових досліджень.

Із мезенхімальних SC отримано низку продуктів:

- для відновлення шкіри – регенерація фібробластів та кератиноцитів: «Apligraf[®]» (США), «JACE[®]» (Японія), «Holdem[®]», «Cure-Skin[®]», «Kaloderm[®]» (Південна Корея);
- для відновлення суглобів та кісток: «MACI[®]», (США) – технологія одержання передбачає аутологічне культивування хондроцитів на свинячій колагеновій мембрані, продукт складається з власних (аутологічних) клітин хворого, які вирощуються і поміщаються на плівку, яка імплантується в область пошкодження хряща, проникає в тканину, забезпечує зниження больових відчуттів протягом 5 років; «Spherox[®]», «JACC[®]» (Японія), «Catogen[®]» (Австралія), «Chondron[®]», «Cartistem[®]» (Південна Корея);
- для відновлення серцевого м'яза – «HeartSheet[®]» (Японія) – аутологічні скелетні міобласти, які застосовуються при тяжкій серцевій недостатності;

➤ «Hearticellgram[®]-AMI» (Південна Корея) – являє собою трансплантацію аутологічних SC, вирощених із власних клітин кісткового мозку пацієнта та введених у коронарні судини. Ефективність – близько 6 %.

Мезенхімальні SC являють собою мультипотентні клітини, отримані з серця, периферичної крові, пуповинної крові, м'язів, легень, кишечника, губчастих кісток, нирок, печінки, підшлункової залози та інших тканин. Використання продуктів із мезенхімальних SC дозволяє розвивати регенераційну медицину та використовувати ці продукти для лікування серцевої недостатності, хронічних ран, регенерації зубів, нейродегенеративних захворювань. На моделі Альцгеймера у мишей трансплантація BMSCs приводила до зниження відкладень β-амілоїду. З'являються роботи, присвячені можливості лікування системної червоної вовчанки, травм спинного мозку, церебрального паралічу, ревматоїдного артриту, хвороби Крона, діабету 2-го типу.

Водночас існує думка, що незважаючи на оптимістичні повідомлення про результативність ін'єкцій SC в уражену зону міокарда, які вперше з'явилися 20 років тому, в даний час ця ідея є досить сумнівною. В останні роки відзначається практично повна відсутність позитивного ефекту цієї процедури при серйозних ризиках ускладнень. На думку Агладзе К. И. (2019), існують позитивні результати вирощування відносно невеликих елементів міокарда, таких як синусовий вузол.

Проте розвиток біотехнологічних досліджень із різним типом SC дозволяє сподіватися в майбутньому на ефективність використання регенеративної медицини під час лікування важких захворювань різної етіології.

6.3. Екзосоми у регенераційній медицині. Терапевтичний потенціал

Екзосоми – позаклітинні везикули (60–200 нм), що секретуються клітинами різного походження. Екзосоми вперше були описані у 1983-му році. Наприкінці 1990-х років було показано, що екзосоми беруть участь у регуляції імунних реакцій організму людини. У 2007-му році було показано, що численні міРНК і мРНК переносяться екзосомами у клітини мішені. При вивченні культури ембріональних SC було показано, що екзосоми здатні забезпечити горизонтальне перенесення мРНК між клітинами.

Утворенню екзосом передують «вп'ячування» мікродоменів плазматичної мембрани, покритих клатрином (клатрин – внутрішньоклітинний білок, основний компонент оболонки бульбашок, що утворюються при рецепторному ендо-

цитозі). Потім ендосомний комплекс сортування забезпечує перетворення бульбашок мембрани на ранні ендосоми, які транспортують убіквітиновані продукти (убіквітин – невеликий консервативний білок еукаріотів, що бере участь у регуляції процесів внутрішньоклітинної деградації інших білків, а також у модифікації їх функцій; він присутній майже у всіх тканинах). Потім відбувається повторне «вп'ячування» в ранні ендосоми і при цьому утворюються інтралюмінальні бульбашки, які накопичуються і дозрівають всередині ендосом – мультивезикулярні тільця. Мультивезикулярні тільця або перетворюються на лізосоми, де відбувається деградація їх вмісту, або зливаються з плазматичною мембраною (і в такому випадку їх називають екзоцитарними мультивезикулярними тільцями) при цьому інтралюмінальні бульбашки називають екзосомами, які вивільняються у позаклітинний простір.

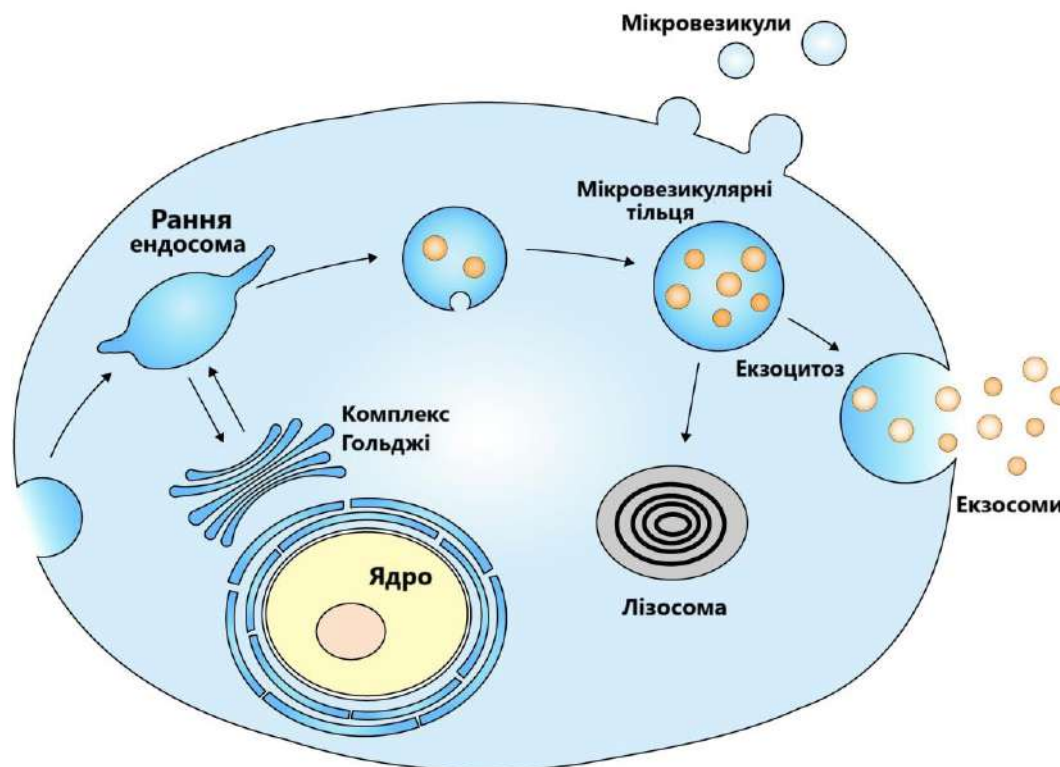


Рисунок 6.3 – Процес утворення екзосом [Lyu et al, 2020]

Вивчення складу екзосом показало присутність у них таких компонентів:

- ✓ білкових компонентів, які відображають їх походження з ендосом і відрізняються в залежності від типу клітин, з яких вони утворилися;
- ✓ нуклеїнових кислот: екзосоми містять значну кількість міРНК і мРНК, а також можуть містити ДНК, які вони можуть переносити з клітини в клітину;

✓ ліпідні компоненти: екзосоми збагачені холестерином, сфінгомієліном, глікосфінголіпідами, фосфатидилсерином, фосфатидилхоліном.

Ліпіди виконують не тільки структурну функцію в екзосомальних мембранах, але й відіграють важливу роль у формуванні екзосоми через вивільнення у позаклітинне середовище. Особлива увага приділяється ефірним ліпідам (відносно маловивчений тип ліпідів), які беруть участь у транспортуванні через мембрани і містяться у великій кількості в деяких екзосомах. Обговорюється роль фосфатидилінозитів – мембранних фосфоліпідів, які допомагають регулювати динаміку мембранного вивільнення екзосом, і як цей процес може бути пов'язаний з секреторною аутофагією.

Екзосоми є функціональною ланкою для зв'язку з іншими клітинами. Екзосоми – це транспортні контейнери, які переносять біологічно активний вміст («вантаж»), наприклад, білки, генетичний матеріал та інші молекули. Ці контейнери переміщуються від вихідних клітин, проходячи через кровоносні судини або інші рідини організму, до клітин-мішеней. Екзосоми проникають через клітинні мембрани та впливають на різні органели всередині клітини-мішені. Всі типи клітин здатні продукувати екзосоми, які відрізняються між собою тим «вантажем», який вони переносять. Екзосоми, які продукуються мезенхімальними SC, містять біологічно активні речовини, отримані з цих клітин, такі як протизапальні цитокіни, фактори росту, мРНК, міРНК та інші молекули. Основним застосуванням екзосом із мезенхімальних SC є лікування запальних процесів. Екзосоми є частинками-месенджерами, які відповідають за зв'язок між клітинами. Ці клітини-месенджери здатні вивільняти фактори росту та інші біологічно-активні речовини, переносити генетичну інформацію та білки у клітини всього організму, створюють шляхи зв'язку між клітинами.

Екзосоми діляться на природні та штучні залежно від того, чи були вони штучно модифіковані. Серед природних виділяють екзосоми тваринного та рослинного походження. Оскільки екзосоми продукуються як у нормальних, так і у пухлинних клітинах, екзосоми тваринного походження розділяють на нормальні та пухлинні. Майже всі типи нормальних клітин можуть продукувати екзосоми: ендотеліальні клітини пуповинної вени людини, мезенхімальні SC, T і B-клітини, макрофаги, дендритні клітини, природні кілери. Наприклад, мезенхімальні SC являють собою плюрипотентні SC, здатні до самооновлення і різнопланового диференціювання. Вони здатні не тільки адаптуватися до мікрооточення пухлини, але також мають потужну паракринну активність і секретують велику кількість екзосом. Дослідження показали, що екзосоми, які містять пак-

ліаксел, мають значну інгібуючу дію на проліферацію клітинної лінії раку підшлункової залози людини *in vitro* і можуть виконувати функцію носіїв лікарських засобів. Крім того показано, що екзосоми із мезенхімальних SC приймають участь у розвитку багатьох захворювань. Вони не тільки беруть участь у процесах відновлення та пошкодження тканин, але й виявляють певну терапевтичну дію при серцево-судинних захворюваннях (таких як інфаркт міокарда), неврологічних захворюваннях, захворюваннях печінки.

Використання екзосом дозволяє розширити арсенал терапевтичних продуктів завдяки створенню ефективної системи доставки ліків – «drug delivery system». Проведені в останні роки різнопланові дослідження дозволили розробити різні типи екзосомальних drug delivery system з використанням кількох стратегій: як фізичних, так хімічних процесів і підходів. Багато активних фармацевтичних субстанцій або біологічно активних речовин були або інкапсульовані в екзосоми, або з їх допомогою проводили модифікацію поверхні екзосоми, що продемонструвало суттєвий терапевтичний ефект при різних захворюваннях. Крім того, удосконалена структура, так звана «гібридна екзосома», була також успішно використана для покращення терапевтичного ефекту. Запропоновано гібридні екзосоми, отримані шляхом злиття наночастинок з екзосомами, наприклад, гібридна структура, отримана внаслідок злиття екзосом і ліпосом. Ці гібридні екзосоми були розроблені для отримання синергетичного ефекту при використанні у різних методах лікування. Для виробництва гібридних екзосомальних систем можна використовувати ряд методів, у тому числі екструзію, обробку ультразвуком, метод заморожування/відтаювання та ін. Екзосоми та їх гібридні структури продемонстрували такі переваги, як висока таргетність, нетоксичність та біосумісність.

Для того, щоб використання екзосом стало можливим, необхідний комплекс методів культивування, виділення та очищення частинок. Екзосоми очищають і переробляють у концентровану форму за допомогою ультрафільтрації або диференціального центрифугування з подальшим ультрацентрифугуванням у сахарозі.

Для простої очистки екзосом доступні два методи диференційного центрифугування: у першому випадку використовують центрифугування, у другому – наномембранний концентратор.

Навантажені АФІ екзосоми були отримані за допомогою *фізичних процесів, хімічної модифікації або методів клітинної інженерії*. Що стосується методів фізичної інкапсуляції (електропорація, обробка ультразвуком, екструзія, ме-

тод заморожування/відтаювання), то вони є простими методами і дозволяють інкапсулювати високомолекулярні речовини. Водночас необхідно враховувати умови проведення технологічних процесів, оскільки ці методи можуть призводити до порушення цілісності екзосом і знижувати ефективність інкапсуляції. Хімічна модифікація приводить до мінімальних змін структури екзосом. Ефективним є використання методів клітинної інженерії. Методи інкапсуляції необхідно обирати залежно від структури препарату. Гідрофобні АФІ можуть проникати у екзосоми шляхом змішування та за рахунок гідрофобної взаємодії між лікарським засобом та ліпідним бішаром екзосом. Однак гідрофільні АФІ не можуть проникати через ліпідний бішар і у такому випадку можна використовувати хімічні реакції між АФІ та поверхнею екзосом. Для гідрофільних АФІ можна також використовувати методи електропорації, обробки ультразвуком або використання тиску.

Характеристику екзосомальних препаратів проводять методом електронної мікроскопії або за допомогою виявлення маркерів екзосом типів CD9, CD71, CD80, CD81, тетроспанінів, білків теплового шоку та ін.

На відміну від терапії SC, екзосомальна терапія не вимагає використання донорських клітин в організмі. Натомість екзосоми виділяються з донорських мезенхімальних SC. Всередині екзосом містяться ліпіди, мРНК, міРНК, сигнальні цитокіни та білки. Екзосомальну терапію можна проводити за допомогою внутрішньовенних ін'єкцій або прямої ін'єкції в місце лікування.

Екзосоми та стовбурові клітини. Мезенхімальні SC здатні до самооновлення та можуть бути виділені з різних тканин. Вони широко представлені у клінічних випробуваннях завдяки їхнім різноманітним біологічним функціям, у тому числі диференціювання, відновлення тканин, протизапальні та імуномодулюючі властивості. Екзосоми, отримані з мезенхімальних SC, вперше досліджені у 2010-му році. Показана їхня здатність продукувати більшу кількість екзосом, ніж інші клітини.

Екзосоми беруть участь у міжклітинних комунікаціях і ряд дослідників припускає, що вони є паракринними факторами мезенхімальних SC. Паракринні фактори – це різні групи гормонів, факторів росту, цитокінів та інших сполук, які здатні впливати на сусідні клітини. Екзосоми секретуються багатьма типами клітин, включаючи Т і В-клітини, ракові клітини та SC.

Розглянемо кілька прикладів використання екзосом як drug delivery system. В останні роки проведені клінічні випробування екзосом як носіїв терапевтичних агентів. Проведено оцінку безпеки CD24-екзосом у пацієнтів з інфе-

кцією COVID-19. Препарат являє собою біологічний терапевтичний агент на основі екзосом, які несуть CD24.

CD24, або переносник сигналу CD24 – це глікопротеїн, який у людини кодується геном CD24. CD24 складається з короткої пептидної частини розміром 27–30 амінокислотних залишків і ГФІ-якоря (глікозилфосфатидилінозіол – глікопептид, який може приєднуватися до С-кінця білка в процесі посттрансляційної модифікації), який утримує його в клітинній мембрані. CD24 – найважливіший компонент при більшості видів пухлин людини, він відіграє важливу роль у контролі гомеостатичної проліферації Т-клітин, може регулювати запальний процес в організмі.

У лютому 2022 року в Ізраїльському клінічному центрі ім. Сураскі проф. Надиром Арбером було завершено дослідження унікального препарату проти коронавірусної хвороби. У 1-ій фазі клінічного дослідженні (для оцінки безпечності) брали участь пацієнти з помірною та тяжкою інфекцією COVID-19 з цитокіновим штормом у легенях, який є основною причиною погіршення, що призводить до летального результату. Досліджуваний препарат являв собою екзосоми EXO-CD24 (природні нанорозмірні везикули, секретовані клітинами людини), виділені з клітин 293-TREx™, які були сконструйовані для надекспресії CD24. Досліджуваний препарат у 0,9 % розчині натрію хлориду розпилювали шляхом інгаляції протягом 5 днів. 29 з 30 пацієнтів, які отримували лікування EXO-CD24, були виписані додому. Розроблений препарат – засіб цільової терапії. Перевагою препарату є не системне введення, а введення безпосередньо в легені, де він пригнічує шляхи виникнення цитокінового шторму і перешкоджає множинному виробленню цитокінів.

Клінічні дослідження, присвячені створенню препаратів для лікування пацієнтів віком 18–75 років з інфекцією COVID-19, проводяться в Індонезії (Джакарта). Розробники виходили з того, що всі типи клітин можуть продукувати екзосоми, але їх відрізняє внутрішній вміст. Екзосоми, які продукуються мезенхімальними SC, містять біологічно активний «вантаж» отриманий з цих клітин, а саме: протизапальні цитокіни, фактори росту, мРНК, міРНК. Клітини-мішені являють собою клітини імунної системи, інфіковані клітини та клітини-попередники з інфікованих органів. На імунні клітини-мішені протизапальні цитокіни діють як імуномодулятори, полегшуючи гіперзапалення. В інфікованих клітинах міРНК запобігає реплікації вірусу шляхом інгібування експресії РНК вірусу SARS-CoV-2. У клітинах-попередниках легень та інших інфікованих органах фактори росту працюють, щоб стимулювати процеси синтезу біл-

ка, які направлені на регенерацію органів. У цьому дослідженні екзосоми, які продукуються мезенхімальними SC, тестуються як адьювант у комплексі зі стандартними ліками при терапії COVID-19. Екзосоми вводять внутрішньовенно двічі на день на 1-ий, 7-ий і 14-ий день. У дослідженні, запланованому на період з 1 липня 2021 року по 31 грудня 2022 року, приймають участь 60 учасників з помірною важкістю перебігу COVID-19.

Останнім часом клінічні випробування препаратів на основі екзосом набирають обертів (табл. 6.1). Предметом цих досліджень є екзосоми, виділені з трьох основних джерел: дендритних клітин, мезенхімальних SC та пухлинних клітин пацієнта.

Таблиця 6.1 – Напрямки клінічних досліджень екзосомальних препаратів

Захворювання	Джерело екзосом	Спосіб введення	Кіл-ть пацієнтів	Фаза клінічних досліджень	Рік проведення
Меланома	Незрілі дендритні клітини	п/шк, в/шк	15	1 фаза	2000
Недрібноклітинний рак легень	Зрілі дендритні клітини, індуковані rIFN- γ	в/шк	22	2 фаза	2010
Хронічне захворювання нирок	Алогенні мезенхімальні SC	в/в, в/а	40	2/3 фаза	2014
Цукровий діабет 1-го типу	Алогенні мезенхімальні SC	в/в	14	1 фаза	2014
Злоякісний асцит та плеврит	Пухлинні клітини	інфузійно	30	2 фаза	2013
Злоякісний плеврит	Пухлинні клітини	в/в	90	2 фаза	2016
Бронхолегенева дисплазія	Алогенні мезенхімальні SC	в/в	18	1 фаза	2019
Гострий ішемічний інсульт	Алогенні мезенхімальні SC	в/в	5	1/2 фаза	2019
Метастатичний рак підшлункової залози	Алогенні мезенхімальні SC	в/в	28	1 фаза	2020

Захворювання	Джерело екзосом	Спосіб введення	Кількість пацієнтів	Фаза клінічних досліджень	Рік проведення
Пухлина товстої кишки	Рослинне походження	<i>per os</i>	35	1 фаза	2011
Мукозит порожнини рота	Рослинне походження (виноград)	<i>per os</i>	60	1 фаза	2012

Примітка. в/шк – внутрішньошкірно, п/шк – підшкірно, в/в – внутрішньовенно, в/а – внутрішньоартеріально; *per os* – перорально.

Основна маса робіт з вивчення екзосом у складі drug delivery system проводиться у доклінічних дослідженнях як *in vitro*, так і *in vivo*. Отримано обнадійливі результати при лікуванні серцево-судинних, ракових, шкірних захворювань, нейрорегенерації, захворювань кісток, очей, алопеції, Альцгеймера та ін. Розпочато різнопланові дослідження гібридних екзосом. Гібридні drug delivery system також досліджувалися на предмет лікування раку. Наприклад, синтезували гібридну структуру на основі екзосом, отриманих методом генної інженерії, і термочутливих ліпосом, із інкапсульованим протипухлинним агентом для терапії раку – доцетаксел. Екзосоми виділяли з фібробластів, що експресують CD47 і гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор. Гібридні структури були отримані методом заморожування/відтаювання. Автори відмітили ефективність препарату при лікуванні раку у мишей. З метою підвищення ефективності протиракової терапії можливо завантаження у екзосоми кількох АФІ, що сприяє покращенню фармакокінетики та зниженню побічних ефектів. Як АФІ використовують різні протипухлинні препарати: доцетаксел, паклітаксел, доксорубіцин та ін.

Підсумок. Розробка систем доставки лікарських препаратів один із найважливіших напрямів сучасної фармації. Безперечним успіхом медичної науки сьогодні є група лікарських препаратів на основі наночастинок, зокрема ліпосом. Сьогодні світова фармацевтична промисловість виробляє більше 50-ти ліпосомальних лікарських форм, і їх кількість постійно збільшується. Успіхом ліпосомальних технологій є отримання вакцин та ад'ювантів на основі ліпосомальних наночастинок. Створення лікарських засобів на основі екзосом є наступним кроком на шляху створення нового покоління drug delivery system. Екзосоми та їх гібридні структури показали ряд переваг, таких як: висока направле-

ність та специфічність терапевтичної дії, нетоксичність продуктів та висока біосумісність.

Технології отримання та інкапсуляції екзосом близькі до ряду технологічних етапів виробництва ліпосом, таких як обробка ультразвуком, заморожування/відтаювання, екструзія та ін. Крім того для стабілізації цих двох видів частинок застосовується кріоконсервація та сублимація із застосуванням кріопротекторів, наприклад, дисахарів (трегалози чи сахарози). Розробка та застосування гібридів екзосом і ліпосом також підтверджує перспективність обох форм. Водночас технології отримання екзосом, їх гібридів та методів інкапсуляції АФІ в екзосоми потребують значного доопрацювання, оскільки інкапсуляція АФІ в екзосоми обмежена. Крім того, необхідно зменшити пошкодження цілісності мембрани екзосом у ході технологічних процесів. Відкритим питанням сьогодні є стандартизація методів культивування клітин для отримання екзосом, розробка доступних методів характеристики готового препарату. Допоки ці питання не будуть вирішені виникають труднощі масового виробництва та використання препаратів екзосом та їх гібридів у клінічній практиці.

Дані доклінічних та клінічних випробувань екзосомальних препаратів демонструють перспективність розвитку цього напрямку. Водночас привертає увагу той факт, що розпочаті у 2000-му році різнопланові клінічні випробування, що тривають до сьогодні, досі не привели до створення комерційних препаратів. Проте існує надія на можливість масового виробництва як самих екзосом, так і drug delivery system на їх основі в майбутньому.

Контрольні запитання

1. Якими питаннями займається регенеративна медицина?
2. Дайте класифікацію стовбурових клітин за здатністю до регенерації.
3. Дайте класифікацію стовбурових клітин за здатністю до диференціювання.
4. Дайте класифікацію стовбурових клітин за стадіями їх еволюційного розвитку.
5. У чому переваги та недоліки ембріональних стовбурових клітин?
6. У чому переваги та недоліки фетальних стовбурових клітин?
7. Назвіть види постнатальних стовбурових клітин. У чому їх переваги та недоліки?
8. Назвіть можливі джерела одержання мезенхімальних стовбурових клітин. Які з них мають найбільше практичне значення?

9. Опишіть процес одержання стовбурових клітин із жирової тканини людини.
10. Опишіть процес одержання стовбурових клітин із кісткового мозку людини.
11. Які продукти на основі стовбурових клітин представлені на ринку?
12. Які клітини є продуцентами екзосом?
13. Навести класифікацію екзосом, їхню структуру та склад.
14. Опишіть основні види drug delivery system на сонові екзосом.

Список джерел інформації

1. Агладзе К. И. Клеточные технологии в регенеративной медицине сердца. Основные проблемы и пути развития / К. И. Агладзе // Альманах клинической медицины. – 2019. – Т. 47, № 7. – С. 623–629.
2. Фриденштейн А. Я. Стволовые остеогенные клетки костного мозга / А. Я. Фриденштейн // Онтогенез. – 1991. – Т. 22, № 2. – С. 189–197.
3. Получение и криоконсервирование культивированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека : методические рекомендации. – Харьков : Институт проблем криобиологии и криомедицины, 2009. – 15 с.
4. Получение и криоконсервирование культивированных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека : методические рекомендации. – Харьков : Институт проблем криобиологии и криомедицины, 2009. – 15 с.
5. Чапленко А. А. Актуальные направления применения клеточной терапии в регенеративной медицине / А. А. Чапленко, И. Д. Хорольский, И. В. Мельников, В. А. Меркулов // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика лечение. – 2020. – Т. 20, № 2. – С. 82–88.
6. Rajabzadeh N. Stem cell-based regenerative medicine / N. Rajabzadeh, E. Fathi, K. Farahzadik // Stem cell Investigation. – 2019. – Vol. 6, No. 19. – 11 p. – Режим доступа : <https://doi.org/10.21037/sci.2019.06.04>
7. Ly X. Umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for regenerative treatment of rheumatoid arthritis: opportunities and challenges / X. Ly, L. Wang, X. Zou, S. Huang // Drug Design, Development and Therapy. – 2021. – Vol. 15. – P. 3927–3936.
8. Viroso F. J. Mesenchymal stem cells in homeostasis and systemic diseases, hypothesis evidences and therapeutic opportunities / F. J. Viroso, N. Eizo, L. Costa

et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20, No. 15. – P. 3738–3744.

9. Ly Y. Mesenchymal stem cells derived exosomes: a possible therapeutic strategy for osteoporosis / Y. Ly, D. Sin, W. Xie et al. // *Current Stem Cell Research & Therapy Journal*. – 2018. – Vol. 13, No. 5. – P. 362–368.

10. Артемьев А. А. Липофиллинг с обогащением жировыми стволовыми клетками / А. А. Артемьев // *Пластическая хирургия и косметология*. – 2010. – № 2. – С. 205–207.

11. Петренко А. Ю. Стромальные клетки костного мозга, жировой ткани и кожи человека в ходе экспансии проявляют иммунофенотип и дифференцировочный потенциал мезенхимальных стволовых клеток / А. Ю. Петренко, Ю. А. Петренко, Н. Г. Скоробогатова и др. // *Трансплантология*. – 2006. – Т. 10, № 1. – С. 84–86.

12. Петренко А. Ю. Стволовые клетки из жировой ткани / А. Ю. Петренко, Э. Н. Иванов, Ю. А. Петренко // *Биотехнология*. – 2008. – Т. 1, № 4. – С. 39–48.

13. Engen S. New Horizons of the Regenerative Medicine Space in Japan : [Электронный ресурс] / S. Engen. – 2016. – Режим доступа : <https://www.locustwalk.com/new-horizons-of-the-regenerative-medicine-space-in-japan/>

14. MacDonald A. Cell Potency: Totipotent vs Pluripotent vs Multipotent Stem Cells [Электронный ресурс] / A. MacDonald. – *Technology Networks*, 2018. – Режим доступа : <https://www.technologynetworks.com/cell-science/articles/cell-potency-totipotent-vs-pluripotent-vs-multipotent-stem-cells-303218>

15. Macrin D. Eminent Sources of Adult Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Imminence / Macrin D., Joseph J. P., Pillai A. A., Devi A. // *Stem cell reviews and reports*. – 2017. – Vol. 13, No. 6. – P. 741–756.

16. Lyu H. The Role of Bone-Derived Exosomes in Regulating Skeletal Metabolism and Extrasosseous Diseases / H. Lyu, Y. Xiao, Q. Guo et al. // *Frontiers in cell and developmental biology*. – 2020. – Vol. 8. – Article 89. – Режим доступа : <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00089>

17. Zhang Y. Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications / Y. Zhang, J. Bi, J. Huang et al. // *International journal of nanomedicine*. – 2020. – Vol. 15. – P. 6917–6934.

18. Antimisiaris S. G. Exosomes and Exosome-Inspired Vesicles for Targeted Drug Delivery / S. G. Antimisiaris, S. Mourtas, A. Marazioti // *Pharmaceutics*. –

2018. – Vol. 10, № 4. – Article 218. – Режим доступа :
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040218>

19. Lee J. Exosome-based drug delivery system and their therapeutic applications / J. Lee, J. H. Lee, K. Chakraborty // RSC Adv. – 2022. – Vol. 12. – P.18475–18492.

20. Shimon M. B. The Big Potential of Small Particles: Lipid-Based Nanoparticles and Exosomes in Vaccination / M. B. Shimon, S. Shapira, J. Seni, N. Arber. // Vaccines. – 2022. – Vol. 10, № 7. – Article 1119.
<https://doi.org/10.3390/vaccines10071119>

Навчальне видання

**КРАСНОПОЛЬСЬКИЙ Юрій Михайлович
ПИЛИПЕНКО Дар'я Михайлівна**

**ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ:
СЬОГОДЕННЯ ТА МАЙБУТНЄ**

Навчальний посібник
для студентів спеціальності «Біотехнології та біоінженерія»

Відповідальний за випуск проф. *Близнюк О. М.*
Роботу до видання рекомендував проф. *Циганков О. В.*
В авторській редакції

План 2022 р., поз. 88

Підп. до друку 25.10.22. Формат 60×84 1/16. Папір офсетний.
Друк цифровий. Гарнітура шкільна. Ум. друк. арк.8,3.
Наклад 50 прим. Зам. № 86. Ціна договірна.

Видавець і виготовлювач ТОВ «Друкарня Мадрид»
61024, м. Харків, вул. Гуданова, 18. Тел.: 0800 33 67 62
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи Серія ДК, № 4399 від 27.08.2012 р.
www.madrid.in.ua info@madrid.in.ua