

ciwprątkowe; działają bakteriobójczo na *Myc. avium* w niższych stężeniach niż formaldehyd lub fenol.

3. Duża aktywność przeciwbakteryjna, dobra rozpuszczalność w wodzie oraz brak zagrożenia dla środowiska ze strony omawianych preparatów sprawia, że po uruchomieniu produkcji na skalę przemysłową mogą one znaleźć szerokie zastosowanie zarówno w weterynarii, jak i w przemyśle spożywczym.

#### Piśmiennictwo

1. Bartoś J., Lebduška J.: Veterinařstvi 7, 462, 1967.
2. Fleming H. C.: Zentbl. Bakt. ParasitKde I 179, 97, 1984
3. Heinze W.: Mh. Vet.-Med. 34, 212, 1979.
4. Hussetti S. N., Ruby K. R.: Vet. Res. 98, 257, 1976.
5. Karpiński T., Żórawski C., Skwarek P.: Medycyna Wet. 39, 562, 1983.

6. Krzywicka H.: Roczniki PZH 21, 595, 1970.
7. Krzywicka H.: Roczniki PZH 21, 427, 1970.
8. Krzywicka H., Sądowska B.: Roczniki PZH 22, 99, 1971.
9. Melicherickova V.: Csiká Epidem. Mikrobiol. Immunol. 30, 105, 1981.
10. Měrka V., Sita E., Zihes V.: J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immun. 9, 220, 1965.
11. Měrka V., Dvořák J.: J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immun. 12, 115, 1968.
12. Pavlas M.: Vet. Med. Praga 16, 193, 1971.
13. Pavlas M.: Cska Epidem. Mikrobiol. Immunol. 16, 282, 1967.
14. Steiger A.: Desinfektion. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1986.
15. Wofasteril — Opracowanie informacyjne instruktażowe. Staatliches Veterinärmedizinisches Prüfungsinstitut, Berlin, NRD, 1975.
16. Żórawski C., Skwarek P.: Niektóre środki dezynfekcyjne produkcji krajowej ze szczególnym uwzględnieniem ich prątkobójczego działania. IWet., Puławy, 1985.

Adres autora: prof. dr hab. Cezariusz Żórawski, ul. 20-lecia PRL 6 m. 16, 24-100 Puławy

ZDZISŁAW GLIŃSKI, JAN BUCZEK

## Kompleks immunostymulacyjny – ISCOM

Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego  
AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Jednym z największych osiągnięć immunologii było wprowadzenie do praktyki metody swoistego zapobiegania chorobom zakaźnym przy użyciu szczepionek. Jakkolwiek szczepienia ludzi przeciwko ospie praktykowano w Chinach jeszcze przed naszą erą, to dopiero wprowadzenie szczepień ochronnych przeciwko ospie przez Jennera w 1798 r., a następnie opracowanie przez Pasteura ogólnych zasad zwalczania chorób zakaźnych poprzez uodpornianie czynne pełnozjadliwymi, osłabionymi lub zabitymi drobnoustrojami stworzyło podstawy nowoczesnej immunoprofilaktyki i immunoterapii (23, 53).

Większość dotychczas stosowanych szczepionek indukuje w organizmie ludzi i zwierząt odporność, która chroni głównie przed wystąpieniem klinicznych postaci choroby. Rzadko natomiast szczepienia ochronne chronią organizm przed zakażeniem. Pomimo postępu w produkcji szczepionek nadal nie udało się opracować skutecznych immunopreparatów przeciwko niektórym chorobom zakaźnym o przebiegu przewlekłym, a także wywołanym przez wirusy powolne. Wskazują na to dobitnie próby podejmowane w najbardziej renomowanych laboratoriach nad szczepionką przeciwko wirusom HIV1 i HIV2 oraz przeciwko chorobom scrapie i maedi-visna (25).

Wyjaśnienie roli poszczególnych komponent zarazków w indukcji odporności związane z rozwojem immunochemii oraz postęp w biologii molekularnej, a zwłaszcza obserwowany w ostatnich latach szybki rozwój inżynierii genetycznej, stworzył teoretyczne podstawy do opracowania nowych generacji szczepionek. Stało się to możliwe zwłaszcza dzięki identyfikacji genów odpowiedzialnych za syntezę immunologicznie czynnych komponent drobnoustrojów, a także dzięki poznaniu roli, jaką odgrywają poszczególne składowe antygeny w procesach immunogenezy. Badania nad antygenami ochronnymi (protective antigens) przyczyniły się do opracowania szczepionek pozbawionych substancji balastowych, jakimi są: materiał genetyczny zarazka oraz jego składniki o działaniu alergizującym i toksycznym, co wyeliminowało efekty działania ubocznego wielu szczepionek (4, 19, 24). Wprowadzenie np. metod frakcjonowania wirusów z rodziny *Herpesviridae* w gradiencie sacharozy doprowadziło do izolowania czterech głównych frakcji, z których glikoproteiny wirusowe są najsilniejszymi immu-

nogenami i praktycznie są pozbawione działania alergizującego. Stosując metody rozdziatu elektroforetycznego otrzymano z wirusa choroby Aujeszky cztery immunodominujące proteiny, z których sporządzono skuteczną szczepionkę z podjednostek (49). Pierwszą szczepionkę z podjednostek zastosowaną w medycynie jest szczepionka przeciwko grypie (19, 24). Szczepionka ta pozbawiona działania toksycznego okazała się jednak w praktyce mało skuteczna.

Cel jakim jest uzyskanie optymalnej prezentacji epitopów antygenów, która zapewni efektywną indukcję odpowiedzi komórkowej i humoralnej starano się osiągnąć też poprzez technologie rekombinacji DNA, syntezę polipeptydów i użycie do produkcji szczepionek inaktywowanych wirionów (53), a także poprzez wprowadzanie do szczepionek adjuwantów (3, 8, 14) i tworzenie nowych struktur przestrzennych (wirosomy, micelle, iscom) (40, 52). Pierwszym produktem rekombinacji DNA jest szczepionka przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby B opracowana w 1986 r. (7, 10). Wykorzystano też do produkcji szczepionek przeciwwirusowych (odra) klonowanie genów białek otoczki wirionu i ich ekspresję poprzez rekombinanty wirusa krowianki (34). Stosując rekombinanty *Escherichia coli* wyprodukowano szczepionkę przeciwko pryszczycy (5, 49), enteropatogennym szczepom *E. coli* (12, 39) oraz wirusowi białaczki kotów. Wykorzystanie rekombinantów *Saccharomyces cerevisiae* pozwoliło na wyprodukowanie szczepionki przeciwko wirusowi zapalenia wątroby B (13, 27, 49).

Wzmoczenie swoistej reaktywności immunologicznej szczepionek, w tym także z podjednostek, uzyskuje się stosując adjuwanty, substancje, które podane łącznie z antygenami lub osobno zwiększając odpowiedź immunologiczną lub zmieniają jej charakter. Ze względu na kompleksowe działanie adjuwantów, szczególnie pochodzenia bakteryjnego, efekt jest sumą ich działań jednostkowych na poszczególne składniki układu immunologicznego. Zwiększenie immunogenności można też uzyskać po inkorporacji antygeny do liposomów (11, 52). Ekstrahowanie antygenów, zwłaszcza białkowych, przy użyciu różnych detergentów oraz ich helatowanie nie przyniosło oczekiwanych wyników. Uzyskane produkty, często o nie ustalonym składzie, cechuje niska immunogenność (18, 29).

Obserwacje, że nienaruszony mikroorganizm wykazuje

znacznie większą immunogenność od wyosobnionych z niego antygenów rozpuszczalnych, które z reguły występują jako monomery, zainicjował badania nad zależnością między konfiguracją przestrzenną antygenów a jego immunogennością. Badania Morein i wsp. (6, 40, 43) nad wirusem Semliki Forest wykazały, że białka otoczki tego wirusa w formie micelli lub wirosomów wykazują dużą immunogenność. Już dawka 1–10 µg białka otoczki podana w tych postaciach podskórnie indukuje u myszek wysokie miano swoistych przeciwciał oraz zapewnia działanie ochronne przed zakażeniem dawką wirusa powodującą u osobników nie szczepionych zapalenie mózgu i rdzenia kończące się śmiercią. Ta sama dawka antygenów w postaci monomeru nie indukuje odpowiedzi humoralnej, zaś jej działanie ochronne jest nikłe. Forma monomeryczna antygenów może przy tym wywierać działanie immunosupresyjne na odporność humoralną (42). Podobne efekty uzyskano u myszy i u owiec z antygenami wirusa Pi-3 w formie micelialnej (41).

Nagromadzenie obserwacji wskazujących na dużą immunogenność antygenów w formie multimerów, a także nad zwiększaniem ich immunogenności przez adjuwanty stanowiło podstawę do opracowania nowej struktury prezentacji antygenów — kompleksu immunostymulacyjnego (immunostimulating complex) — iscom (42).

#### Iscom — struktura i właściwości

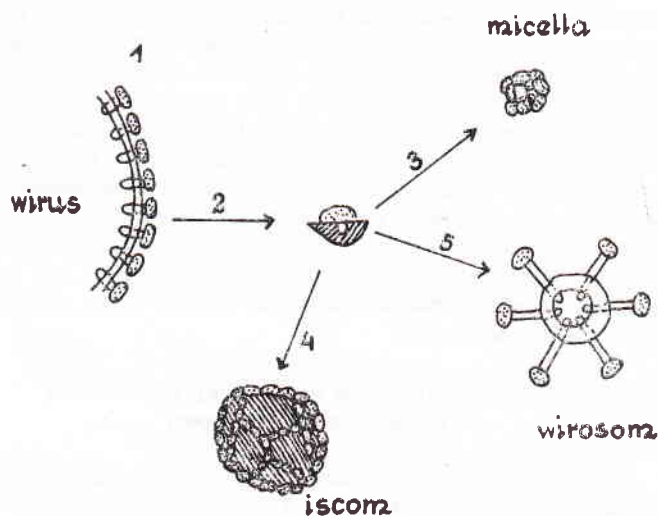
Immunogenność, swoistość i nieszkodliwość stanowią zasadnicze kryteria oceny szczepionek. Immunogenność zależy od struktury chemicznej antygenów i konfiguracji przestrzennej epitopów. Najwyższą immunogennością cechują się z reguły nie zmienione struktury zwłaszcza białkowe oraz kompleksy wielocukier-białko-lipid. Niższą immunogenność posiadają antygeny rozpuszczalne, które występują z reguły w formie monomerów i prezentowane są w tej formie układowi immunologicznemu. Nieco wyższą immunogennością od monomerów cechują się multimery w formie micelli, najwyższą zaś kompleksy immunostymulujące — iscom (42).

Formy monomeryczne antygenów uzyskuje się z rozpuszczalnych struktur powierzchniowych wirionów, bakterii i pasożytów pod wpływem detergentów (21). Te powierzchniowo czynne związki nie tylko solubilizują składniki antygenowe, ale zapobiegają także agregacji monomerycznych

struktur białkowych pod wpływem silnych interakcji grup hydrofobowych (Ryc. 1). Formy multimeryczne występujące w postaci białkowych micelli można otrzymać po usunięciu detergentów i lipidów z mieszaniny rozpuszczalnych białek. Pozbycie się na drodze dializy wyłącznie detergentu z tej mieszaniny przyczynia się do powstania wirosomów. Stanowią one kuliste struktury o ścianie utworzonej z podwójnej warstwy lipidowej, do której są inkorporowane monomery białkowe (22). Morein i wsp. (42) pierwsi otrzymali kompleks immunostymulujący o dużych zdolnościach immunogennych. Ten trójwymiarowy kompleks o strukturze klatkowej (cage — like structure) umożliwia prezentację antygenów białkowych i polipeptydów w formie multimerów wbudowanych do „rdzenia” utworzonego z glikozydu Quil A uzyskanego z *Quilla saponaria molina*, cholesterolu i lipidów. Antygeny zawierające w cząsteczce zarówno regiony hydrofobowe, jak i hydrofilowe są inkorporowane do przestrzennej struktury rdzenia dzięki wzajemnemu oddziaływaniu grup hydrofobowych, gdzie tworzą strukturę multimeryczną. Uzyskany w ten sposób twór dzięki optymalnej prezentacji epitopów umożliwił ponad 10-krotne zwiększenie immunogenności w porównaniu do odpowiednich antygenów całej cząsteczki wirusa lub jego formy micelialnej (22, 42). Antygeny wirusowe włączone do iscom indukują nie tylko odpowiedź typu humoralnego, ale są także bardzo skutecznym induktorem odporności komórkowej. Wskazuje na to odporność przeciwko cytomegalowirusom małym oraz przeciwko odrze indukowana przy pomocy białek otoczki tych wirusów inkorporowanych do iscom (15, 51). Stabilność zarówno rdzenia iscom, jak i antygenów do niego włączonych zapewniają wzajemne oddziaływanie grup hydrofobowych. Siły tych oddziaływań są prawdopodobnie identyczne z siłami odpowiedzialnymi za pofaldowanie cząsteczki białka i powstanie trzeciorzędowych struktur białek sferycznych.

Technologia iscom znalazła zastosowanie do produkcji szczepionek, w których wykorzystano cząsteczki zawierające zarówno regiony hydrofilowe, jak i hydrofobowe (białka otoczki wirusów, bakterii, pasożytów i komórek zwierzęcych). Iscom uzyskany z tych białek, różniących się strukturą trzeciorzędową i wielkością cząsteczki, stanowi twór bardzo stabilny. Również iscom zawierający polipeptydy o masie poniżej 5000 d ma ten sam kształt, wielkość i stałą sedymentacji co iscom zbudowany z białek o masie stokrotnie wyższej. Istotną rolę w tworzeniu struktury przestrzennej rdzenia iscom oprócz adjuwantu Quil A odgrywają lipidy, zwłaszcza cholesterol i fosfocholina. Jakkolwiek charakter białek nie wpływa na strukturę iscom, to jednak one determinują immunogenność kompleksu i swoistość odpowiedzi immunologicznej. W celu zminimalizowania działań ubocznych adjuwantu występuje on w iscom w małych dawkach i w ścisłym połączeniu z antygenem (2).

Do cech charakteryzujących iscom należy wartość stałej sedymentacji, profil białek rozdzielonych metodą elektroforezy SDS na żelu poliakrylamidowym oraz struktura cząsteczki — barwienie negatywne i oglądanie w mikroskopie elektronowym. Wartości te dla kompleksu immunostymulującego zawierającego białko otoczki wirusa PI-3 przedstawiają się w sposób następujący. Stała sedymentacji oznaczona w gradientcie 10–40% sacharozy wynosi 19 S i nie zmienia się w zależności od źródła pochodzenia białka. Profil białek iscom jest zbliżony do profilu micelli białkowych wirusa PI-3 (36). W elektroforegramie SDS-PAGE wyróżnia się zasadniczo dwa pasma białkowe, duże i silnie wybarwione o masie 73 K, które odpowiada neuraminidazie (HN) oraz delikatne pasmo o masie 51 K odpowiadające najprawdopodobniej białku łączącemu (F). Średnica cząsteczki kompleksu oznaczona w mikroskopie elektronowym wynosi



Ryc. 1. Schemat otrzymywania micelli białkowych, wirosomów i kompleksu immunostymulacyjnego — iscom (wg 44). 1 — otoczka białkowa wirusa, 2 — dodatek detergentu, 3 — usunięcie detergentu, 4 — usunięcie detergentu i dodanie Quil A, 5 — usunięcie detergentu i dodanie fosfolipidu

35 nm. Każda cząsteczka o strukturze przestrzennej wielościanu jest zbudowana z podjednostek o średnicy 12 nm i kształcie zbliżonym do pierścienia (38, 42).

### Otrzymywanie iscom

Schemat otrzymywania kompleksu immunostymulacyjnego z osłonki glikoproteinowej wirusa w porównaniu do micelli podano na ryc. 2. Jako materiał wyjściowy stosuje się białka osłonki wirionu. Do produkcji iscom można wykorzystywać białka struktur powierzchniowych pasożytów, syntetyczne polipeptydy o niskiej masie cząsteczkowej, a nawet hapteny. Przejście białek natywnych w rozpuszczalne monomery zachodzi pod działaniem niejonowych detergentów pozbawionych właściwości denaturujących lub o osłabionych właściwościach denaturowania białek. Dzięki temu przestrzenna konfiguracja determinant antygenowych nie zmienia się zupełnie, bądź ulega tylko nieznacznej deformacji. Najczęściej są wykorzystywane następujące detergenty: NP-40, Triton X-100, betaoktyloglukozyd lub MEGA-10 (20). Rozpuszczone komponenty białkowo-lipidowe osłonki wirionu po oddzieleniu od części nierozpuszczalnych na drodze ultrawierowania mogą być wykorzystywane do produkcji

micelli lub iscom bezpośrednio, względnie po ich oczyszczeniu metodą chromatografii powinowactwa. Detergenty utrzymują w postaci monomerów białka rozpuszczalne, które zawierają w cząsteczce obok regionów hydrofobowych również regiony hydrofilowe.

Zastosowane detergenty niejonowe, które hamują wzajemne oddziaływanie cząsteczek lipidów względnie cząsteczek lipidów i białek, w słabszym stopniu przeciwdziałają interakcji między cząsteczkami białek. Stąd też nieprzestrzeganie parametrów preparatyki może spowodować wypadanie agregatów zamiast przejścia form monomerycznych w multimery. Ze względu na fakt, że błona pierwotniaków jest strukturą sztywniejszą od osłonki wirusa, można z niej wyekstrahować duże ilości białek bez dezintegracji błony plazmatycznej stosując MEGA-10 w niskich stężeniach (0,25%) (30).

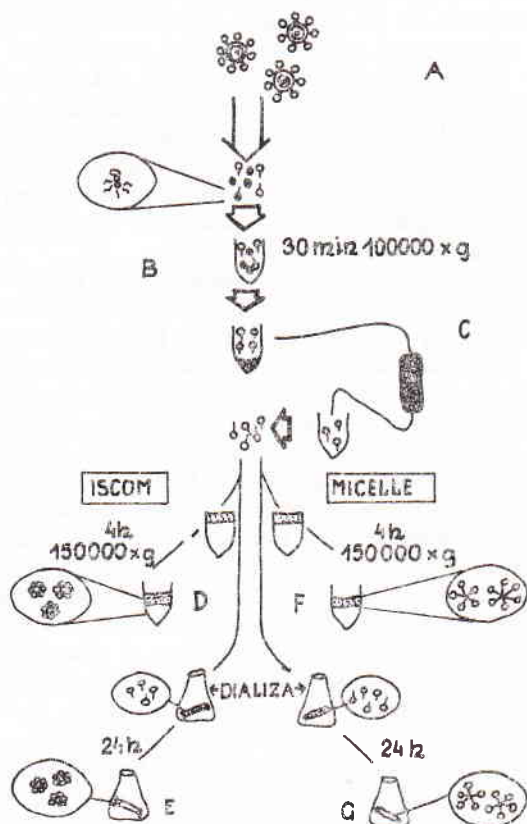
Micelle białkowe powstają z białek po usunięciu detergentu metodą wirowania w gradiencie sacharozy lub metodą dializy. W zależności od właściwości detergentów użytych do solubilizacji antygenów również przy otrzymywaniu iscom stosuje się metodę dializy lub ultrawierowania.

Metoda dializy znajduje zastosowanie wtedy, gdy antygeny cechuje zbyt niska masa cząsteczkowa, co uniemożliwia względnie szybką ich sedimentację podczas wirowania w gradiencie sacharozy. Stąd też roztwory polipeptydów i oligopeptydów w detergencie po dodaniu Quil A do końcowego stężenia 0,01% (w/v) są poddawane dializie w stosunku do PBS przez 24–48 godz. Następnie wirowanie w gradiencie sacharozy pozwala na otrzymanie oczyszczonego iscom, zwłaszcza od adjuwantu, który nie wszedł w strukturę kompleksu immunostymulacyjnego. Adjuwant w postaci niezwiązanej działa drażniaco i toksycznie na organizm (31).

Istota postępowania przy otrzymywaniu iscom polega na dodaniu do mieszaniny rozpuszczonych antygenów w formie monomerycznej, glikozydu Quil A przed lub po usunięciu detergentu. Glikozyd w formie micelli łącznie z lipidami tworzy rdzeń kompleksu (matrix). Dodany glikozyd w miarę obniżania stężenia detergentu wychwytuje białka, które są inkorporowane do rdzenia. Jednocześnie ujawniają się właściwości hydrofobowe białek maskowane dotychczas przez detergent. Proporcja Quil A w iscom w stosunku do białka wynosi 50–100 µg/mg białka. Wykazano przy tym w serii doświadczeń, że typowa struktura przestrzenna iscom powstaje przy udziale cholesterolu (33). Istnieje też możliwość inkorporacji do rdzenia iscom w obecności cholesterolu niewielkich ilości innych lipidów. 0,7 µM fosfatylcholiny może być inkorporowana do iscom utworzonego przez 1,3 µM cholesterolu i nadmiar Quil A. Lipidy wchodzące w skład kompleksu immunostymulacyjnego pochodzą ze struktur natywnych ekstrahowanych materiałów (31). W tych przypadkach, w których zawartość lipidów w materiale oczyszczonym metodą chromatografii powinowactwa jest zbyt mała, należy dodać do oczyszczonego materiału cholesterol i fosfatylcholiny. Obecność fosfatylcholiny jest konieczna do ułatwienia włączenia do rdzenia iscom polipeptydów i oligopeptydów.

### Stymulacja odporności humoralnej, komórkowej i działanie ochronne iscom

Kompleks immunostymulacyjny, który jest strukturą stabilną, pozbawioną niepożądanych składników antygenowych nie traci swoich właściwości fizyko-chemicznych i biologicznych po wielu miesiącach przetrzymywania w stanie zliofilizowanym. Antygeny wchodzące w skład kompleksu można wystandaryzować biochemicznie, co umożliwia produkcję szczepionek o identycznych parametrach (42). Struk-



Ryc. 2. Schemat otrzymywania iscom i micelli dla glikoprotein otoczki wirusa (wg 31). A — rozpuszczenie otoczki wirusa przy użyciu detergentu, B — oddzielenie składników rozpuszczonych od nierozpuszczonych na drodze wirowania, C — dalsze oczyszczenie rozpuszczonych białek np. metodą chromatografii powinowactwa, D — wyekstrahowane białko otoczki podczas wirowania przechodzi przez warstwę sacharozy z detergentem do strefy dolnej zawierającej Quil A. W tej strefie pozbawionej detergentu ma miejsce asocjacja białek z Quil A i wytwarza się iscom, E — iscom powstaje z mieszaniny białek otoczki i Quil A po usunięciu detergentu na drodze dializy, F — wyekstrahowane białko otoczki po przejściu w trakcie wirowania przez warstwę sacharozy z detergentem do strefy wolnej od detergentu tworzy micelle, G — micelle powstają z białek otoczki wirusa po usunięciu detergentu na drodze dializy

tura przestrzenna kompleksu immunostymulacyjnego, w której przeważająca ilość epitopów nie jest maskowana oraz działanie adjuwancyjne Quil A umożliwiają stymulację odporności komórkowej, humoralnej i działania ochronnego. Adjuwant zawarty w cząsteczce iscom, chociaż w stężeniu 50-krotnie niższym od stężenia w konwencjonalnych szczepionkach, wykazuje identyczne działanie immunostymulacyjne (2, 9).

Doskonały wgląd w immunogenność kompleksu immunostymulacyjnego przynoszą badania nad odpowiedzią immunologiczną świnek morskich immunizowanych iscom oraz micellami wirusa grypy koni. Nasilenie odpowiedzi immunologicznej określane wysokością miana przeciwciał hemaglutynujących i neutralizujących wirus u zwierząt immunizowanych iscom przewyższa wielokrotnie miana tych przeciwciał zawartych w surowicach zwierząt immunizowanych micellami lub wirusem inaktywowanym (Ryc. 3) (31, 41). Również u myszek BALB/c immunizowanych iscom zawierającym glikoproteiny wirusa grypy koni, szczep A/Solvalla/79 miano swoistych przeciwciał aktywnych w odczynie ELISA przewyższało wielokrotnie miana indukowane przez szczepionkę zawierającą micelle. Odpowiedź immunologiczna koni na bivalentną szczepionkę przeciwko grypie (szczep Praga i szczep Solvalla) mierzona wysokością miana aglutynin w odczynie ELISA przewyższała też odporność po szczepieniu szczepionką opartą o wirus zabity (31). Odporność po szczepieniu iscom utrzymywała się na wysokim poziomie przez około 18 miesięcy i chroniła konie przed zachorowaniem. Natomiast w celu uzyskania działania ochronnego u koni uodpornionych szczepionką konwencjonalną należy stosować dawki przypominające antygeny w odstępach 6–8 miesięcznych (46).

Bardzo ciekawe obserwacje poczyniono na myszach immunizowanych donosowo. Po donosowym i podskórnym podaniu iscom z glikoproteinami wirusa grypy koni miano swoistych przeciwciał w surowicy krwi było bardzo zbliżone. Przenikanie kompleksu immunologicznego przez śluzówkę układu oddechowego ułatwiały białka otoczki wirusa, które dzięki strukturze kompleksu nie tracą właściwości biologicznych białek natywnych (28). Szczepienie donosowe indukuje wyższe miano przeciwciał występujących w klasie IgG i IgA niżeli szczepienia podskórne. Po powtórnym podaniu szczepionki silnie wzrasta miano przeciwciał zawartych w klasie IgG immunoglobulin, zwłaszcza w podklasach IgG<sub>1</sub> i IgG<sub>2a</sub> (31).

Po jednorazowym podaniu myszkom glikoproteiny wirusa grypy A w formie micelli lub iscom nie występuje odpowiedź immunologiczna ze strony limfocytów B oraz limfocytów cytotoksycznych (T<sub>c</sub>) (1, 37). Natomiast po dwukrotnej immunizacji iscom pojawiają się w płucach myszek komórki wydzielające swoiste przeciwciała (ASC). Wzrasta częstotliwość pojawiania się prekursorów komórek T<sub>c</sub> oraz ASC po stymulacji *in vitro* przy użyciu iscom, hodowli

tkanki płucnej pochodzącej od myszek szczepionych kompleksem immunostymulującym. W przeciwieństwie do szczepionek zawierających micelle, które nie indukują odpowiedzi limfocytów T<sub>c</sub> komórki T pochodzące od myszek immunizowanych działają cytotoksycznie. Aktywność ta wynosi jednak tylko 10% aktywności obserwowanej po immunizacji żywym wirusem grypy (31).

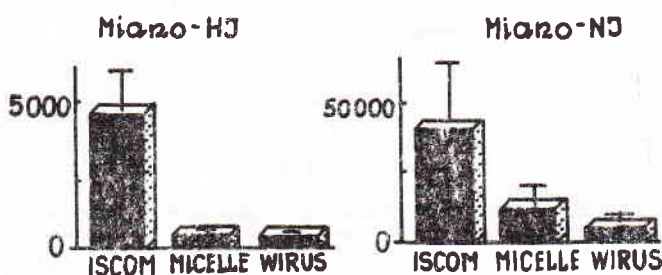
Pojęcie immunoprotekcji obejmuje ochronę przed zachorowaniem, która jest następstwem ograniczenia namnażania czynnika zakaźnego, oraz ochronę przed zakażeniem uważaną całkowitym zahamowaniem namnażania zarazka. Kompleks immunostymulacyjny sporządzony z wirusa grypy indukuje nie tylko wysoki poziom odporności humoralnej, ale również protekcję na zakażenie zjadliwym szczepem. Myszy uodpornione dwukrotnie iscom o zawartości 1,0 µg glikoprotein wirusa grypy są w pełni odporne 11 dnia po szczepieniu na zakażenie 10<sup>5</sup> EID<sub>50</sub> pełnozjadliwego wirusa. Nawet przy dawce niskiej, bo wynoszącej 0,1 µg białka rozwija się dość silna odporność. Zakażenie przeżywa 70% myszek szczepionych (31). W żadnym przypadku nie wysobniono wirusa z płuc zakażonych zwierząt. Również silna odporność rozwija się u kotów immunizowanych iscom z białkami otoczki wirusa białaczki kotów (47) oraz u małp po immunizacji iscom z glikoproteinami gp 340 wirusa Epstein-Barr (45). Szczepionka przeciwko wściekliźnie o zawartości 4,5 µg białka w iscom indukuje u myszek identyczną odporność jak szczepionka standardowa (42, 50).

#### Iscom jako nośnik antygenów niskocząsteczkowych

Substancje o małej masie cząsteczkowej, zwłaszcza polipeptydy, cechuje z reguły niewielka immunogenność. Celem jej zwiększenia koniuguje się te substancje z białkami (albumina surowicy bydła lub kopolimery aminokwasów), które pełnią rolę nośników (17, 48). Ze względu na nadal niezadowalającą immunogenność tak otrzymanych koniugatów, w celu zwiększenia ich immunogenności dodaje się kompletny lub niekompletny adjuwant Freund'a. Adjuwant ten stosowany w celach eksperymentalnych z dobrym powodzeniem, nie może być stosowany powszechnie w medycynie i w weterynarii ze względu na niekorzystne działania uboczne (17).

Nowe możliwości zwiększenia immunogenności antygenów niskocząsteczkowych, szczególnie kompleksów połączonych z nośnikami białkowymi, stwarza ich połączenie z liposomami, micellami oraz z kompleksem immunostymulacyjnym (32, 43). Peptydy, jak hormon luteinizujący lub syntetyczny peptyd wirusa pryszczycy o sekwencji aminokwasów 144–159 po inkorporacji do iscom zawierającego glikoproteiny wirusa grypy w stosunku 1–2 cząsteczki peptydu na jedną cząsteczkę białka, indukują u myszek po dwukrotnym podaniu w dawce 1–3 µg odporność humoralną. Miano swoistych przeciwciał w surowicy myszek w przypadku hormonu po immunizacji dawką 3 µg wynosi 58 dnia po immunizacji 630±360, zaś po immunizacji identyczną dawką wirusa pryszczycy 260±120 (42).

Stosując jako hapten modelowy białkę aktywowaną bursztynianem znakowanym <sup>3</sup>H uzyskuje się gęstość epitopów od 0,1 do 20 na cząsteczkę białka, podczas gdy w przypadku polipeptydów gęstość ta nie przekracza 2–5 cząsteczek peptydu na cząsteczkę białka. W koniugacie o dużej immunogenności stosunek optymalny peptydu do białka wynosi jak 10:1. Zapewnia on maksymalną ekspozycję przynajmniej jednego epitopu białka w cząsteczce iscom i dobrze maskuje antygeny białka zastosowanego jako nośnik. 10 µg iscom z białką indukują u myszek około 3-krotnie wyższe miano przeciwciał w porównaniu do białki



Ryc. 3. Miano hemaglutyniny (HI) i przeciwciał zobojętniających wirus (NJ) w surowicach świnek morskich po indukcji inaktywowanym wirusem grypy koni, micellami i iscom (wg 31)

inkorporowanej do micelli lub skoniugowanej z albuminą surowicy bydłej i podaną łącznie z adjuwantem Freund'a (42). Stosując iscom jako nośnik już przy dawce haptenu 10 µg lub mniej i przy pominięciu adjuwantu Freund'a uzyskuje się dobrą immunogenność niskocząsteczkowych antygenów i haptenu. Wydaje się, że kompleks immunostymulacyjny jako nośnik okaże się szczególnie przydatny w przypadku produktów rekombinacji DNA, które zazwyczaj cechuje niska immunogenność.

#### Wykorzystanie iscom jako antygeny w odczynach immunologicznych

Dobra ekspozycja epitopów w kompleksach immunostymulacyjnych, która zapewnia zwiększoną immunogenność, może zostać wykorzystana w odczynach immunologicznych, w których cząsteczki iscom pełnią rolę antygenów. Odnosi się to zwłaszcza do białek powierzchniowych wirusów, bakterii i pasożytów (35). Technologia otrzymywania iscom umożliwia bowiem selektywne uzyskiwanie antygenów powierzchniowych (43). Przydatność kompleksu immunostymulacyjnego jako antygeny określono dla białek powierzchniowych tachyzoitów *Toxoplasma gondii* w odczynie ELISA zastosowanym do oznaczania wysokości miana swoistych przeciwciał w surowicach owiec i cieląt. Odczyn ELISA z zastosowaniem iscom cechuje identyczna czułość jak odczyn immunofluorescencji z użyciem całych pasożytów lub odczyn ELISA, w którym jako antygen zastosowano wyciąg z komórek pasożyta. Co więcej, odczyn ELISA z zastosowaniem iscom jako antygeny cechuje się wyższą swoistością od tego odczynu, w którym zastosowano antygeny konwencjonalne *T. gondii*. Ten ostatni odczyn wypadł też dodatnio u cieląt zarażonych *Sarcocystis cruzi* (30, 51).

Przedstawione wyniki badań nad właściwościami biologicznymi i zastosowaniem iscom, chociaż niepełne ze względu na początkowe stadium badań nad tym zagadnieniem, wykazują jednoznacznie, że kompleksy immunostymulacyjne, których założenia teoretyczne i technologię opracował Morein i wsp. (40, 42, 43) stwarzają nowe możliwości dla immunoprofilaktyki i immunoterapii przy użyciu szczepionek, a także dla immunodiagnostyki. Duże nadzieje budzą zwłaszcza badania nad opracowaniem nowej generacji szczepionek dla wirusa odry (16, 51), a także prace nad przygotowaniem szczepionki zawierającej kompleks immunostymulacyjny dla wirusa choroby AIDS. Być może na tej drodze zostanie poczyniony postęp nad uzyskaniem szczepionek dla wirusów powolnych wywołujących zakażenia u zwierząt. Nowe perspektywy rysują się także przed produkcją szczepionek dla antygenów cechujących się niską immunogennością (42), zwłaszcza dla immunogenów otrzymanych na drodze inżynierii genetycznej. Niebagatelne znaczenie ma możliwość wyprodukowania przy użyciu iscom szczepionek i preparatów immunodiagnostycznych wolnych od substancji balastowych, a tym samym pozbawionych większości działań ubocznych, a cechujących się dużą swoistością.

#### Piśmiennictwo

1. Ada G. L., Jones P. D.: *Curr. Topics Microbiol. Immun.* 128, 1, 1986.
2. Arnon R., Sela M., Parant M., Chadid J.: *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 77, 6769, 1980.
3. Audibert F., Chedid L., Hannon C.: *C. r. heb. Seanc. Acad. Sci. Paryż* 285, 467, 1977.
4. Audibert F., Jolibet M., Chedid L., Arnon R., Sela M.: *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 79, 5042, 1982.
5. Bachrach H. L.: *J. Am. vet. med. Ass.* 181, 992, 1982.
6. Balcarova J., Helenius A., Simons K.: *J. gen. Virol.* 53, 85, 1981.
7. Brown S. E., Stanley C., Howard C. R., Zuckerman A. J., Steward M. W.: *Br. med. J.* 292, 159, 1986.
8. Crawford C. R., Jennings R., Bradford N., Potter C. W.: *Clin. exp. Immun.* 48, 739, 1982.
9. Dalsgaard K.: *Arch. ges. Virusforsch.* 44, 243, 1974.
10. Davidson M., Krugman S.: *J. infect.* 13, A, 31, 1986.
11. Davis D., Gregoriadis G.: *Immunology* 61, 229, 1987.
12. De Graaf F. K., Krenn B. E., Klaassen P.: *Infect. Immun.* 43, 518, 1984.
13. Desmetter P.: *Le Point Veterinaire* 18, 427, 1986.
14. Devenport F. M.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 127, 587, 1969.
15. De Vries P., van Binnendijk R. S., van der Marel P., van Velzen A. L., Voorma H. O., Slinguis B., Uytde-Haag F. G. C. M., Osterhaus A. D. M. E.: *J. gen. Virol.* 69, 549, 1988.
16. De Vries P., Uytde-Haag F. G. C. M., Osterhaus A. D. M. E.: *J. gen. Virol.* 69, 2071, 1988.
17. Freund J.: *Adv. tuberc. Res.* 7, 130, 1956.
18. Gross P. A., Ennis F. A., Gaerlan P. F., Denson L. J., Denning C. R., Schiffman D.: *J. infect. Dis.* 36, 623, 1977.
19. Gross P. A., Ennis F. A., Noble G. R., Gaerlan P. E., Dennis W. J., Denning C. E.: *J. Ped.* 97, 58, 1980.
20. Hanatan M., Nishifuji K., Futai M., Tsuchiya T.: *J. Biochem. Tokio* 95, 1349, 1984.
21. Helenius A., Simons K.: *Biophys. Acta* 415, 29, 1975.
22. Helenius A., von Bonsdorff C. H.: *Biochim. biophys. Acta* 436, 895, 1976.
23. Hilleman M. R.: *J. infect. Dis.* 151, 407, 1985.
24. Jennings R., Potter C. W., Massey P. M. O., Duerden B. J., Martin J., Bevan A. M.: *J. Hyg. Camb.* 86, 1, 1981.
25. Kimberlin R. H.: *Slow virus diseases of animals and man*, red. A. Neuberger, E. L. Tatum, North-Holland Publ. Co. Amsterdam, Oxford, 1976.
26. Kirckhausen T., Harrison S. C.: *Cell* 23, 755, 1981.
27. Kleid D. G.: *Science* 214, 1125, 1986.
28. Laver W. G., Valentine R. C.: *Virology* 38, 105, 1969.
29. Laver W. G., Webster R. G.: *Virology* 69, 511, 1976.
30. Loughe K., Uggla A., Morein B.: *J. vet. Med. B.* 34, 1, 1987.
31. Loughe K.: *Construction and potential of the ISCOM as immunogen*. Uppsala 1987.
32. Loughe K., Lindmark J., Pipkorn R., Morein B.: *J. Immun. Methods* 98, 137, 1987.
33. Loughe K., Morein B.: *Biotechnology Appl. Biochem.* 10, 161, 1988.
34. Mackett M., Smith G. L.: *J. gen. Virol.* 67, 2967, 1983.
35. Marzels R. M., Philipp M., Ogilvie S.: *Immun. Rev.* 61, 109, 1982.
36. Martin R. G., Ames B. N.: *J. biol. Chem.* 238, 1372, 1961.
37. Mc Michael A. J., Gotch F., Noble G. R., Beave A. S.: *New Engl. J. Med.* 309, 13, 1983.
38. Metz D. C., Scheid A., Choppin P. W.: *J. exp. Med.* 151, 275, 1980.
39. Mooi F. R., Wijffes A., De Graaf F. K.: *J. Bact.* 154, 41, 1983.
40. Morein B., Helenius H., Simons K., Pettersson R., Kaariainen L., Schirmacher V.: *Nature, Lond.* 276, 715, 1978.
41. Morein B., Sharp M., Sundquist B., Simons K.: *J. gen. Virol.* 64, 1557, 1983.
42. Morein B., Sundquist B., Höglund S., Dalsgaard K., Osterhaus A.: *Nature, Lond.* 308, 457, 1984.
43. Morein B., Simons K.: *Vaccine* 3, 83, 1985.
44. Morein B., Lövgren K., Lunquist B.: *Immunology Today* 8, 333, 1987.
45. Morgan A. J., Finerty S., Lövgren K., Scullion F. T., Morein B.: *J. gen. Virol.* 69, 2093, 1988.
46. Mumford J. A., Cook R. F., Hannant D., Jessett D. M., Wood J. M., Sunguist B.: *1st Int. Vet. Immunol. Symposium, Guelph, Canada* 1986.
47. Osterhaus A., Weijer K., Uytde-Haag F., Jarret O., Sundquist B., Morein B.: *J. Immun.* 135, 591, 1985.
48. Palfreyman J. W., Atcheson T. C., Taylor P.: *J. Immunol. Meth.* 75, 383, 1984.
49. Pellerin J. L.: *Revue méd. vét.* 139, 127, 1988.
50. Seigman E. B.: *Laboratory techniques in rabies*. WHO, Geneva 1973.
51. Uggla A., Araujo F. G., Lunden A., Lövgren K., Remington J. S., Morein B.: *J. vet. Med. B.* 35, 311, 1988.
52. Van Rovijsen N., van Nieuwmegen R.: *Cell Immunol.* 49, 402, 1980.
53. Zanetti M., Sercarz E., Salk J.: *Immunology Today* 8, 18, 1987.

Adres autora: prof. dr hab. Zdzisław Gliński, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

**GUPTA P., CHATTERJEE R., CAI Q.: Częstość występowania czynnika blokującego wirus białaczki bydła w płazmie krów w stadach krów mlecznych. (Prevalence of the plasma bovine leukaemia virus blocking factor in cattle of a commercial dairy herd). *Vet. Rec.* 125, 5-6, 1989 (1)**

Transkrypcja genomu wirusa białaczki bydła, który należy do retrowirusów może być blokowana in vitro przez białko plazmy krwi nie posiadające właściwości Ig. Obecność tego czynnika przebadano w płazmie krów mlecznych reagujących dodatnio w odczynie RIST w stosunku do białka 25p. Wykrycie czynnika blokującego zależy od natury zakażonych komórek docelowych zastosowanych w badaniach. Stosując bardzo wrażliwe limfocyty zakażone wirusem białaczki jako komórki docelowe, obecność czynnika blokującego wykazywano znacznie częściej w stadach krów zakażonych w porównaniu do krów pochodzących ze stad wolnych od białaczki. W stadach zakażonych nie występuje korelacja między wysokością miana swoistych przeciwciał dla wirusa białaczki a obecnością czynnika blokującego.