

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования
Федеральное агентство по здравоохранению и социальному развитию

Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова

Фармацевтический факультет

Кафедра биотехнологии

Катлинский А.В., Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И.

КУРС ЛЕКЦИЙ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ

Москва 2005

СОДЕРЖАНИЕ.

Лекция 1.	Современная биотехнология в создании и производстве лекарственных средств.....	1
Лекция 2	Антибиотики.....	9
Лекция 3.	Слагаемые биотехнологического процесса. Структура биотехнологического производства.....	19
Лекция 4.	Совершенствование биообъектов-продуцентов, используемых в производстве лекарственных средств, диагностических и профилактических препаратов методами мутагенеза и селекции.....	25
Лекция 5	Совершенствование биообъекта методами клеточной инженерии.....	35
Лекция 6	(продолжение).....	42
Лекция 7	Биотехнология аминокислот.....	48
Лекция 8	Инженерная энзимология, которая основана на иммобилизованных биообъектах: ферментах и целых клетках.....	53
Лекция 9	GLP , GCP, GMP.....	65
Лекция 10	Проблемы экологии. Биотехнологические аспекты фармацевтического производства.....	71
Лекция 11	Рекомбинантные белки - инсулин, интерфероны, гормоны роста, вакцины. Противоопухолевые антибиотики.....	77
Лекция 12	Иммунобиотехнология.....	85
Лекция 13	Регуляция внутриклеточных ферментативных реакций. Механизмы внутриклеточной ферментации.....	99
Лекция 14	Получение лекарственных средств на основе биотрансформации стероидных соединений.....	111
Лекция 15	Биотехнология в производстве витаминов.....	118
Лекция 16	Получение лекарственных средств на основе культур клеток растений методом биотехнологии.....	124
Лекция 17	Препараты на основе живых культур микроорганизмов-симбионтов (нормофлоры и пробиотики).....	133
Лекция 18.	Геномика и протеомика. их значение для создания новых лекарственных средств.....	138

Лекция 1.

СОВРЕМЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ В СОЗДАНИИ И ПРОИЗВОДСТВЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.

План лекции

1. Роль биотехнологии в современной фармации
2. Определение понятия биотехнологии
3. Краткая историческая справка по развитию биотехнологии в мире
4. Субстанции, используемые для биотехнологии
5. Биосинтез биологически активных веществ (БАВ) в условиях биотехнологического производства (общие положения)
 - 5.1. Необходимые условия для биосинтеза
 - 5.2. Параметры биотехнологического процесса, влияющие на биосинтез
 - 5.3. Виды процессов биосинтеза

Современный провизор должен знать биотехнологию в рамках своей профессии, работая на отечественном рынке лекарственных средств, тесно интегрированным с мировым производством лекарственных препаратов.

Номенклатура лекарственных препаратов, полученных на основе биообъектов в силу объективных причин имеет тенденцию к своему расширению. В категорию таких лекарственных препаратов входят:

1. лекарственные средства для лечения, в число которых входят аминокислоты и препараты на их основе, антибиотики, ферменты, коферменты, кровезаменители и плазмозаменители, гормоны стероидной и полипептидной природы, алкалоиды;
2. профилактические средства, в число которых входят вакцины, анатоксины, интерфероны, сыворотки, иммуномодуляторы, нормофлоры;
3. диагностические средства, в число которых входят ферментные и иммунные диагностикумы, препараты на основе моноклональных антител и иммобилизованных клеток.

Это далеко не полный перечень лекарственных препаратов, которые имеются в современной фармации, в основе производства которых используются биообъекты.

Что касается определения самого понятия биотехнологии, то оно следует из понятия самой технологии. Технология – это наука о развитии естественных процессов в искусственных условиях. Если эти процессы относятся к

биосинтетическим или биокаталитическим, присущих клеткам прокариот и эукариот, когда в качестве элементной базы используются биообъекты для получения целевого (конечного) продукта, то такое производство называют биотехнологическим. Если же в роли целевого (конечного) продукта выступает лекарственное средство, то такая биотехнология называется «биотехнология лекарственных средств».

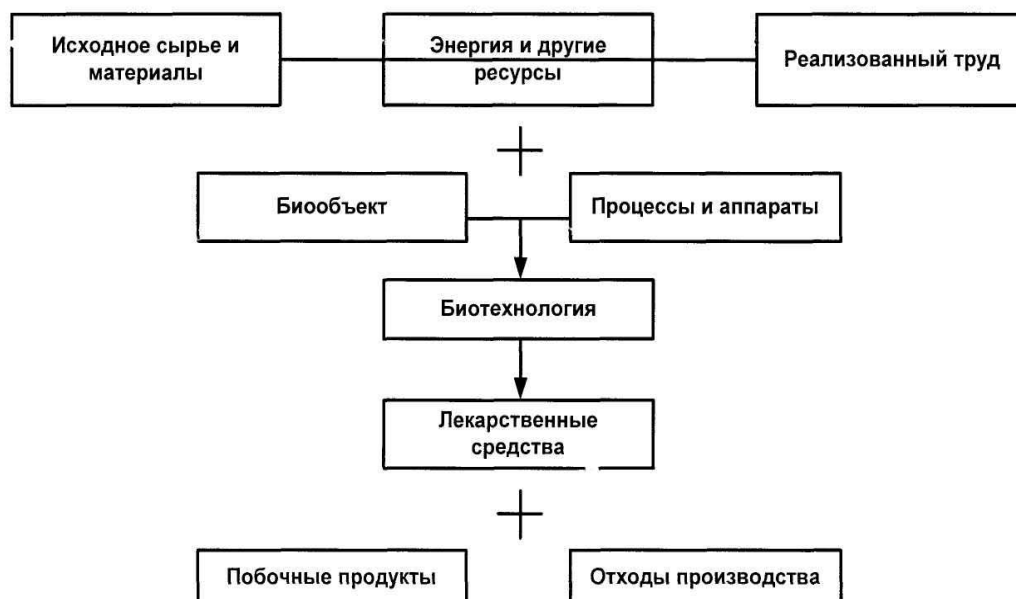
В настоящее время фармацевтику характеризует как минимум третья часть лекарственных средств от общего объема производимых лекарств, которая использует современные биотехнологии. Суммируя все позиции определения биотехнологии, указанные выше, можно сказать, что **«Биотехнология – это направление научно-технического прогресса, использующее биологические процессы и агенты для целенаправленного воздействия на природу, а также для промышленного получения полезных для человека продуктов, в том числе лекарственных средств».**

Биотехнология – комплексная наука, это и наука и сфера производства со своим специфическим аппаратным оформлением. Биотехнология как сфера производства – это наукоемкая технология.

Рис.1.

Рисунок 1

Общая схема биотехнологического производства



Биообъект – это продуцент, биосинтезирующий нужный продукт, либо катализатор, фермент, который катализирует присущую ему реакцию.

Биотехнология использует либо продуценты – микроорганизмы, растения, высшие животные, либо использует изолированные индивидуальные ферменты. Фермент иммобилизуется (закрепляется) на нерастворимом носителе, что позволяет его использовать многократно.

Современная биотехнология использует такие достижения, как искусственные культуры клеток и тканей. Особое достижение биотехнологии – это *генноинженерные продуценты*, микроорганизмы, имеющие рекомбинантные ДНК. Ген четко изолируется и вводится клеткам микроорганизма. Этот микроорганизм будет продуцировать вещество, структура которого закодирована во введенном гене.

В истории развития биотехнологии можно выделить три основных периода:

1. эмпирическая биотехнология (тысячелетия). Самый первый биотехнологический процесс, осуществленный человеком – получение пива, был изобретен шумерами приблизительно 5 тысяч лет назад;
2. научная биотехнология (с Пастера);
3. современная биотехнология.

Биотехнологию можно условно разделить на три категории по получаемым продуктам:

1. *природные* биотехнологические продукты, вырабатываемые собственно микроорганизмами (например, антибиотики);
2. биотехнологические продукты *второго поколения*, полученные с помощью генноинженерных штаммов (например, человеческий инсулин);
3. биотехнологические продукты *третьего поколения* – продукция XXI века, основана на изучении взаимодействия биологически активных веществ и рецепторов клеток и создании принципиально новых препаратов. Примером таких препаратов могут быть *антисмысловые нуклеиновые кислоты*. В клетке человека приблизительно 100 тысяч генов. Используя принцип комплементарности можно создать цепь нуклеиновых кислот, которые могут выключать тот или иной ген, что

позволяет с помощью антисмысловых нуклеиновых кислот управлять генами, корректируя обмен.

Биотехнология в зарубежных странах.

Первое место в мире по выпуску биотехнологической продукции занимает США, которая ежегодно выделяет 3 млрд. долларов на поддержку фундаментальных исследований в области медицины, из которых 2,5 млрд. долларов относится к области биотехнологии. Второй страной по выпуску биотехнологической продукции является Япония, третье место за Израилем.

Современная биотехнология – это наука, которая на практике использует достижения современных фундаментальных наук, таких как:

1. молекулярная биология
2. молекулярная генетика
3. биоорганическая химия.

Начиная с первых шагов и до наших дней технология изготовления лекарственных средств предусматривает использование субстанций, получаемых из разных источников. Это

- ткани животных или растений
- неживая природа
- химический синтез.

Первый путь (использование тканей животных или растений) предполагает сбор дикорастущих лекарственных растений. Это, прежде всего, плантационное культивирование растений. Это также выращивание каллусных и суспензионных культур. Это наиболее современные методы культивирования клеток, в геном которых встроены опероны, ответственные за биосинтез лекарственной субстанции, то есть генная инженерия.

Можно привести пример такого растения как женьшень при извлечении из него панаксозидов, как биологически активного вещества:

- в естественных условиях, в дикорастущем виде, сбор такого растения может производиться только на шестидесятом году его роста;
- в условиях его выращивания на плантациях – на шестом году его произрастания;

-в каллусной культуре, то есть в культуре клеток растительной ткани панаксозиды можно извлекать в достаточном количестве, обеспечивая рентабельность производства уже на 15-25-тый день роста культуры ткани. Второй и третий путь получения лекарственных субстанций из неживой природы или путем химического синтеза раньше рассматривали в качестве конкурентного пути для биотехнологии. Жизнь внесла коррективы в это положение. Например, если мы говорим о возможностях перевода сорбита в сорбозу, или ситостерина в 17-кетоандростаны, или фумаровой кислоты в аспарагиновую и т.д., то в этих случаях биотехнология успешно конкурирует с тонкими химическими технологиями на отдельных этапах изготовления лекарственных средств, а в ряде случаев, например, при синтезе витаминов В₁₂ биотехнология может обеспечить всю последовательность сложных химических реакций, необходимых для превращения исходного предшественника (5,6 диметилбензимидазола), в конечный продукт – цианокобаламин.

Конечно, в последнем случае, когда всю технологическую цепочку осуществляет биообъект, находящийся в искусственных условиях, то он должен иметь условия наибольшего (максимального) благоприятствования (комфорта), что в свою очередь, предполагает обеспечение биообъекта необходимыми источниками питания, защиту от внешних неблагоприятных воздействий. Не менее важную роль в работе биообъекта играет и инженерно-техническая база, то есть процессы и аппараты биотехнологических производств.

В заключение можно сказать, что современная биотехнология функционирует с одной стороны на достижениях

-биологии,

-генетики,

-физиологии,

-биохимии,

-иммунологии и, конечно, биоинженерии, а с другой стороны, на совершенствовании самой технологии получения лекарственных средств, имея в виду:

-способы подготовки сырья,

-способы стерилизации оборудования и всех потоков системы, обеспечивающий - процесс получения биологически активных веществ,

-способы оперативного контроля и управления биотехнологическими процессами.

Сегодня бизнес в области лекарственных средств, чтобы выстоять в конкуренции огромного числа производителей лекарственных средств, предполагает знания специалиста в области не только применения, но и получения медицинских препаратов на основе как тонкой химической технологии, так и биотехнологии.

Сферой интересов специалиста, работающего на рынке лекарственных средств являются следующие разделы биотехнологии:

1. Общая биотехнология лекарственных средств
 - 1.1.биообъекты как средства производства
 - 1.2.особенности процессов биосинтеза
2. Основные процессы и аппараты биотехнологического производства.
3. Частная биотехнология лекарственных средств
 - 3.1.получение наиболее распространенных групп лекарственных средств,
 - 3.2.новейшие биотехнологии с использованием генной инженерии
4. Экономические, правовые и экологические аспекты биотехнологического производства лекарственных средств.

Биосинтез БАВ (биологически активные вещества) в условиях производства.

1. Создание стерильных условий для биосинтеза

Биосинтез БАВ – это многостадийный процесс. Для успешного осуществления биосинтеза необходимо использовать простерилизованный воздух, стерильную питательную среду и оборудование.

БИОСИНТЕЗ	→	Стерильное оборудование
	→	Стерильная питательная среда
	→	Стерильный воздух

Биосинтез осуществляется с использованием жидкой питательной среды, т.е. используется глубинное культивирование.

Биосинтез микроорганизмов осуществляется в ферментерах различной емкости от 100 литров(1м. куб.) до 10000 литров (100 м. куб.).

Стерилизация воздуха осуществляется методом фильтрации, т.е. из воздушного потока удаляют микроорганизмы с помощью фильтров. Стерилизация питательных сред осуществляется термическим способом прямо в ферментере или в отдельной емкости.

Продуцент может храниться разными способами, например, на скошенном агаре, с поверхности которого он переносится в колбы с жидкой питательной средой. После накопления биомассы и проверки культуры на чистоту 0,5-1% посевного материала переносится в инокулятор. В нем происходит рост и деление микроорганизмов. Из инокулятора 2-3% материала переносится в посевной аппарат. Из посевного аппарата 5-10% посевного материала переносится в ферментер.

2. Параметры, влияющие на биосинтез (физические, химические, биологические)

1. Температура

- бактерии	—	28°
- актиномицеты	—	26-28°
- грибы	--	24°

2. Число оборотов мешалки (для каждого м/о (микроорганизмы) — разное число оборотов, разные 2х, 3х, 5-ти ярусные мешалки).

3. Расход подаваемого на аэрацию воздуха.

4. Давление в ферментере

5. pH среды

6. Парциальное давление растворенного в воде кислорода (количество кислорода)

7. Концентрация углекислого газа при выходе из ферментера

8. Биохимические показатели (потребление питательных веществ)

9. Морфологические показатели (цитологические) развитие клеток м/о, т.е. надо следить в процессе биосинтеза за развитием м/о

10. Наличие посторонней микрофлоры

11. Определение в процессе ферментации биологической активности

Для проведения ферментации необходимо добавлять пеногасители — жиры (рыбий жир, синтетические жиры. В процессе ферментации в результате метаболизма м/о образуется пена.

3. *Виды процессов биосинтеза.*

Процесс биосинтеза подразделяют на:

- периодический,
- полупериодический,
- непрерывный,
- многоциклический.

1. *Периодический процесс* –

это такой процесс, когда в ферментер подается посевной материал, задаются определенные технологические параметры (температура, pH, обороты мешалки) и процесс проходит самостоятельно с образованием целевого продукта. Этот процесс экономически не выгоден, т.к. образуется мало целевого продукта.

2. *Полупериодический процесс или регулируемая ферментация.*

- отличается от периодического процесса тем, что в процессе ферментации в ферментер добавляются различные питательные вещества (источники углеводов, азота), регулируется pH в процессе ферментации, добавляется предшественник в определенный момент ферментации. Полупериодический процесс является экономически выгодным, имея большой выход продукции.

3. *Непрерывный процесс*

Сущность которого в том, что из ферментера в процессе биосинтеза берется определенное количество культуральной жидкости и вносится в другой ферментер, в котором тоже начинается биосинтез. Культуральная жидкость выполняет функции посевного материала. В ферментер, из которого взяли часть культуральной жидкости, добавляется такое же количество воды и процесс биосинтеза в нем продолжается. Эта операция постоянно повторяется. Используя необходимое количество ферментеров и постоянно перенося часть культуральной жидкости из одного ферментера в другой достигается замкнутый цикл. Преимущество непрерывного процесса в том, что сокращается стадия выращивания посевного материала.

4. *Многоциклический процесс*

заключается в том, что в конце ферментации 90% культуральной жидкости сливается из ферментера, а оставшаяся часть выполняет роль посевного материала.

Лекция 2.

АНТИБИОТИКИ

План лекции:

1. Значение антибиотиков и понятие антибиотиков
2. Возникновение антибиотиков
3. Беталактамы антибиотиков
- 3.1 Продуценты беталактамов антибиотиков
4. Группы антибиотиков, образуемых актиномицетами
- 4.1. аминогликозиды
- 4.2. тетрациклины
- 4.3. макролиды
- 4.4. левомицетин
5. Противогрибковые (полиеновые антибиотики)
6. Противоопухолевые антибиотики
7. Определение антимикробной активности антибиотиков
8. Условия ферментации антибиотиков
9. Рост биомассы антибиотиков
10. Предшественники беталактамов антибиотиков
11. Механизмы защиты продуцентов от антибиотиков
12. Ретроингибирование антибиотиков
13. Механизмы развития резистентности у бактерий к антибиотикам
- 13.1. плазмидная резистентность
14. Борьба с резистентностью
- 14.1 антибиотики резерва (ванкомицин, тейкопланин, ристомин и др.)
- 14.2 антибиотики с ингибиторами беталактамаз микроорганизмов
- 14.3 Пенициллинсвязывающие белки (ПБС-2, ПБС-3).

Стоимость годовой продукции антибиотиков – 19 миллиардов \$. Выпускаются антибиотики на рынок ежегодно сотнями тысяч тонн. Антибиотики изменили микрофлору человека. За 50 лет развития антибиотиков возросла резистентность микроорганизмов (м/о) к ним.

Антибиотики являются «средством преодоления стрессовых ситуаций» для м/о. Антибиотики для почвенных м/о являются не только средствами борьбы, они также являются низкомолекулярными «эффе́кторами» м/о; с их помощью м/о меняет свой метаболизм при неблагоприятных условиях (например, спорообразование).

Гипотезы возникновения антибиотиков.

1. При происхождении жизни на земле антибиотики являлись стимуляторами или ингибиторами процесса матричного синтеза – они являлись «реликтовыми молекулами» у первичных форм жизни. Но при возникновении рибосом, появились другие регуляторы, они оказались вытесненными и сохранились только у некоторых м/о. У этих м/о из стимуляторов синтеза белка они превратились в ингибиторы.
2. Антибиотики – случайные продукты м/о. Плазмида – кольцевая ДНК – циркулирует по микробным популяциям. При передаче плазмиды другому м/о в результате рекомбинаций и мутаций могут синтезироваться «случайные вещества», из которых образовались антибиотики.

Антибиотики являются веществами, которые вырабатываются одними м/о и подавляют рост других м/о или опухолевых клеток.

Полусинтетические антибиотики – это природные антибиотики, модифицированные ферментативным или химическим путем.

b-лечтамные антибиотики.

- пенициллины

-цефалоспорины.

На основе *chrysogenum* получены полусинтетические антибиотики из пенициллина – полусинтетические пенициллины: оксациллин, карбенициллин; из цефалоспоринона С – цефалоспорины I, II, III, IV поколения.

Первичные метаболиты (предшественники) *b-лечтамных антибиотиков* – три

аминокислоты: цистеин, валин, аминокадипиновая кислота.

Продуцентами пенициллинов и цефалоспоринов являются **грибы**.

Penicillium chrysogenum (пенициллины)

Ascremonium chrysogenum (цефалоспорины).

Грибы – это организмы, которые имеют ядра, митохондрии, клеточную стенку, содержащую хитин, имеют сложный цикл развития. Помимо антибиотиков грибы используют для получения иммунодепрессанта – циклоспоринона (продуцент – *Tolypocladium inflatum*), фузидина – антибиотика, в основе которого лежит стероидное ядро сердечных гликозидов (продуцент – гриб *Fusidium coccineum*).

Дрожжи являются продуцентами витаминов и ферментов.

Механизм действия) b-лечтамных антибиотиков. Они ингибируют синтез пептидогликана клеточной стенки на последнем этапе, подавляя активность

фермента *транспептидазы*. Транспептидазы соединяют концы пептидных цепочек, на концах которых находится D-аланин, а *b-лехтамные антибиотики* являются аналогами D-аланина и связываются с активным центром фермента, тем самым инактивируя его. В результате пептидные цепочки не замыкаются.

Актиномицеты – это многоклеточные бактерии. Актиномицеты не имеют ядра (вместо ядра имеется одна замкнутая нить ДНК), т.е. актиномицеты – прокариоты, не имеют митохондрий, имеют сложный цикл развития.

Всего имеется 12 тысяч природных антибиотиков, из них 9 тысяч антибиотиков продуцируют актиномицеты. Актиномицеты продуцируют антибиотики, ингибирующие синтез белка на рибосомах бактериальных клеток. Такой же механизм у противогрибковых и противоопухолевых антибиотиков. Актиномицеты продуцируют следующие группы антибиотиков:

Аминогликозиды – ингибируют синтез белка у бактерий, связываясь с малой рибосомной субъединицей, нарушая правильность считывания кодонов информационной РНК (иРНК) антикодонами транспортной РНК (тРНК).

-канамицин - *Actinomyces kanamycetus*

-неомицин - *Actinomyces iracie*.

Тетрациклины ингибируют белковый синтез, связывая аминоксил –тРНК с рибосомно-матричным комплексом,

-окситетрациклин – *Actinomyces ninesus*/

макролиды гр. эритромицина – связываются с большой субъединицей рибосомы.

пиранозиды (группы линкомицина – сходны с макролидами, они связываются с большой субъединицей рибосомы.

- линкомицин – *Streptomyces linconiensis*/

левомицетин (получают химическим путем) – ингибирует пептилтрансферазу большой рибосомальной субъединицы.

Природный левомицетин (хлорамфеникол) продуцируется *Streptomyces venezuelae*.

Рифамицин – *Streptomyces mediterranei*, на основе рифамицина получен рифампицин.

Рифампицин подавляет активность ДНК-зависимую РНК-полимеразу и тем самым блокирует синтез белка на уровне транскрипции.

противогрибковые - (полиеновые) антибиотики – образуют поры в цитопластической мембране грибов, взаимодействуя с ее стерольным компонентом (эргостеролом). (рис.)

- нистатин - *Streptomyces noursei*

- леворин – *Actinomyces levorus*

- амфотерцин - *Streptomyces nodosus*

противоопухолевые антибиотики - угнетают синтез нуклеиновых кислот клеток микро- и макроорганизмов.

- брунеомицин – *Actinomyces albus* var *bruneomycini*

- митомицин – *Streptomyces caespitosus*.

Бактерии – также способны к образованию антибиотиков. Образуют антибиотики и большинство бацилл, которые являются спорообразующими бактериями. В медицине применяют *полимиксины*, продуцируемые спорообразующими почвенными бактериями *Bacillus polymyxa*.

Полимиксины (полимиксин, грамицидин) по химическому строению являются сложными соединениями, включающими остатки полипептидов. Они нарушают развитие цитоплазматической мембраны у бактерий, повышают ее проницаемость.

Определение антимикробной активности антибиотиков

Для определения антимикробной активности антибиотиков используют тест-микроорганизмы, в качестве примеров которых можно привести:

Aspergillus niger

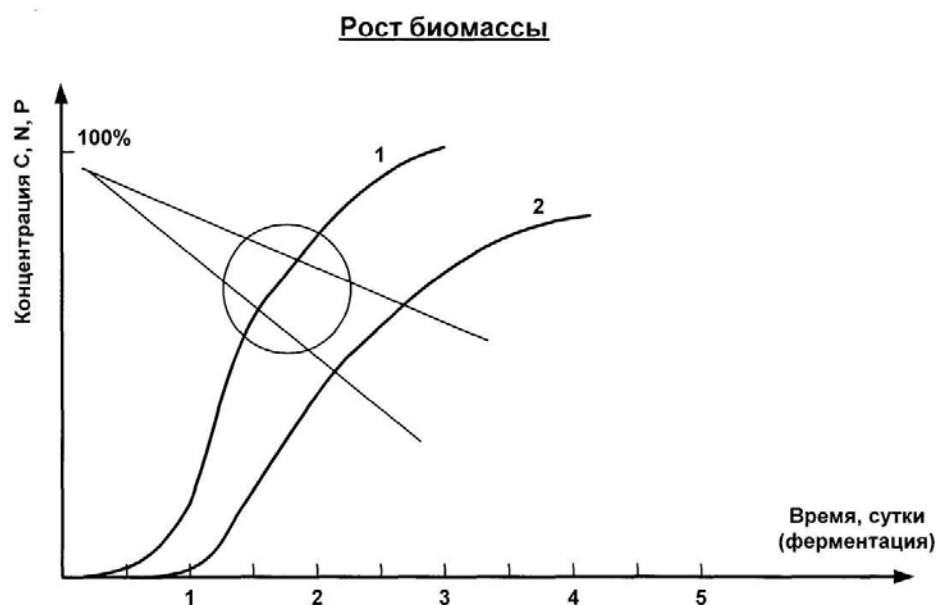
Bacillus subtilis

Pseudomonas aerogenosa.

Определение активности антибиотиков проводится методом биологического титрования. Существует так называемый трехдозный метод с использованием испытуемого и стандартного раствора (раствора). Метод описан в ГФ XI, т.2. Применяется также и однодозный метод – с использованием стандартной кривой по логарифмической сетке. Более подробная информация по этому вопросу будет представлена в практической части.

Антибиотики – вторичные вещества, т.е. они не всегда выделяются микробной клеткой. Задача биотехнолога состоит в подборе концентрации питательных веществ в среде таким образом, чтобы не было слишком большого роста биомассы, но антибиотик бы продуцировался в достаточных количествах.

Условия ферментации.



1. Биомасса продуцента (образуется быстро).
2. Концентрация антибиотика.

Рис.2.

- в среде не должно быть глюкозы (нельзя использовать легко усвояемые источники углеводов), используют трудно усвояемые источники углеводов — например, крахмал.
- в качестве источника аммонийного азота используют соевую муку;
- должна быть небольшая концентрация фосфора.

Любые предшественники для получения антибиотической структуры надо добавлять не в «0» точке ферментации, а на 2-е, 3-и сутки (если продуцент — грибы или актиномицеты), когда антибиотики начинают синтезироваться (это относится, например, и к фенилуксусной кислоте (ФУК) при синтезе пенициллина, которую добавляют на вторые или третьи сутки биосинтеза пенициллина).

Предшественники β -лактамных антибиотиков.

β -лактамные антибиотики синтезируются из аминокислот L-цистеин, L-валин, L-аминоадипиновая кислота, из которых синтезируется LLD-трипептид (L-валин превращается в D-валин). Из линейного LLD-трипептида образуется лактамное кольцо, затем образуется пятичленное серосодержащее кольцо и т.д. Антибиотики не являются продуктом матричного синтеза.

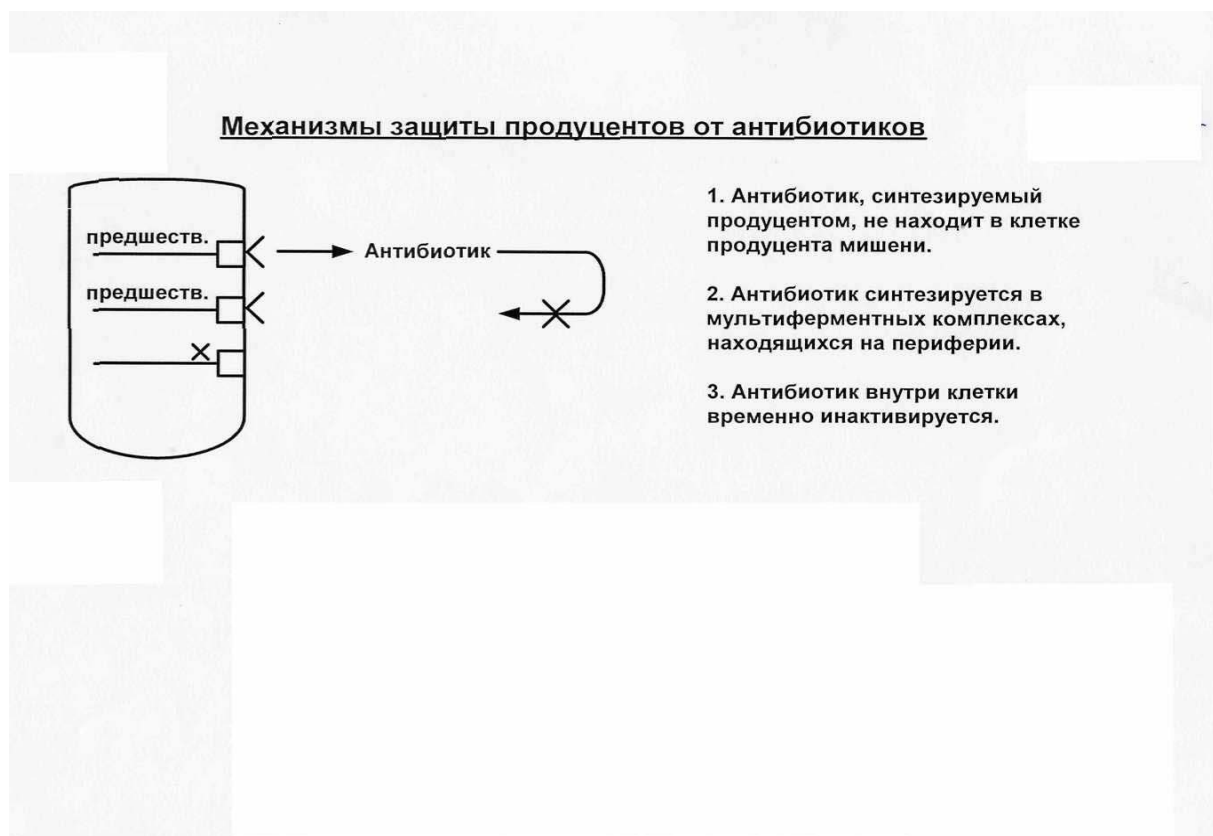
Аминогликозиды синтезируются из глюкозы.

Тетрациклины и макролиды синтезируются с помощью ацетилкоэнзима А (Ац-КоА) наподобие жирных кислот (с участием приблизительно 22-х ферментов).

Ферменты синтезирующие антибиотики образуют мультиферментные комплексы (за счет водородных связей), в которые «входят» предшественники антибиотика, а «выходит» целая молекула антибиотика (во внешнюю среду). Эти комплексы располагаются по периферии клетки продуцента. Таким образом, антибиотики отделяются от других систем синтеза в клетке, и антибиотик никак не воздействует на свой продуцент (не ингибирует и не активирует другие процессы). К тому же мембраны продуцента непроницаемы для вышедшего продуцента, тем самым создавая условия одностороннего движения антибиотика только во внешнюю среду. Представить схему.

Механизмы защиты продуцентов от антибиотиков.

Рис.3.



1. антибиотик, синтезируемый продуцентом, не находит в клетке продуцента мишени (например, это грибы, синтезирующие β -лактамные антибиотики);
2. антибиотик синтезируется в мультиферментных комплексах, находящихся на периферии и отделенных от других жизненно важных систем клетки;

3. находящийся внутри клетки антибиотик временно инактивируется с последующей активацией при выходе из клетки (например, неомицин фосфорилируется в клетке фосфатазой мембраны). По выходе из клетки, он дефосфорилируется и активизируется.

Ретроингибирование – это ингибирование синтеза по механизму обратной связи.

Очень важно бороться с ретроингибированием.

Механизм ретроингибирования антибиотиков

Рис. 4.



Когда аминокислота накапливается в достаточном количестве для клетки, она начинает реагировать с первым ферментом цепочки (ключевым ферментом), связывается с его *аллостерическим центром*, в результате чего изменяется структура активного центра фермента и синтез прекращается. Когда концентрация аминокислоты снижается, синтез начинается снова. Если лизина в клетке много, он также может выключить процесс своего образования, а так как аминокислота – его предшественник и образуется с лизином в одном метаболическом пути, то ее образование также прекращается. Биотехнологу для достижения большого выхода целевого продукта следует работать со штаммами, где разрегулирована (нарушена) система ретроингибирования.

Механизмы развития резистентности у бактерий.

Плазмиды – носители генов информации (всего около 30 генов). Плазмиды автономно реплицируются (размножаются) независимо от деления клетки. Плазмиды могут содержать гены резистентности (устойчивости) к разным антибиотикам. Плазмиды с генами резистентности легко передаются из клетки в

клетку при конъюгации микроорганизмов. При этом двойная нить плазмиды расходится на две отдельные нити и одна остается в клетке донора, а другая передается реципиенту. Особенно часто это явление наблюдается в больницах (внутрибольничная инфекция). Конъюгация м/о может быть не только внутривидовой, но и межвидовой и даже межродовой; возможна «вспышка» - вся микрофлора может стать резистентной к антибиотикам. Схема развития плазмидной резистентности.

Первоисточник генов резистентности находится в почве у почвенных микроорганизмов – продуцентов антибиотиков. Они могут передаваться через промежуточных хозяев патогенным микроорганизмам.

Борьба с резистентностью микроорганизмов.

1. β -лактамы инактивируются β -лактамазами, которые расщепляют их β -лактамное кольцо. Основной путь борьбы с β -лактамазами – создание молекул, которые не захватываются активным центром β -лактамаз. Создают полусинтетический антибиотик (например, оксациллин или метициллин), которые не чувствительны к пенициллазам.

Механизм создания полусинтетических пенициллинов:

- а) отщепление бензильного радикала (остается о-аминопенициллановая кислота – 6АПК).
- б) введение других радикалов химическим путем.

Так же идет работа с цефалоспоридами: радикалы присоединяют к 7-аминоцефалоспориновой кислоте (7АЦК).

После того как новые антибиотики внедряются в практику, они становятся селективным фоном отбора для резистентности микроорганизмов, таким образом постепенно создаются резистентные штаммы.

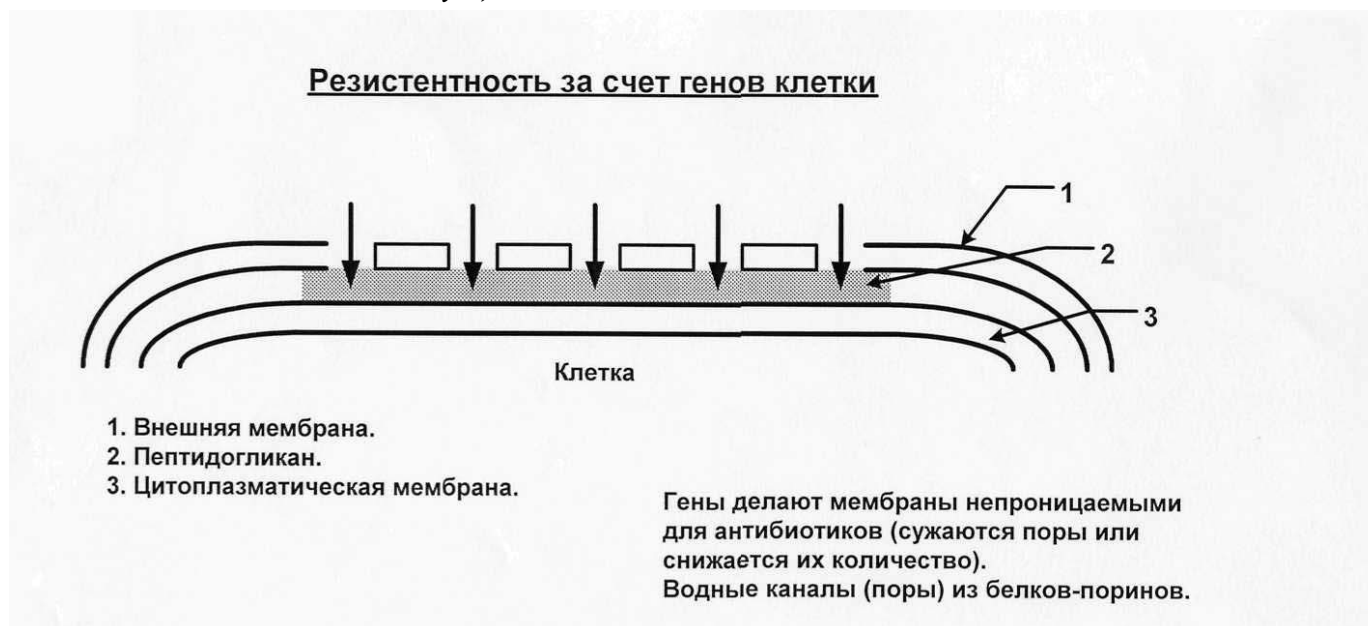
2. Создание ингибиторов β -лактамаз, созданы комбинированные препараты, содержащие антибиотик и ингибитор β -лактамаз.

Уназин (ампициллин + сульбактам - ингибитор пенициллазы).

Амоксиклав (амоксциллин + клавулановая кислота – ингибитор пенициллазы).

Аугментин (амоксциллин + клавулановая кислота но в другом соотношении).

Резистентность может существовать также за счет генов клетки **Рис.5**.



У некоторых клеток есть гены, которые делают мембраны непроницаемыми для антибиотиков (сужаются поры или снижается их количество).

Способы борьбы с этой резистентностью

1. Создан β -лактамный антибиотик **Имипинем**, который в растворе образует цвиттер-ион, меньший по размерам, чем пенициллин и легко проникает через узкие пориновые каналы.

2. Могут быть созданы структуры, которые проникают не через пориновые каналы, а другим способом, например, с помощью имитации структуры переносчика. Есть цефалоспорин, имитирующий переносчик железа и, попадая в клетку, он угнетает синтез пептидогликана, ингибируя транспептидазу).

-цефалоспорины III поколения не расщепляются β -лактамазами, но они являются индукторами выработки β -лактамаз,

- цефалоспорины I поколения (**Цефепим**) не являются индукторами β -лактамаз.

3. аминогликозидный антибиотик **Амикацин** имеет фрагмент гаммаоксимасляной кислоты в структуре канамицина защищающий этот антибиотик от инактивации со стороны изоферментов этого антибиотика, поэтому этот антибиотик отличается высоким терапевтическим эффектом.

Представить схему амикацина и других антибиотиков.

Теория взаимозаменяемости антибиотиков.

В настоящее время есть 4 группы антибиотиков широкого спектра действия (β -лактамы, аминогликозиды, фторхинолоны тетрациклины). Если попробовать запретить применение одной группы (например, группы №1) антибиотиков, то резистентность к ним исчезает через 10 лет. После возобновления применения 1-ой группы, запрещают применение 2-ой группы и т.д.

Но сейчас нельзя исключить ни одной группы антибиотиков из практики лечения, так как достаточно активных и безопасных антибиотиков еще не хватает и требуется создавать новые и новые группы, но, со временем, наверное, можно применить такую схему чередования разных групп антибиотиков для повышения терапевтического эффекта.

*Известно, что в разных частях бактериальной клетки транспептидаза пептидогликана как белок неодинакова, с другой стороны, все многочисленные антибиотики имеют одинаковый механизм действия на патогенный микроорганизм, поэтому в рекомендациях по применению антибиотиков различного характера имеется информация по взаимодействию их с пенициллинсвязывающими белками (ПБС). Эта рекомендация связана с иммунитетом человека, принимающего антибиотики. Если есть информация в рекомендациях по применению, что новый антибиотик связывается с **ПБС-2**, то это означает, что клетка микроорганизма будет активно лизироваться и освобождающиеся полисахариды в большом количестве будут поступать в кровь, что в свою очередь работает как пирогенный фактор и ведет к повышению температуры больного на короткое время. Такие антибиотики могут быть рекомендованы больным с невысоким уровнем иммунитета (например, это больные СПИДом). Если же есть информация о **ПБС-3**, то это означает, что в результате действия такого антибиотика бактериальная клетка только временно перестает делиться, оставаясь живой и после отмены этого антибиотика, она начинает снова свое размножение с большой активностью и с опасностью возникновения новой инфекции. Для людей с низким иммунитетом применение таких антибиотиков опасно. Реализуя в продаже тот или иной антибиотик, вы должны предупреждать врачей о таком факте.*

Лекция 3.

СЛАГАЕМЫЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА. СТРУКТУРА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА.

План лекции

1. Общие положения
2. Схема производственного биотехнологического процесса
3. Подготовительные операции
 - 3.1 выращивание посевного материала
 - 3.2 стерилизация технологического воздуха
 - 3.3 стерилизация оборудования
 - 3.4 стерилизация питательных сред
4. Классификации биосинтеза:
 - 4.1. по организации материальных потоков
 - 4.2. по типу целевого продукта
 - 4.3. по типу ферментации
5. Кривая роста микроорганизмов при полупериодическом режиме культивирования
6. Параметры, влияющие на биосинтез (механические, физические, химические, биологические)
7. Требования к продуцентам
8. Решения экологических проблем (предупреждение попадания продуцента во внешнюю среду).

Биотехнологическое производство имеет разную степень сложности по протяженности технологических цепей.

Рис.6.



Например, быстрое производство, когда целевой продукт - это биомасса (получение дрожжей, при получении бифидумбактерий. Отдаленный процесс, если конечный продукт – это лекарственный препарат (например, антибиотики), то в этом случае технологических стадий будет больше.

1. Стадия биосинтеза в биотехнологическом производстве имеет разную степень сложности: например, культивирование нестойкого рекомбинантного продуцента (высокая степень сложности), а использование лошади для выделения антител из крови после ее иммунизации (для получения сыворотки) – несложный процесс.
2. Любой биообъект требует условий для создания продукта:
 - 2.1 условия для поддержания его жизнедеятельности
 - 2.2 условия для синтеза целевого продукта
 - 2.3 предотвращение контакта с посторонней микрофлорой, когда необходимо защищать продуцент от конкуренции.

Биосинтез в ферментере может осуществляться только тогда, когда в ферментере имеется продуцент и он освобожден от посторонних микроорганизмов.

Ферментер – это аппарат для проведения ферментации и в тоже время это техногенная экологическая ниша. Существует такое название как «обвязка ферментера», представляющая все основные рабочие узлы этого аппарата:

- мешалка, для равномерного распределения всех продуктов среды,
- тепловая рубашка для обогрева,
- отбойники, препятствующие образованию «мертвых зон», то есть недоступных зон для регулирования ферментационного процесса,
- слив для культуральной жидкости для последующего выделения целевого продукта,
- барботер с воздухом для аэрации процесса ферментации,
- клапаны для входа и выхода воздуха,
- входное отверстие для загрузки ферментера.

Кривая роста микроорганизмов при полупериодическом, регулируемом режиме культивирования

Изображение кривой на рисунке.

По оси ординат откладываем концентрацию клеток микроорганизмов (рост микроорганизмов), по оси абсцисс – время роста микроорганизмов. На рисунке мы видим шесть фаз такого роста.

1. **Фаза приспособления, или так называемая фаза адаптации микроорганизмов, или лаг-фаза.** В этой фазе нет деления и соответственно роста микроорганизмов, но есть увеличение количества белков, как ответная реакция на новые условия их существования.
2. **Фаза ускоренного роста (переходная фаза).** В этой фазе повышается содержание белков, РНК, нуклеиновых кислот, происходит уже деление клетки.

3. Эта фаза называется логарифмической фазой роста (экспоненциальная кривая), когда компонентов питания достаточно и биообъект полностью адаптирован к условиям в ферментере. Идет аэрация.
4. Фаза замедленного роста клеток. В этой фазе число клеток сокращается, так как и число делений сокращается. Уменьшается скорость роста микроорганизмов, так как по мере наращивания биомассы уменьшаются компоненты питательной среды. Клетки лизируются, происходит автолиз клетки и они начинают уничтожать своих соседей (одни клетки съедают другие).
5. Фаза стационарная, когда количество живых клеток сохраняется за счет умерших и не происходит роста биомассы.
6. Фаза гибели клеток, когда число погибших клеток больше, чем живых.

Однако, если в «лаг-фазе» добавить источник углерода (например, лактозу), то все повторится. Поэтому можно использовать несколько источников питания, но добавление это делать в логарифмической фазе роста клеток. Если ферментационная среда не очень отличается от посевной среды, то обычно берут 5-10% питательной среды во избежание появления слишком большого количества метаболитов – отработанных веществ, засоряющих эту среду.

Различия ферментации для грибов, актиномицетов и бактерий по температуре и времени:

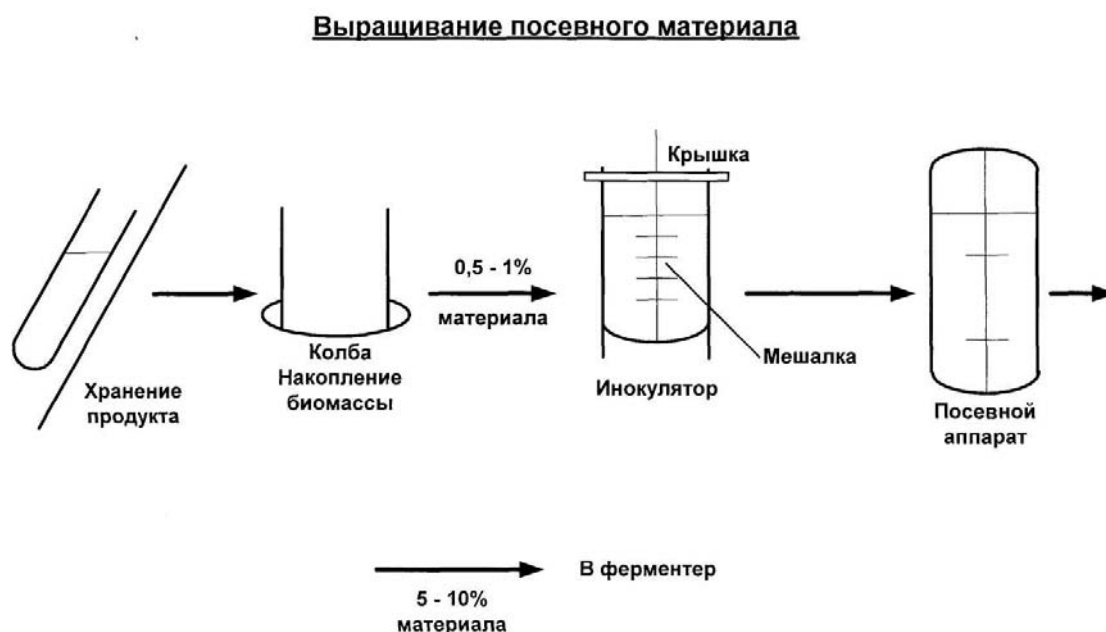
Ферментация грибов – до 7 суток при 24°C

Ферментация актиномицетов – до 5 дней при 26-28°C

Ферментация бактерий – 1-2 суток при 28°C.

Подготовительные операции для синтеза

Рис.7.



1. Выращивание посевного материала

Культуру продуцента хранят

4.1 в запаянных ампулах

4.2 в жидком азоте

4.3 на твердых носителях – пшено, ячмень, рис.

4.4 в лиофилизированном состоянии – лучше хранятся споры, чем живые клетки

4.5 в ампулах в лиофилизированном состоянии на носителе (пшено, желатин-альгинат натрия)

4.6 в пробирке на скошенном агаре – срок хранения до нескольких месяцев.

1. пробирка с продуцентом на скошенном агаре

2. большое количество колб для выращивания молодой культуры (проверяют чистоту культуры под микроскопом.

3. инокулятор, мешалка

4. посевной аппарат (с контролем)

Такое количество стадий нужно для получения чистой культуры.

Многоэтапное выращивание посевного материала – обязательный принцип биотехнологического производства.

Среда для выращивания посевного материала обычно не совпадает по составу с ферментационной средой, т.е. при выращивании посевного материала среда может быть обогащена для быстрого роста биомассы.

2. Стерилизация технологического воздуха.

Технологический воздух – это воздух, проходящий через ферментер. Через ферментер с объемом 50 м³ (кубических метров за час) пропускается 30000 м³/час (кубических метров за час) воздуха.

Обычный воздух содержит в 1 м³ (метр кубический) от 1 тысячи до 100 тысяч клеток микроорганизмов. Воздух стерилизуют только **фильтрацией**, пропуская его через систему фильтров, другие способы (УФ, термические) не подходят, так как нужно стерилизовать очень большие объемы воздуха.

Технологическая схема получения стерильного воздуха:

Воздух с улицы поступает на → Фильтр предварительной очистки от пыли и влаги, затем поступает на → Компрессор (происходит сжатие воздуха, при этом воздух нагревается), затем - на → Холодильник (для охлаждения воздуха, поступившего от компрессора, затем) → Воздух под

давлением проходит через головной фильтр и подается на →
Индивидуальный фильтр (у каждого ферментера).

Индивидуальные фильтры не должны пропускать более 0,25 микрона (мкм) микроорганизмов.

Размеры микроорганизмов. - кокки составляют 0,5-1,5 мкм, кишечные палочки – 0,4- 0,8 мкм.

Существует коэффициент проскока, поэтому фильтры 100% стерилизацию дают не всегда.

Фильтры стерилизуются острым паром при 120° С 30 мин.

3. Стерилизация и герметизация оборудования.

Ферментер и все трубопроводы стерилизуют насыщенным паром при 130° С 1 час. Для проверки эффективности стерилизации проводят пробную стерилизацию с использованием биологического теста.

4. Стерилизация питательных сред

Водопроводная вода содержит до 100 микробных клеток в 1 миллилитре. Компоненты питательной среды – источники углерода, азота, содержат в 1 грамме муки от 10000 до 1 миллиардов клеток микроорганизмов. **Питательную среду стерилизуют термическим нагреванием**, но при этом могут инактивироваться термолабильные соединения, витамины и др. Поэтому для каждой среды имеются свои условия стерилизации. Стерилизация – процесс вероятностный.

Классификация биосинтеза по технологическим параметрам

I. По принципу организации материальных потоков (см лекция I)

II. Классификация по виду целевого продукта

1. Получение **биомассы**
2. Получение **метаболитов** (первичных – витамины, аминокислоты, вторичных - антибиотики)

III Классификация по типу ферментации

1. **Глубинный биосинтез** (по всему объему ферментера) – широко используется.
2. **Поверхностный биосинтез** (продуцент растет по поверхности среды)

Параметры, влияющие на биосинтез (см. лекция 1)

Требования к продуцентам

1. Безвредность.
2. Устойчивость к фагам и вирусам
3. Активность биосинтеза, скорость роста и накопление биомассы.
4. Стабильность по производительности.
5. Чувствительность к условиям культивирования (аэрация, pH (кислотность среды), температура).
6. Потребность в источниках углеводов и азота.
7. Использование дешевых и доступных питательных сред.
8. Соответствие условиям промышленного производства (отсутствие неприятного запаха, не слишком большая вязкость его среды).

Способы предупреждения попадания продуцента в окружающую среду.

После использования культуральной жидкости ее стерилизуют и только после этого смешивают со сточными водами.

В геноме многих продуцентов имеется дополнительная потребность в азоте и они могут размножаться только на хороших питательных средах, поэтому при выходе из ферментера они уже размножаться не могут.

Продуцент делают капризным, то есть зависимым от какого либо вещества питательной среды, без которого он размножаться не может (например, это может быть также какая-либо витаминная добавка)

Лекция 4.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ БИООБЪЕКТОВ-ПРОДУЦЕНТОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ПРОИЗВОДСТВЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ МЕТОДАМИ МУТАГЕНЕЗА И СЕЛЕКЦИИ.

План лекции:

1. Биообъект как средство производства лекарственных, профилактических и диагностических препаратов:
 - 1.1.Классификация биообъектов
 - 1.2.Технологии получения лекарственных средств (преимущества новых технологий)
 - 1.3.Варианты использования биообъектов
 - 1.4.Свойства биообъекта для его совершенствования
2. _Селекция микроорганизмов
3. Мутагенез и методы выделения мутантов
 - 3.1.Клоновые культуры
 - 3.2.Типы мутаций
 - 3.3. Реверсии мутантов
 - 3.4. Мутосинтез, блок-мутанты, мутосинтоны
3. Цели биотехнолога при совершенствовании биообъекта.

Количество биообъектов, используемых в биотехнологическом производстве при изготовлении и получении лекарственных препаратов очень много.

Например, в роли биообъекта может выступать человек-донор. С его помощью производят гомологичную иммунную плазму (антистафилококковую, противокоревую, эритроцитарную и лейкоцитарную массу для трансфузий и так далее)

В роли биообъекта может выступать животное (лошадь, олень, корова, свинья, курица, кролик и так далее). С их помощью обеспечивается промышленное производство инсулина, панкреатина, лизоцима, пантокрина, антитоксических сывороток, вирусных вакцин и так далее.

В качестве биообъекта можно использовать различные растения. Например, почки и однолетние побеги тополя представляют сырье при изготовлении простагландинов, смола сосны – это полупродукт получения скипидара,

смола пихты – это сырье для бальзамов, камфорное дерево – сырье для получения камфоры и так далее.

В качестве биообъектов широко используются и микрообъекты – это прокариоты (сине-зеленые водоросли, бактерии, вирусы, бактериофаги, актиномицеты) и – эукариоты (простейшие, водоросли, грибы, плесени, дрожжи)

Например, использование клеток плесени при производстве антибиотиков, а клеток дрожжей – при производстве эргостерина (предшественника витамина Д), бетакаротина (предшественника витамина А) и так далее. Прокариоты - бактерии как биообъекты используются в производстве, например, витамина цианокобаламина (витамина В₁₂).

Обобщая все это, можно сказать, что в целом к биообъектам, используемым в производстве лекарственных средств относятся:

1. макроорганизмы растительного и животного происхождения
2. грибы, бактерии, вирусы, культуры клеток эукариот, биологические макромолекулы с информационной (ДНК, РНК), или функциональной активностью (ферменты, биокатализаторы).

Что касается новых технологий биотехнологического производства, то особое место в биотехнологии занимают биообъекты растительного происхождения, используемых для получения культур клеток таких как каллусные (выращивание клеток на твердой поверхности) и суспензионные культуры (выращиваемые в жидких средах). Слово «каллус» обозначает «грубый нарост», «мозоль» как сообщество клеток на поврежденной ткани растения.

Новые технологии получения лекарственных средств используются и на основе клеток животных организмов. Например, на культуре клеток почек зеленых мартышек (обезьян) и фибробластов (донорская кровь) человека усовершенствовано производство осповакцины и вакцины против полиомиелита, что позволило обеспечить население всего мира качественными профилактическими препаратами и ликвидировать натуральную оспу, свести к минимуму такое заболевание как полиомиелит. Успешно работает сегодня и технология получения интерферона, основанная на культивировании лейкоцитов человека из донорской крови.

Для биообъектов из микромира характерно достаточно быстрое размножение (вирусы, бактериофаги). Деление дрожжей происходит 1 раз в 90 -120 минут, а бактерий 1 раз в 20 - .60 минут.

Применение новых технологий при получении биологически активных веществ (БАВ) из растительного сырья при сравнении их со сбором дикорастущих растений или выращиванием на плантациях, имеет следующие преимущества:

1. контроль качества сырья
2. выделение (экстракция) и очистка продукта
3. концентрирование
4. стабилизация производства
5. возможность приготовления готовой формы медицинского препарата

Все это решает проблемы рентабельности производства, стоимости продукции (снижение), и экологичности производства.

Какие существуют варианты использования биообъектов?

Известно несколько вариантов использования биообъектов в производстве лекарственных средств.

- Самый распространенный (широко известный) из объектов микромира основан на получении биомассы с последующим ее использованием в качестве полупродукта или целевого продукта. Так готовят нормофлоры, колибактерин, бификол, некоторые вакцины, диагностические бактериофаги.
- Другой вариант - использование продуктов жизнедеятельности биообъектов из микромира, которые накапливаются в среде их выращивания. Так получают аминокислоты, витамины, ферменты, антибиотики. Разновидностью этого варианта можно считать **биотрансформацию**, когда биотехнолог использует биообъект для проведения конкретной биохимической реакции на каком-то этапе производства лекарственного средства. Например, это применение уксусно-кислых бактерий в производстве витамина С (стадия перевода сорбита в сорбозу), микобактерии – в производстве стероидов (на этапе превращения ситостерина в 17-кетоандростан), и так далее.
- Третий вариант использования биообъектов из микромира, суть которого состоит в его иммобилизации, что дает следующие преимущества:
 1. повышения стабильности и устойчивости микроорганизма как продуцента,
 2. автоматизации процесса
 3. снижение затрат на выделение и очистку получаемых продуктов реакции (удешевление производства).

Для иммобилизации используют гели, мембраны, волокна, инертные микрочастицы. Технология иммобилизации включает приемы механической, физической или химической обработки. Иммобилизуют как жизнеспособные биообъекты, так и поврежденные.

Сочетание уникальных каталитических свойств ферментов с водонерастворимостью в иммобилизованном виде послужило основой для возникновения нового поколения лекарственных средств (в целях терапии иммобилизованными ферментами; а также появление новых диагностикумов) В терапии иммобилизованные ферменты применяются при лечении острой сердечной недостаточности, тромбообразовании («стрептодеказа») и как биосенсоры в составе биоэлектродов для анализа биожидкостей (кровь, моча и другие) на наличие этанола, пенициллина, глюкозы и других биологически активных веществ.

Свойства биообъекта для его совершенствования соответствуют требованиям, предъявляемым к продуценту. Смотри лекцию №3.

Повышение продуктивности микроорганизма как продуцента сводится к селекции и мутагенезу. Селекционная работа с микроорганизмом состоит **в поиске природных форм**, которые обладают какими-либо полезными для человека свойствами (например, синтез БАВ, высокая скорость роста, способность усваивать дешевые среды и так далее,

в дальнейшем совершенствовании его,

в создании на его основе промышленных штаммов.

Методы современной селекции – это генетическое конструирование, когда можно изменить генетическую программу микроорганизма.

Генетическое конструирование в живой клетке *in vivo* включает получение и выделение мутантов с использованием различных способов обмена наследственной информацией живых микробных клеток.

Генетическое конструирование *in vitro* основано на применении генетической инженерии, которая манипулирует выделенной из организма ДНК.

Каждый организм имеет свой генотип и фенотип

Биотехнолог для совершенствования биообъекта использует:

- наследственные изменения фенотипа, которое передается по наследству;
- наследственное изменение генотипа.

Мутации различают цитоплазматические (внехромосомные) и ядерные (хромосомные).

Наследственные изменения называются **мутациями** в геноме, но есть и внехромосомные изменения. Таким образом мутации проявляются на субклеточном и молекулярном уровне. Хромосомные мутации включают три основных типа:

1. изменение числа хромосом
2. изменение числа и порядка расположения генов (перестройка хромосом ведет к структурным изменениям)
3. изменения индивидуальных генов (внутригенные изменения)

В селекции микроорганизмов основное значение имеют два последних типа мутаций.

Важной характеристикой мутантов является их способность к реверсии, то есть возвращения к исходному фенотипу (обратное мутирование).

Мутанты, которые появляются в результате реверсии называются **ревертантами**

Современная селекция основана на выделении **клоновых культур**.

Определение клона: *клон – это генетически однородное потомство одной клетки* (это колония, выросшая из одной клетки). ***Клоновая культура, имеющая наследственную однородность, называется штаммом.***

Типы мутаций.

1. Делеция (стирание) – выпадение участков хромосомы или нескольких генов.
2. Дупликация – удвоение генов.
3. Амплификация – умножение отдельных генов или группы генов.
4. Транспозиция - вставка участка хромосомы в новые места на хромосоме.
5. Инверсия – изменение порядка расположения генов на хромосоме, при этом может быть утрата одних функций и приобретение новых.
6. Летальные мутации – это мутации, захватывающие слишком большие участки генома, в результате чего организм погибает.
7. Внутригенные мутации:

- точечные – изменение последовательности нуклеотидов в пределах одного гена.
- транзиция или трансверсия – выпадение или вставка одного или нескольких оснований, например, транзиция – пурин замещается на пурин или пиримидин на пиримидин, трансверсия – пурин замещается на пиримидин.

Точечные мутации приводят к замене одной аминокислоты в белке на другую или к изменению конформации белковой молекулы, что может привести к потере активности фермента. Если белок регулятор или репрессор, то это может привести к повышению выработки целевого продукта продуцентом.

Вывод: *совершенствование биообъекта – это получение биообъектов – продуцентов с мутациями в геноме, которые отличаются от исходного биообъекта в сторону улучшения биотехнологических свойств, в частности, в сторону увеличения образования целевого продукта.*

Классификация биообъектов и возможности целевого воздействия на них

1. Макрообъекты: человек, млекопитающие, рептилии, рыбы, насекомые, растения
2. Микрообъекты:
 - 2.1. Эукариоты – низшие грибы, водоросли (кроме нитчатых)
 - 2.2. Прокариоты – актиномицеты, бактерии, сине-зеленые водоросли.
 - 2.3. Микробиосистемы – ферменты, протопласты.

Человек: у него можно воздействовать только на отдельные гены, но против использования человека как биообъекта в плане мутагенного действия возражает этика.

Человека можно подвергать только ненаследственной иммунизации.

Человека можно использовать:

1. донор крови – необходимо, чтобы человек был здоров, кровь не должна быть заражена, при взятии крови не должен нарушаться гомеостаз.
2. донор органов и тканей (после его смерти).

Человек являет пример, какие продукты можно получать (интерферон, инсулин, гормоны внутренней секреции, разнообразные факторы роста). Вопрос этики препятствует совершенствованию человека как биообъекта.

Млекопитающие: совершенствование млекопитающих как биообъектов сомнительно, хотя в принципе, можно добиться увеличения продукции инсулина поджелудочной железой свиней или крупного рогатого скота.

Рептилии: яд змей лучше собирать весной.

Растения: селекция и отбор – единственный путь их совершенствования до настоящего времени. Чтобы увеличить выход целевого продукта сегодня используют культуры растительных клеток - получают биоженшень, сердечные гликозиды и др.

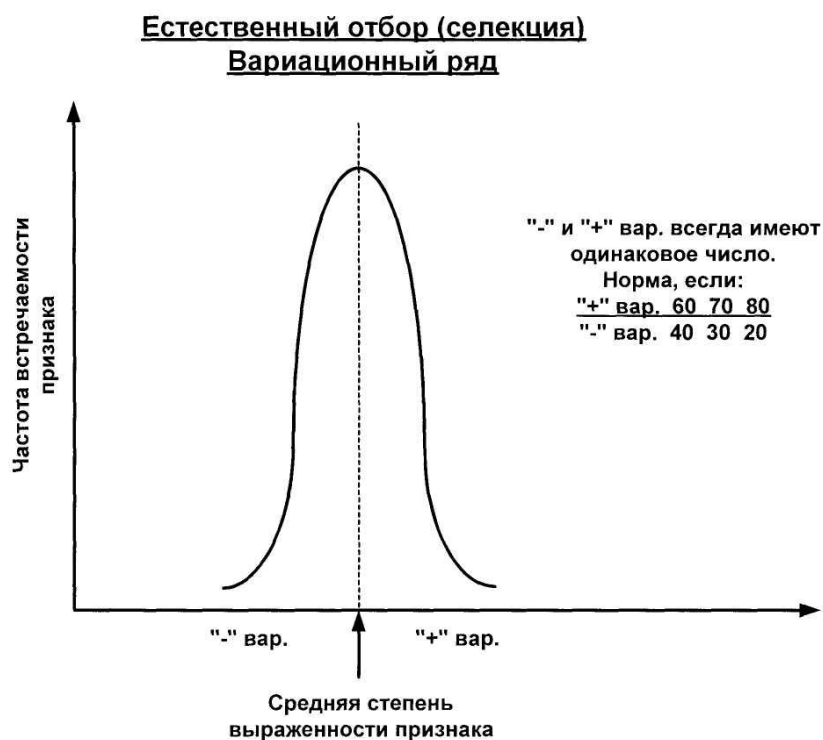
Эукариоты и прокариоты: главные успехи при селекции и отборе получены у микроорганизмов, т.к. они легко размножаются, имеют большое количество мутантов и легче отбирается биообъект с интересующими биотехнолога свойствами. Методом отбора и мутагенеза было достигнуто повышение активности у продуцента пенициллина с 40-х годов в 100 000 раз., стрептомицина в 20 000 раз. Те же результаты получены в работе с продуцентами витаминов и аминокислот.

Существуют традиционные методы совершенствования:

Естественный отбор –селекция.

Нормальная популяция м/о гетерогенна: «+» вариант несет желательный признак», « -» - вариант не несет нужного признака.

Рис.8



Вариации обусловлены *спонтанными мутациями* (неконтролируемые, внезапные или причины которых не установлены). Например, высевают на чашку Петри культуру жрожжей как нужный продукт, они образуют крупные и мелкие колонии. Нас интересуют мелкие колонии и их пересевают, они снова разделяются на крупные и мелкие колонии и эту операцию повторяют несколько раз. Это есть пример многоступенчатого естественного отбора. В результате у первичных колоний и колоний, получаемых после отбора обнаруживается разное соотношение «+» и «-» вариантов (+80/-20) и (+60/-40).

У многих м/о существует система *репарации или возврата* - это обратная мутация или возврат к исходному дикому штамму. Если эта система имеется у м/о, то для преодоления этого явления необходимо

1. отбирать по нужному биотехнологическому признаку
2. отбирать по дефекту репарирования.

Индукцируемый мутагенез - путь совершенствования биообъектов радикальными методами. К таким методам относятся:

- обработка биообъекта химическими мутагенами, нацеленными на ДНК или ДНК-тропными агентами. После этой обработки число мутантов резко возрастает, как «положительных» так и «отрицательных». При этом у части мутантов резко изменяются признаки, причем, чем больше доза мутагена, тем больше и летальных, не нужных мутантов, но одновременно и больше процент выживших мутантов. Необходимо, чтобы сохранялся баланс между летальными мутациями и количеством выживших мутантов.

1. Химические мутагены:

- а) нитрозогуанидин – алкилирует основания в репликативной вилке, вызывает мутации по типу трансверсии, транзиции и делеции,
- б) нитрозометилмочевина – вызывает трансверсию
- в) акридиновые красители (акридиновый оранжевый) – вставка другого гена между основаниями
- г) некоторые противоопухолевые антибиотики, которые являются ДНК-тропными агентами.

2. Физические мутагены:

- а) УФ- облучение, при этом образуются димеры пиридиновых оснований, идут мутации по типу транзиции и трансверсии. Изменяется порядок считывания генов на уровне трансляции.
- б) рентгеновское облучение
- в) быстрые нейтроны
- г) γ -лучи (Co)
- д) ультразвук.

Мутационно-ступенчатый отбор – при этом отборе повышается частота мутаций. С помощью этого метода удалось добиться увеличения активности продуцента пенициллина в 100 000 раз за счет амплификации (умножения) генов, кодирующих образование LLD- трипептида, увеличивается производство пенициллина, а также нарушается система ретроингибирования, повышается проницаемость стенки.

Мутосинтез и мутосинтоны представляют направление в создании новых лекарственных средств как мутагенез. Можно привести пример получения мутосинтонов на основе аминогликозидов, формула которых представлена аминоклиситолом (устойчивая часть молекулы аминогликозида) и различными сахарами (легко изменяемая часть в структуре молекулы). Работа заключается в том, что сначала генетики удаляют аминоклиситол из структуры антибиотика, получая **блок-мутанты**, затем химики преобразуют аминоклиситол и далее биотехнологии соединяют в новую структуру антибиотика новый аминоклиситол и сахара в мультиферментных комплексах, где и происходит сборка новой молекулы антибиотика.

Цели, которые необходимо достигать биотехнологу при совершенствовании продуцента

1. Увеличение продуктивности в достижении большого выхода лекарственных веществ на единицу биомассы.
2. Придать продуценту способность использовать менее дефицитные и более дешевые среды.
3. Продуцент не должен ретроингибировать биосинтез конечного продукта.

4. Устойчивость продуцента к вирусным инфекциям (бактериофагам).
5. Нетребовательность к оборудованию, т.е. биосинтез не должен снижаться при несовременной технологии оборудования (например, достижение меньшей вспениваемости культуральной жидкости)
6. Оптимизация свойств продуцента в аспекте медицинской промышленности (продуцент не должен иметь неприятного запаха и т.д.)

Главный тезис биотехнолога: увеличение выхода продукта на единицу биомассы продуцента.

Лекция 5.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ БИООБЪЕКТА МЕТОДАМИ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ

План лекции

1. Техника клеточной инженерии
2. Техника генно-клеточной инженерии
3. Совершенствование биообъекта методами генной инженерии
4. Техника генно-инженерного эксперимента
5. Техника безопасности в работе с генно-инженерными штаммами.

Клеточная инженерия - это техника обмена фрагментами ДНК, участками хромосом у прокариот и любыми хромосомами у эукариот, независимо от удаленности организмов в эволюционном плане.

В случае клеточной инженерии нет видовых и родовых барьеров, т.е. в клеточной инженерии осуществляют обмен генетическим материалом между организмами, которые в обычных условиях не вступают в половой процесс, что открывает большие возможности в создании биообъектов.

В случае с клеточной инженерией исследователь оперирует целыми клетками.

Техника клеточной инженерии

Техника клеточной инженерии основана на технике *протопластирования*. *Протопласт* – это клетка без клеточной стенки, окруженная цитоплазматической мембраной. Протопласт получают, обрабатывая клетку ферментами, которые гидролизуют полимеры в клеточной стенке.

Техника получения протопласта

Задача.

Необходимо получить гибридные клетки слиянием прокариотов и эукариотов.

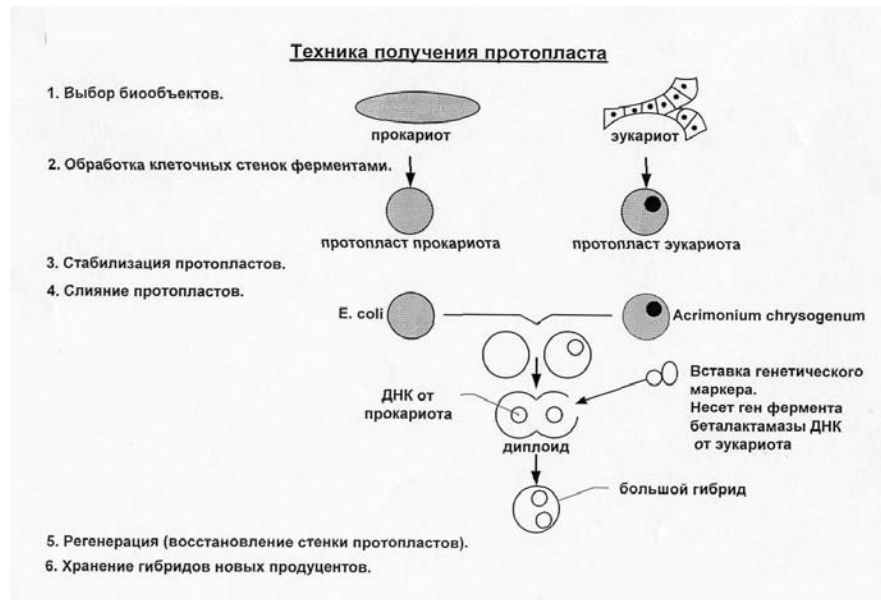
Этапы работы:

1. Выбор биообъектов

Берут биообъект, продуцирующий целевой продукт (например, продуцент цефалоспоринов гриб (эукариот) *Ascrimonium chrysogenum* и

с другой стороны биообъект, которому хотят придать свойство продуцировать целевой продукт (например, прокариот *E. coli*).

Рис.9.



2. Обработка клеточных стенок ферментами.

3. Стабилизация протопластов

Гипертонический раствор, состоящий из 10%-ных маннита, сахарозы, хлорида натрия. Ионная сила раствора такова, что клетка находится в состоянии тургора, но не лопается, при этом раствором также производится отмывание фермента.

4. Слияние протопластов.

Слияние протопластов производится в среде ПАВ в полиэтиленгликоле, который нарушает клеточную цитоплазму и ДНК двух протопластов объединяются. Этот процесс происходит постепенно.

Для облегчения клетке процесса фузии (слияния) клетку необходимо сделать компетентной. Для этого:

1. обрабатывают клетку тяжелыми металлами
2. производят быструю заморозку и оттаивание клеток
3. обрабатывают клетки ферментами.

При слиянии получается протопласт с двумя наборами хромосом – диплоидный набор (при образовании гибрида происходит рекомбинация ДНК).

5. Регенерация (восстановление клеточной стенки протопласта.

Полученный гибрид засевают на плотную питательную среду с необходимыми компонентами для прокариот и эукариот. При этом происходит восстановление клеточной оболочки.

Для того, чтобы отличить гибридную клетку от негибридной, необходимо на уровне 4-ой стадии включить еще один протопласт, несущий маркер. Маркер – это участок гена, образующий какой-либо фермент, заявляющий о себе своеобразным путем при высеве на питательную среду. В данном случае маркером является β -лактамаза. В среду добавляют бензилпенициллин и вырастают только те клетки, которые содержат β -лактамазу, расщепляющую его. А так как β -лактамазу содержат только клетки гибриды, то на среде и вырастают только гибриды.

6. Хранение гибридов, новых продуцентов.

(См. общие способы хранения продуцентов.)

Техника протопластирования может дать как положительные так и отрицательные варианты. При протопластировании наблюдается явление активации молчащих генов. Протопластирование ведет к изменению микроорганизмов, с помощью чего можно достичь совершенствования биообъектов.

Техника клеточной генной инженерии

1-ый метод. Метод перегруппировки генов

Рисунок 10

Техника клеточной генной инженерии

1 - ый метод: Метод перегруппировки генов.



2 - ой метод: Слияние или фузия генов.



3 - ий метод: Трансформация.



Рис.10

Внутри клетки есть определенный набор и последовательность генов. При протопластировании идет перегруппировка генов. Также происходит и активация молчащих генов.

II-ой метод. Слияние или фузия генов.

Прокариот сливают с эукариотом, образуется *рекомбинант*, содержащий кусок одного ДНК и другого ДНК.

III-й метод: Трансформация.

а) клетка с определенным набором генов в ДНК → живой протопласт без перегруппировки генов → протопласт гибрида-рекомбинант → клетка

↑

б) выделение изолированной ДНК в пробирке - вектор (это кусок изолированной ДНК, выделенный из другого микроорганизма (фаг, плазмиды))

Если есть клетка и изолированная ДНК с нужным геном (вектор) – вектор может быть в виде фага, плазмиды, вируса, космиды (плазмиды+ фаг), то можно включить вектор в изолированный протопласт (т.е. провести *трансформацию*).

При этом образуются «+» продуценты с новыми качествами, но в клетке существуют системы *репарации* (восстановления) молекулы ДНК и постепенно эти рекомбинанты возвращаются к исходному (дикому) типу. Репарацию преодолевают следующим образом:

1. «+» варианты дополнительно обрабатывают мутагенами для преодоления действия системы репарации;
2. иммобилизация клеток «+» вариантов.

Для того, чтобы прошла трансформация, необходимо сделать клетку *компетентной*, т.е.увеличить ее *проницаемость*. Это достигается следующим образом:

1. воздействовать на клетку ионами тяжелых металлов (цинк, кобальт, литий, магний)
2. воздействовать на клетку ферментами (лизозим, комплексный фермент виноградной улитки)
3. быстрое замораживание и оттаивание.

Компетентные клетки легче поглощают вектор, куски ДНК. У них обнажена цитоплазматическая мембрана, которая в некоторых местах выходит на поверхность, и в образующиеся в этих местах окошечки, легко проникает вектор в виде изолированной ДНК, а также в виде фага, вируса, космиды (космида- изолированная ДНК или плазмида+ фаг).

При протопластировании и слиянии протопластов может происходить явление *амплификации* (увеличение) генов – при этом продукция целевого назначения (витаминов, гормонов, антибиотиков) увеличивается. Клетки с амплификацией генов есть «+» вариант.

Совершенствование биообъекта методами генной инженерии.

Отличие клеточной инженерии от генной инженерии в том, что в генной инженерии имеют дело с изолированными ДНК, с которыми работают *in vitro*.

Суть технологии: производят соединение фрагментов ДНК *in vitro* (в пробирке) с последующим введением изолированной ДНК в живую клетку. Чистая генная инженерия – это техника обмена изолированными фрагментами ДНК. Это происходит с помощью ферментов, которые относятся к эндонуклеазам (например, рестриктазы).

Цели генной инженерии: создание новых продуцентов для выработки новых целевых продуктов (новые лекарственные средства, диагностические и профилактические препараты).

Необходимые условия для осуществления генной инженерии:

1. Нужен такой биообъект, который способен синтезировать чужеродный белок, воспринимал бы и передавал генетическую информацию.
2. Организм человека не должен отторгать продукт, синтезированный продуцентом.
3. Клетка должна делиться, необходимо, чтобы гены, продуцирующие целевой продукт у клеток, образующихся после деления, экспрессировались (работали).
4. Необходимо иметь транспортное устройство для внесения ДНК в клетку продуцента: вектор в виде плазмид, космиды, фага.

Вектор вводится разными путями:

1. ***конъюгация*** – генетический материал клеток при сближении переходит из одной клетки в другую в виде плазмиды.
2. ***трансдукция*** – передача клетке генетического материала через вирус или фаг.
3. ***трансформация*** – передача клетке генетического материала изолированной ДНК, в результате чего изменяется геном. Процесс трансформации – перенос генетического материала, при котором фрагмент ДНК, выделенный из клетки донора, поступает в клетку-реципиент

Особенности передачи генетического материала. Вероятность передачи молекулы плазмидной ДНК при конъюгации 1 на 1000 или 1 на 10000. Если есть вектор на основе фага или вируса, то он будет более агрессивен и вероятность повышается в 100 – 1000 раз. От вирусной или фаговой информации трудно освободиться.

В генной инженерии включение нового гена происходит с помощью фермента *рестриктазы*.

Рис.11.



Рестриктаз в клетке может быть очень много. Рестриктазы разрушают фосфодиэфирные связи между нуклеотидами в строго определенном месте, т.е. они обладают строгой специфичностью, действуя на определенную последовательность нуклеотидов в цепи. После разрыва связей образуются «липкие концы» и в разрывы включаются гены с помощью ферментов *ДНК-лигаз*, которые соединяют нуклеотиды между собой.

Есог 1- рестриктаза действует в строго определенной последовательности на одну нить ДНК. Другая рестриктаза расщепляет вторую нить ДНК на другом участке. Рестриктазы расщепляют ковалентные фосфодиэфирные связи между нуклеотидами. После расщепления связей образуются «липкие концы» и в место разрыва можно включить ген, который «сшивается с ДНК с помощью ДНК-лигаз.

Лекция 6.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ БИООБЪЕКТА МЕТОДАМИ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ (продолжение).

С химической точки зрения ДНК всех организмов идентичны и поэтому генная инженерия открывает возможность для перемещения генов в пределах всех живых организмов.

Техника генной инженерии включает:

- получение индивидуальных фрагментов ДНК из генома организма
- определение последовательности оснований, т.е. определение строения генов.

На генетическом уровне жизнь универсальна (т.е. во всех живых организмах носители наследственности являются, как правило, ДНК).

Молекула АТФ является переносчиком энергии во всех живых организмах, с помощью АТФ образуются белки, состоящие из 20 аминокислот.

Воспроизведение микромолекул в живых системах также подчиняется основным принципам:

1. репликация (удвоение ДНК)
2. транскрипция (матричный синтез РНК, матрица –ДНК)
3. трансляция (синтез белка)

Во всех процессах главным является правильная последовательность нуклеотидов матрицы.

Область действия генного инженера (*фрагмент ДНК*) называется *сайтом*.

Для генного инженера необходим:

- чтобы гибридная молекула стабильно удваивалась,
- исследовать матричный синтез после введения гена чужеродного белка,
- чтобы чужеродный белок синтезировался

Таким образом, для генного инженера важно, чтобы молекула ДНК чужеродного белка работала (экспрессировалась).

Техника генноинженерного эксперимента (стадии)

1. *Получение ДНК чужеродного фрагмента*, который необходимо включить (вклеить) в клетку хозяина. Например, получение ДНК человеческого инсулина.

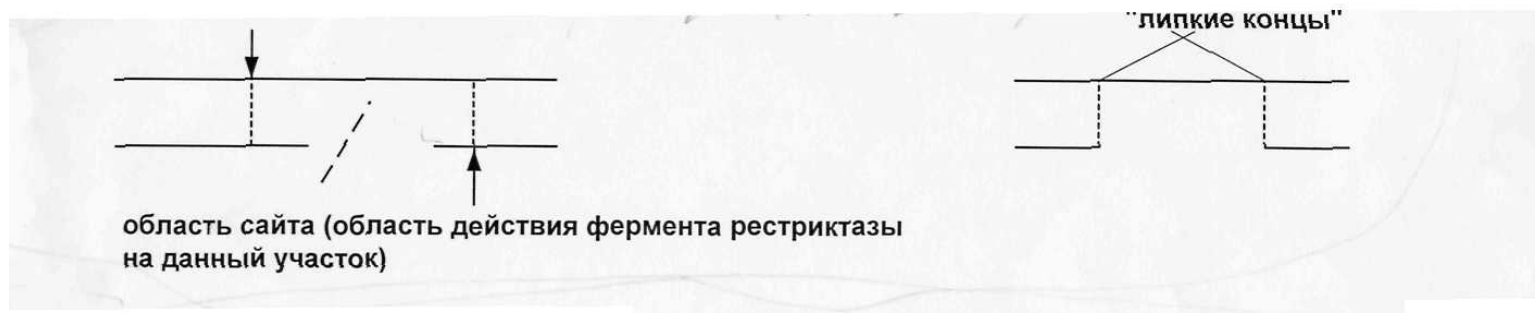
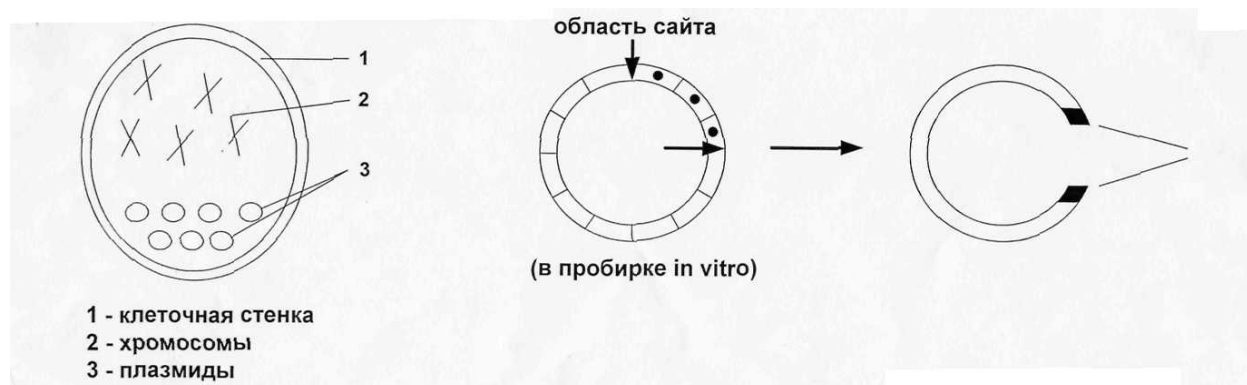


Рис.12.

2. Получение плазмиды из клетки донора

Есть клетка-реципиент (напр. *E. coli*) из которой мы получаем плазмиды (это элементарная концевая молекула ДНК в 100-1000 раз меньше хромосомы, существует в бактериальных клетках или клетках прокариот, плазмиды несут ограниченное количество генов (не более 30)).

Рис.13.



3. Конструирование рекомбинантной плазмиды (вектора)

Вектор – рекомбинат (подготовленная для генно-инженерных манипуляций плазида или в виде фага или в виде изолированной ДНК или вируса) или часть рекомбинантной ДНК, которая обеспечивает проникновение и дальнейшую репликацию этой ДНК в клетке хозяина.

Вектор получают с помощью рестриктазы (разрывает фосфодиэфирные связи в строго определенном месте последовательности оснований нуклеотидной цепи)

Рестриктазы: EcoRI, II V
BSUR

"липкие концы"

1 - цепочка нуклеотидов

2-ая цепь

EcoRI

BSUR I

ГГЦЦ
ЦЦГГ

Введение фрагмента ДНК (гена человеческого инсулина в плазмиду клетки реципиента (*E.coli*) : 2 липких конца одного биообъекта и 2 липких конца другого комплементарно воссоединились. Ген инсулина является чужеродным, поэтому может иметь место такое явление как *отжиг*.

A diagram of a circular structure, possibly a cell or a microorganism, showing concentric rings and a shaded segment. The structure consists of several concentric circles. The outermost ring is thick and black. Inside it, there are several thinner concentric circles. A small, dark, shaded segment is located on the right side of the structure, between the outermost ring and the inner circles. An arrow points from the left towards the center of the structure.

Отжиг – это процесс смещения двух фрагментов ДНК, когда восстанавливаются только водородные связи и фосфодиэфирные связи не образуются.

Для восстановления фосфодиэфирных связей используют ДНК-лигазы – это ферменты, которые восстанавливают ковалентные фосфодиэфирные связи и таким образом концы однотяжевой линейной молекулы ДНК соединяются с кольцевой молекулой ДНК- плазмидой. Плазмида – это вектор. Так лиганды сшивают, склеивают молекулы ДНК. На этом этапе плазида называется *вектором или транскриптом*.

4. Включение вектора в клетку-реципиент (*E.coli*)

Условием включения вектора в клетку реципиента является то, что цитоплазматическая мембрана ее должна близко подходить к клеточной стенке, когда вектор входит внутрь клетки через окошечки.

5. Отбор гибридных клонов

Рис. 16.

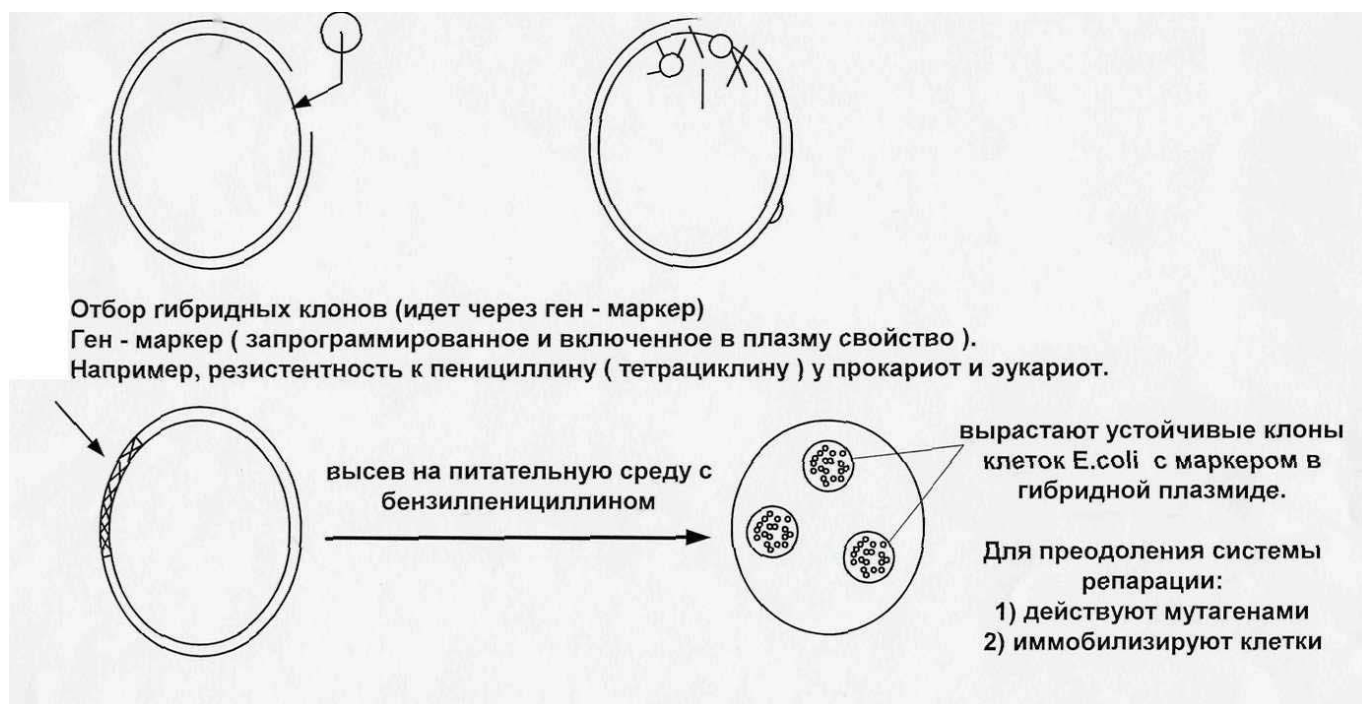


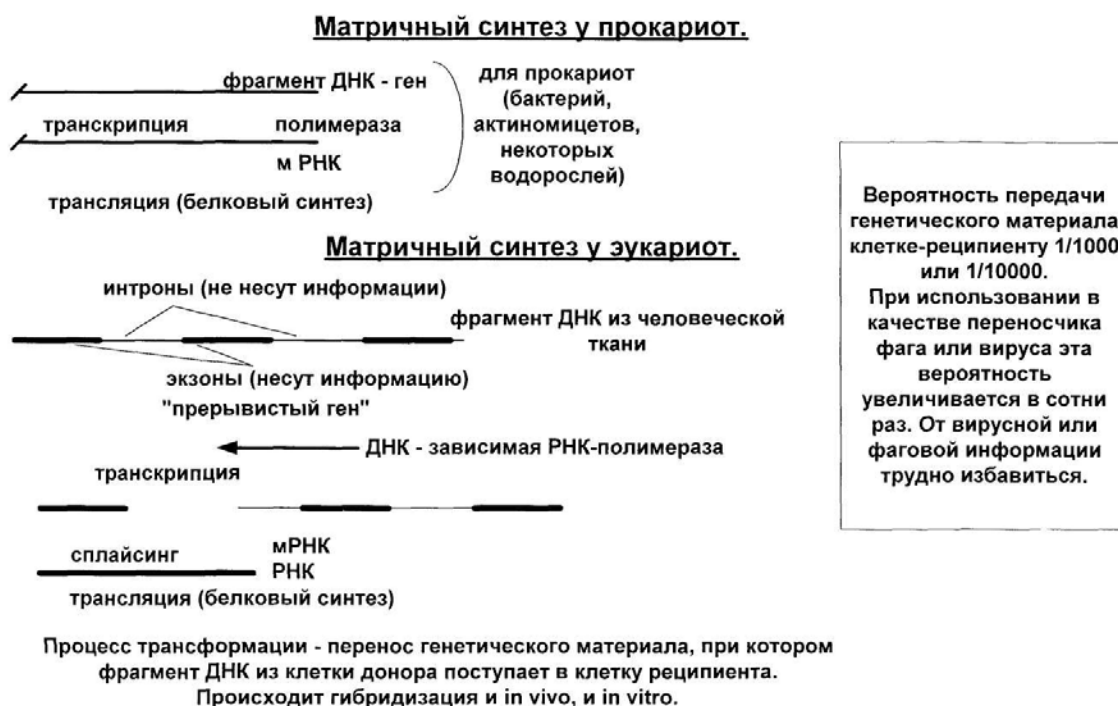
Рис. 17

Посев идет на питательную среду, содержащую, как пример, бензилпенициллин, при этом вырастают клоны клетки *E.coli* с маркером в гибридной плазмиде.

У эукариот при образовании молекулы м РНК имеет место процесс **сплайсинга** (от английского splicing- созревание, сращивание). Ген у эукариот представляется не непрерывный, а мозаичной структуры, содержащей наряду с кодирующими, несущими информацию (так называемые **экзоны**), также некодирующие, не несущие информацию (**интроны**) последовательности. Фермент ДНК-зависимая РНК-полимераза катализирует транскрипцию как экзонов, так и интронов. В процессе сплайсинга интроны с помощью ферментов вырезаются, а экзоны после удаления интронов сращиваются. При этом образуется функционирующая м РНК.

У прокариот процесс образования м РНК идет проще. При помощи РНК-полимеразы идет транскрипция соответствующего гена. Процесс сплайсинга у прокариот отсутствует. Образующаяся в процессе транскрипции молекула м РНК уже способна к функционированию.

Рис.18.



Техника безопасности при работе с генно-инженерными штаммами

- 1. Генно-инженерный штамм должен быть дефектным, то есть ауксотрофом (с включенным маркером, без которого он не может существовать).*
- 2. Физические предупреждения, когда в процессе ферментации создается отрицательное давление в ферментере и в случае выброса выходят только небольшие количества микроорганизмов, которые погибают, являясь ауксотрофами (требуют хорошей питательной среды).*

Генно-инженерные штаммы являются нестойкими образованиями.

Лекция 7.

БИОТЕХНОЛОГИЯ АМИНОКИСЛОТ

План

1. Методы получения аминокислот
2. Механизмы регуляции биосинтеза аминокислот
 - 2.1. Биосинтез лизина
 - 2.2. Биосинтез треонина
3. Особенности культивирования штаммов-продуцентов
 - 3.1. Особенности питательной среды
 - 3.2. Условия ферментации аминокислот
 - 3.3. Применение генной инженерии
4. Контроль качества аминокислот
 - 4.1. Хроматографирование (тонкослойная хроматография ТСХ в анализе аминокислот)

Методы получения аминокислот

Аминокислоты являются составными элементами белков. Все 20 аминокислот являются мономерами для построения природных полипептидов и хорошо изучены (методы их синтеза давно подробно описаны). Известно также, что эти соединения существуют в виде оптических изомеров (вспомните теорию строения органических соединений Бутлерова А.М., открывшего асимметрию атома углерода с четырьмя заместителями, определяющими направление и степень вращения плоскости поляризованного света) .

Современные методы органического синтеза позволяют синтезировать L- и D-формы аминокислот, но только как рацематы, дальнейшее разделение которых представляет трудную задачу и экономически не эффективно.

Другой способ получения аминокислот – это микробиологический синтез, когда используют штаммы-продуценты, осуществляющие сверхсинтез аминокислот. Избыточные количества аминокислот, например, L -лизина, L -глутаминовой кислоты, L -треонина, L –трептофана экскретируются (выходят) в культуральную (внешнюю) среду. Культуральная среда в этом случае может содержать от четырех, пяти и до ста граммов целевой аминокислоты на один литр жидкой фазы. В отличие от химического синтеза, в этом случае, то есть при биосинтезе аминокислот с помощью ферментных систем микроорганизмов, получаются исключительно L-формы аминокислот, обуславливающих терапевтический эффект, а не рацематы. Это обстоятельство решает проблему

выбора получения аминокислот в промышленном масштабе в пользу биотехнологических методов.

Аналогичная ситуация сложилась и в области производства антибиотиков. Химический синтез, как правило, не эффективен. Именно поэтому в фармацевтической промышленности антибиотики получают с помощью штаммов-продуцентов, которые генерируют нужный антибиотик в определенной фазе роста в заданном режиме культивирования. Однако, использование в дальнейшем химической трансформации природных антибиотиков рождает новые лекарственные средства и помогает преодолевать резистентность микроорганизмов к лекарственным препаратам, повышая эффективность лечения.

Сегодня известны 4 метода получения аминокислот:

1. химический метод (тонкий органический синтез)
2. химико-энзиматический метод (энзиматическая трансформация химически синтезированных предшественников аминокислот с образованием биологически активных L-изомеров). Метод достаточно дорогой.
3. биологический метод (применение гидролиза белоксодержащих субстратов)
4. прямой микробиологический метод (получение L-аминокислот). Метод более дешевый, экономически выгодный.

Наиболее распространенными методами получения аминокислот являются химико-энзиматический и микробиологический.

В качестве примеров использования химико-энзиматического метода можно привести:

- синтез аспарагиновой кислоты из фумаровой (используются клетки *Escherichia coli*)
- синтез L-фенилаланина из коричной кислоты (используются клетки дрожжей).

Имея задачу получения аминокислот, используя природные микроорганизмы, надо помнить о механизмах регуляции биосинтеза по принципу обратной связи (ретроингибирование). Эта регуляция осуществляется либо за счет ингибирования активности одного из начальных ферментов собственного синтеза избыточным продуктом, то есть самой аминокислотой, либо репрессируется весь комплекс ферментов всей биохимической цепочки метаболизма клетки, что является естественной реакцией живого микроорганизма-продуцента для сохранения собственного равновесия на клеточном уровне. Таким образом перед биотехнологом стоит задача в

нарушении этих механизмов, чтобы иметь возможность получить целевой продукт в необходимых количествах.

Как это делается, можно рассмотреть на примере продуцентов лизина (*Corynebacterium glutaminicum*) и треонина (*Escherichia coli*).

У *Corynebacterium glutaminicum* есть принцип согласованного ингибирования ферментативной активности, что является особенностью биосинтеза лизина. Ингибирование синтеза лизина в клетке возможно только при повышенной концентрации обеих конечных продуктов – лизина и треонина. Самостоятельно ни лизин, ни треонин не ингибируют активности ключевого фермента – аспартакиназы. Они ингибируют этот синтез только вместе. Таким образом, вызвать сверхсинтез лизина можно лишь нарушив синтез треонина или его предшественника – гомосерина.

Действительно, большинство продуцентов лизина не способны синтезировать гомосерин или треонин, то есть являются «ауксотрофами» по этим аминокислотам.

Таким образом большинство продуцентов лизина нуждается в присутствии гомосерина или треонина, иначе они работать не будут. Зная это, биотехнолог, выращивая такие продуценты, должен обязательно вносить в питательную среду от половины грамма и до полутора граммов на один литр гомосерина или треонина. В этом случае происходит активный рост биомассы продуцента без синтеза лизина. Как только треонин исчезает из среды и рост биомассы прекращается, начинается активный синтез лизина. Таким образом, данный процесс имеет две стадии развития

1. рост биомассы
2. синтез лизина

Продолжительность синтеза составляет 2-3 суток. Уровень накопления продукта составляет 50-100 граммов на литр. Это особенности биосинтеза лизина.

Второй пример. Синтез треонина. Особенности регуляции биосинтеза треонина в клетках *Escherichia coli* (кишечной палочки). В этом случае ситуация другая. У кишечной палочки нет механизма согласованного ингибирования ферментативной активности, то есть, если лизин ингибирует активность своих ферментов по принципу обратной связи, то треонин – своих ферментов. Кроме того, имеет место «репрессия» всего комплекса треониновых ферментов при избытке треонина или изолейцина и это похоже на «согласованную репрессию». Самостоятельно (по отдельности) ни треонин, ни изолейцин не репрессируют синтез ферментов.

Для решения задачи получения треонина в необходимых количествах пришлось сделать следующее:

1. изменить, сделать нечувствительным к треонину первый фермент треонина
2. снизить активность фермента, синтезирующего из треонина изолейцин
3. убрать механизм репрессии при недостаточном количестве изолейцина несмотря на избыток треонина
4. применить генную инженерию (выделить треониновые гены и размножить их на плазидах в клетке микроорганизма, резко повысив синтез треонина клетками продуцента)

В рассматриваемом случае синтез треонина отличается от синтеза лизина тем, что его синтез происходит одновременно с ростом биомассы. Здесь уже нет двух стадий.

Особенности культивирования штаммов-продуцентов аминокислот приводят к следующему результату:

1. достигаются максимально высокие скорости синтеза аминокислот клетками продуцента
2. достигается максимальная длительность работы продуцента
3. минимально образуются побочные продукты биосинтеза аминокислот.

Первая задача решается путем выращивания высокоактивной биомассы и помогают в этом случае наличие в питательной среде:

источников углерода,

аммонийного азота,

минеральных солей,

ростовых факторов;

оптимизация pH (кислотность среды)

температуры;

дробная подача субстратов.

Для предотвращения закисления среды проводят автоматическое pH-статирование аммиачной водой и источниками углерода.

В случае биосинтеза лизина добавляют ростовые факторы по мере необходимости, что зависит от самого сырья, от аппаратуры, от температуры. Процесс биосинтеза энергоемкий и требует интенсивной аэрации и перемешивания.

Для длительной работы ауксотрофных продуцентов лизина в питательную среду вносят комплексный источник аминокислот (белковые гидролизаты).

Внимание! Синтез нужной аминокислоты может прекращаться, если на ее продуцент действуют его токсические метаболиты, которые синтезируются самим продуцентом. Например, в процессе биосинтеза фенилаланина, продуцентом которого является *Bacillus subtilis*, этот продуцент синтезирует примеси ацетона и бутандиола, в результате этого клетки продуцента лизируются, образуют споры и прекращают вырабатывать фенилаланин. Чтобы избежать это явление, необходимо ферментацию вести в условиях лимита (ограничения) по источнику углерода. В этом случае весь сахар расходуется только на синтез фенилаланина, увеличивая как количество (в два раза), так и чистоту получаемого продукта.

В заключение можно сказать, что:

- эффективность использования субстрата при биосинтезе аминокислот зависит от продуктивности биомассы,
- если синтез аминокислот разобщен с ростом биомассы (смотри лизин), то эффективность использования субстрата будет тем выше, чем дольше будет работать культура после остановки роста,
- если же синтез аминокислоты идет параллельно росту биомассы (смотри треонин), то эффективность биомассы можно увеличить добавляя определенное количество предшественников.

Наиболее перспективным направлением являются методы генетической инженерии – введение в клетку продуцента многокопийных плазмид, содержащих гены, контролирующие биосинтез аминокислот в ущерб синтезу биомассы и других клеточных компонентов.

С помощью гибридных плазмид в биосинтезе аминокислот мы получаем

1. рост продуктивности биомассы
2. исчезновение примесей (более чистый продукт)
3. возрастает коэффициент использования субстрата (его минимум дает максимум продукта).

Лекция 8.

ИНЖЕНЕРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ, КОТОРАЯ ОСНОВАНА НА ИММОБИЛИЗОВАННЫХ БИООБЪЕКТАХ: ФЕРМЕНТАХ И ЦЕЛЫХ КЛЕТКАХ

План лекции

1. Ферменты
 - 1.1. Определение ферментов
 - 1.2. Классификация ферментных реакций
 - 1.3. Ограничения применения ферментов в биотехнологии
2. Иммобилизация ферментов
 - 2.1. Определение иммобилизации
 - 2.2. Преимущества иммобилизованных ферментов
 - 2.3. Методы иммобилизации ферментов
 - 2.4. Иммобилизация клеток микроорганизмов
 - 2.5. Иммобилизация животных и растительных клеток
 - 2.6. Носители для иммобилизации ферментов и целых клеток
 - 2.7. Пути решения проблем иммобилизации ферментов и целых клеток
3. Сочетание функционирования биообъекта с технологической операцией (таблица)
4. Аппаратурное (аппаратное) оформление
 - 4.1. Типы биореакторов
5. Применение иммобилизованных биообъектов при создании лекарственных средств на примерах:
 - 5.1. получения аминокислот
 - 5.2. получения 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК)
6. Биокатализ
7. Схема получения иммобилизованной аминоксилазы
8. Примеры ферментных препаратов для медицинских целей.

В основе современной инженерной энзимологии лежит применение иммобилизованных ферментов и ферментных систем. Вспомним природу самих ферментов.

Ферменты – это катализаторы биологического происхождения. Наиболее ценные свойства ферментов – это высокая активность и специфичность (селективность) действия. Живые организмы содержат сотни и тысячи ферментов, основная функция которых заключается в регуляции практически

всех химических реакций, определяющих жизнедеятельность организма.

Приведем классификацию ферментативных реакций. Это:

1. окисление и восстановление
2. перенос функциональных групп от одних молекул на другие
3. гидролиз
4. реакции с участием двойных связей
5. изомеризация, или структурные изменения в пределах одной молекулы
6. синтез сложных соединений (обычно с энергетическими затратами).

У ферментов сложное пространственное строение, включающее определенную комбинацию химических групп. Имеются сведения, что в природе обнаружено свыше трех тысяч разных специфических ферментов.

Однако, технологическое применение ферментов имеет ограничения по следующим причинам:

1. большая затрата труда на отделение от исходных агентов (как правило ферменты используются однократно)
2. неустойчивость (лабильность ферментов при хранении)
3. большая затрата труда на очистку ферментов, что определяет высокую стоимость их производства.

Сравнительно недавно (несколько десятков лет назад) четко определились пути преодоления этих трудностей. Эти пути связаны с получением иммобилизованных ферментов и иммобилизованных клеток микроорганизмов.

Приведем определение иммобилизации.

Иммобилизация – физическое разделение биообъекта (клетка, фермент) и растворителя, то есть биообъект закреплен на нерастворимом носителе, а субстрат и продукты свободно обмениваются между биообъектом и растворителем.

Биообъект может работать в этом случае многократно (неделя, месяц).

Другими словами можно сказать, что иммобилизация ферментов – это перевод их в нерастворимое состояние с сохранением (частичным или полным) каталитической активности.

Преимущества иммобилизации биообъекта:

1. многократность использования ферментов и живых клеток в наиболее продуктивной фазе
2. снижение количества отходов производства
3. повышение качества целевого продукта (он менее загрязнен), более простое выделение целевого продукта (особенно важно для производства

инъекционных лекарственных препаратов, когда в продукте мало белка – нет пирогенности и аллергенности).

4. биотехнологический процесс становится более стандартным, более предсказуемым.
5. устойчивость к внешним воздействиям.

Для получения иммобилизованных ферментов обычно применяют следующие методы:

1. Ковалентное присоединение молекул ферментов к водонерастворимому носителю, в качестве которого используют как органические (природные и синтетические) полимеры, так и неорганические материалы. К природным материалам относятся целлюлоза, хитин, агароза, декстраны, бумага, ткани, полистирол, ионообменные смолы и так далее.
2. Захват фермента в сетку геля или полимера.
3. Ковалентная сшивка (сшивание) молекул фермента друг с другом или с инертными белками при помощи би- или полифункционального реагента.
4. Адсорбция фермента на водонерастворимых носителях (часто на ионитах)
5. Микрокапсулирование (захват раствора фермента в полупроницаемые капсулы размером 5-300 микрон).

Такая ситуация приводит к совершенствованию технологических процессов.

В результате иммобилизации ферменты приобретают преимущества гетерогенных катализаторов – их можно удалять из реакционной смеси (и отделять от субстратов и продуктов ферментативной реакции) простой фильтрацией. Кроме того, появляется возможность перевода многих периодических ферментативных процессов на непрерывный режим, используя колонны или проточные аппараты с иммобилизованными ферментами.

В последнее время получило достаточно широкое распространение **применение иммобилизованных клеток микроорганизмов, содержащих естественный набор ферментов**. Преимущество иммобилизованных клеток по сравнению с иммобилизованными ферментами заключается в том, что при их использовании:

отпадают стадии выделения, очистки и иммобилизации ферментов, которые обходятся производству значительно дороже в осуществлении полного технологического процесса. Ферменты в микроорганизме находятся в своем естественном окружении (они термостабильны, работают более длительно, сохраняют свои каталитические свойства достаточно долго, они не уступают иммобилизованным ферментам в свойствах гетерогенных биокатализаторов).

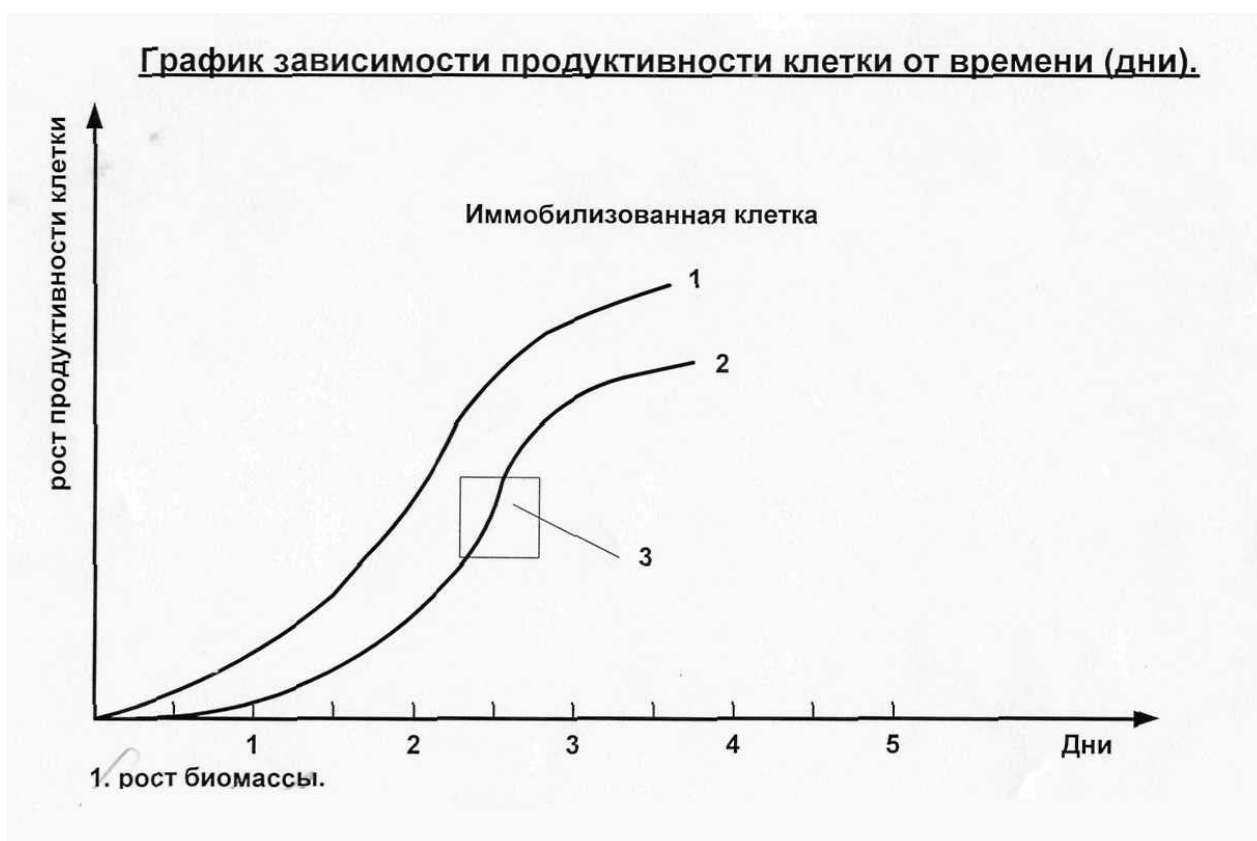
Иммобилизация целых клеток микроорганизмов проводится аналогично иммобилизации ферментов, предотвращая их размножение, увеличивая сохранность и срок работы в качестве катализатора по сравнению с необработанными клетками.

Носители – это вещества органической и неорганической природы.

Органические: желатин, фибрин, альгинат натрия, целлюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, ПААГ-полиакриламидный гель.

Неорганические – термический песок, активированный уголь, окись алюминия, бентонит.

Рис.19.



1. биомасса
2. концентрация антибиотика
3. самая продуктивная фаза (отбирают самые продуктивные клетки, которые не могут мутировать, так как они зафиксированы)

Ограничения метода иммобилизации:

- если целевой продукт не выходит в среду растворителя, а накапливается внутри клетки, то работать с иммобилизованным продуктом нет смысла.
- Ферменты тоже не всегда можно иммобилизовать, например, если у фермента есть кофермент, который с ним не прочно связан. Кофермент можно вводить в среду, но это не всегда бывает возможно в условиях производства.

Пути иммобилизации ферментов и целых клеток

1. *Адсорбция на нерастворимом носителе (на окиси алюминия, угле, смолах, карбоксиметилцеллюлозе и др.)*

Адсорбция имеет недостаток, так как связи (в основном ионные) могут быть недостаточно прочными и разрушаться под воздействием pH и других факторов, при этом биообъект снимается с носителя. В производстве используется редко.

2. *Адсорбция на аффинном носителе (избирательная сорбция к определенной группе веществ)*
3. *Ковалентное связывание. Носитель активируют, например ПААГ активируют бромцианом или глутаровым альдегидом. **Носитель не должен быть токсичным для биообъекта.***

Максимальная нагрузка носителя – это максимальное количество фермента, которое может быть иммобилизовано на определенном количестве носителя. Чем она больше, тем лучше.

4. *Включение биообъекта в носитель или инкапсулирование*

Биообъект включается в ячейки геля, субстрат проникает в ячейки, а целевой продукт свободно выходит. Сложности, возникающие при инкапсулировании.

Если биообъект – изолированный очищенный фермент, то для его включения в гель ячейки не должны быть слишком большими. Но, если ячейки слишком маленькие, то затруднен контакт с субстратом и необходимо подбирать условия, чтобы субстрат свободно проникал и свободно уходил целевой продукт. Если биообъект – клетки, то ячейки должны быть достаточно большими. Необходим достаточный доступ к клеткам кислорода и отведения углекислого газа.

Связь с гелем не очень прочная и биообъект может вымываться.

Иммобилизация биообъекта

Биообъект	Технологическая операция
1. Очищенный фермент	Катализирует отдельную реакцию, одноступенчатая трансформация, биоконверсия.
2. Фермент сохраняется в клетке с коферментом	Отдельная реакция
3. Фермент в пермеабиллизированной клетке (в клетке, у которой повышена проницаемость)	Отдельная реакция
4. Интактная клетка с полной функциональной активностью (клетка-продуцент)	Цепь реакций – полный биосинтез целевого продукта
5. Система, открытая для усложнения, клетка-фермент + и т.д.	Биосинтез продукта и его трансформация в одном биореакторе.

Рис.20



Иммобилизация пенициллинацилазы:

1. Россия (пенициллиназа включается в ППАГ
США (внеклеточная очищенная пенициллинацилаза сорбируется на бентоните)
Швеция, фирма Astro пенициллиназа ковалентно связана с полисахаридами.
2. Получение полусинтетических цефалоспоринов (цефалотин, цефазолин и др.) из 7-аминоцефалоспориновой кислоты.
3. Используется для трансформации стероидов (например гидрокортизон в преднизолон).
4. Иммобилизованные клетки используются в биофильтрах для очистки сточных вод.
5. Иммобилизованные ферменты используются для приготовления так называемых ферментных электродов – биологические тесты.
6. В научных исследованиях представляет большой интерес применение метода иммобилизации вместе с методом клеточной инженерии.

Иммобилизация животных и растительных клеток

Растительные и животные клетки более крупные, они более требовательны и капризны.

1. растительные клетки можно иммобилизовать (есть жесткая клеточная стенка), но необходимо производить аэрацию и поддерживать стерильность.
2. Животные клетки иммобилизовать трудно (они не имеют жесткой клеточной стенки, есть только цитоплазматическая мембрана). Иммобилизуют путем мягкой иммобилизации – гликопротеиды сыворотки крови и белковые факторы свертывания позволяют связывать клетки с носителем (гликохолестерол). Иммобилизованные ферментные клетки применяются в иммуноферментном анализе.

Применение иммобилизованных ферментов и белков в медицине открывают новые перспективы создания эффективных лекарственных средств.

Ферменты, закрепленные на носителях или модифицированные полимерами, часто снижают свою антигенность из-за уменьшения доступности их для рецепторов иммунной системы. На принципах иммобилизации физиологически активных соединений базируется приготовление ферментных препаратов, обладающих повышенным терапевтическим эффектом.

Интересные возможности были обнаружены при использовании ферментов для повышения чувствительности иммунохимических методов анализа. Суть любого иммунохимического анализа в том, что после завершения реакции антиген-антитело определить концентрацию избыточного компонента (антигена или антитела), не вступившего в реакцию. Поскольку эти концентрации очень невысоки (10^{-12} - 10^{-8} моль/л), то для их обнаружения обычно применяют легко детектируемую (определяемую) метку радиоактивным атомом, вводимым в один из компонентов (радиоактивный иод, тритий). Оказалось, что можно, без потери чувствительности метода, заменить радиоактивную метку на присоединение фермента, который можно обнаружить по его каталитической активности. Таким образом, с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) могут быть определены любые вещества, обладающие свойствами антигенов и, конечно, многочисленные возбудители заболеваний человека, животных, растений.

Переходим к проблеме некоторых промышленных процессов с использованием иммобилизованных ферментов и клеток. Прежде всего, нас интересует получение L-аминокислот.

Как известно, аминокислоты – главный строительный материал организма, который формирует пептиды и белки. В отличие от растений и микроорганизмов, которые способны синтезировать все нужные им аминокислоты из более простых химических соединений, человек способен синтезировать лишь 12 из 20 аминокислот, необходимых для его жизнедеятельности. Остальные 8 аминокислот – (валин, лейцин, изолейцин, треонин, метионин, лизин, фенилаланин, триптофан) – получили название незаменимых и должны поступать в организм с пищей. При нехватке хотя бы одной из незаменимых аминокислот замедляется рост организма, проявляется патология. В этой ситуации важно уметь синтезировать эти аминокислоты в промышленных масштабах для корректировки питания в лечебных и профилактических целях.

Здесь важно отметить, что производство многих аминокислот, в том числе и незаменимых, - составляет большую отрасль химической промышленности. Но с помощью химических методов получается смесь оптических изомеров аминокислот (это смесь L- и D-аминокислот). В химических реакциях эти изомеры почти не различимы, но человеческий организм усваивает только L-аминокислоты (за исключением метионина). Для большинства

биотехнологических процессов D-аминокислоты также не представляют ценности.

Разделение смеси L- и D-аминокислот на составляющие их изомеры стало первым процессом в мире, осуществленным с помощью иммобилизованных ферментов на промышленном уровне.

Механизм разделения заключается в том, что используя в качестве исходного вещества ацилированные L- и D-аминокислоты, полученные органическим синтезом, прибегают к помощи фермента аминоксилазы, которая гидролизует один ацил –L-изомер, отщепляя от него ацильную группу и резко увеличивая растворимость образующейся L-аминокислоты в отличие от ацил-D-изомера. После этого вещества легко отделяются друг от друга и получается чистая L-аминокислота. Остающаяся ацил- D-аминокислота переходит в исходную смесь ацилированных L- и D-аминокислот, и процесс повторяют снова. Оказалось, что для аминоксилазы не имеет значения, какую аминокислоту ей гидролизовать, важно только строение ацильной части, к которой фермент имеет строгую специфичность. Поэтому одна и та же реакционная колонна с иммобилизованной аминоксилазой может быть применена в производстве самых различных аминокислот.

В промышленном процессе производства аминокислот очень важно. Что иммобилизованный фермент легко готовить, так как он легко адсорбируется на специальной смоле, которую затем помещают в реакционную колонну. Когда активность катализатора падает ниже нормы, в колонну добавляют раствор свежего фермента (раз в несколько месяцев). Полимерный носитель отличается устойчивостью и может быть использован в течении нескольких лет.

Другая задача. Получение 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК)

Бензилпенициллин является исходным сырьем для получения (6-АПК), но в его молекуле присутствует чрезвычайно лабильное беталактамное кольцо и проведение химического деацилирования бензилпенициллина представляет трудную задачу. Поэтому в промышленности использовали для обработки бензилпенициллина бактериальную массу *E. coli*, которая содержит фермент пенициллинамидазу. Этот фермент расщеплял именно ту амидную связь, которая необходима для образования 6-АПК. В результате применения иммобилизованных бактериальных клеток, содержащих пенициллинамидазу, а затем и самой иммобилизованной пенициллинамидазы, удалось значительно повысить продуктивность и экономичность промышленного получения 6-АПК.

Одним из интересных примеров применения биокатализа является его использование в тонком органическом синтезе. Уникальная специфичность

действия ферментов, возможность проведения процессов в «мягких» условиях, протекание реакций с высокой скоростью при использовании малых количеств катализатора, практическое отсутствие побочных реакций – все это делает биокаталитические процессы перспективными с технологической точки зрения. Эти преимущества широко используются при создании лекарственных препаратов (антибиотики, стероиды, простагландины и так далее).

Для осуществления биокаталитического процесса необходимо:

1. провести поиск фермента необходимой специфичности или стереоспецифичности
2. изучить основные свойства исходных веществ и продуктов реакций
3. выявить факторы, определяющие эффективность биокаталитического превращения
4. создать на основе фермента подходящий катализатор для технологического процесса
5. провести аппаратное оформление биотехнологического процесса.

Наибольшее применение в практике пока нашли гидролитические ферменты по причинам:

1. гидролитические реакции термодинамически полностью сдвинуты в сторону образования продуктов
2. кинетика реакций ферментативного гидролиза легко описывается в количественном выражении
3. гидролазы наиболее изучены и легко управляемы
4. проведение оптимизации гидролитических ферментативных реакций в водном растворе проходит по двум параметрам – концентрации расщепляемого субстрата и активности фермента.

Особенно эффектно возможности и достоинства гидролаз были продемонстрированы при модификации самых эффективных и широко применяемых антибиотиков – пенициллинов и цефалоспоринов. Получение новых, более эффективных аналогов пенициллина связано с изменением его боковой цепи при сохранении целостности остальной части, «ядра» антибиотика -6-АПК

Поскольку масштабный химический синтез таких соединений невозможен, самым простым путем проведения необходимого превращения является отщепление боковой цепи биосинтетического пенициллина, выделение 6-АПК и последующее ацилирование ее аминогруппы с получением «полусинтетического» аналога. Такая модификация представляет сложную задачу, так как при удалении боковой цепи необходимо расщепить весьма

устойчивую амидную связь и сохранить значительно более лабильную связь в беталактамном кольце пенициллина; ее разрушение ведет к необратимой инактивации антибиотика. Провести такую химическую реакцию в обычных условиях не удастся, так как при щелочном гидролизе пенициллинов выход 6-АПК не превышает 1%. Поэтому для удаления бокового радикала в молекуле антибиотика химическим путем необходим специальный подход, например, получение его иминоэфира и последующий гидролиз иминоэфира при низкой температуре. Это процесс многостадийный, энергоемкий, требует использование больших объемов органических растворителей.

С другой стороны, подобное избирательное превращение может быть проведено в одну стадию в самых обычных условиях в водной среде с использованием фермента пенициллинамидазы.

Таким образом переход к биокаталитической технологии значительно упрощает процесс, позволяет поднять выход целевого продукта, увеличить объем производства. наконец, внедрение масштабного производства 6-АПК привело к существенному увеличению выпуска полусинтетических пенициллинов и снижению их себестоимости.

Аналогичным образом иммобилизованная пенициллинамидаза используется при получении 7-аминодезацетоксицефалоспориновой кислоты, которая является ключевым соединением для синтеза новых цефалоспоринов.

В заключение рассмотрим схему получения иммобилизованной аминоксидлазы.

Продуцент фермента – бактерии *E.coli*. Эту микробную культуру выращивают и получают культуральную жидкость. Культуральная жидкость является источником фермента.

Схема получения иммобилизованной аминоксилазы.

Нативный раствор культуральной жидкости

осаждение
↓ ферментного белка
органическими растворителями или солями

осадок технического препарата фермента

↓ иммобилизация

Биокатализатор

Путем микробиологического синтеза для медицинских целей получают следующие ферментные препараты:

- **Солизим** (липолитический фермент, гидролизующий жиры, применяется при желудочно-кишечных заболеваниях)

α -амилаза (сахаролитический фермент), гидролизующий крахмал, который входит в состав лечебного препарата «Фестал», используется при недостаточной функции поджелудочной железы.

Террилитин (протеолитический фермент), рекомендуется при лечении гнойных ран, ожогов, трофических язв.

Стрептокиназа (фибринолитический фермент), используется при тромбозах

β -галактозидаза (сахаролитический фермент) используется при лактазной недостаточности.

Традиционные биотехнологии, основанные на переработке тканей животных представлены

Трипсином, химотрипсином (протеолитические ферменты) используются для рассасывания рубцов и спаек.

Урокиназой (протеолитический фермент) используется при лечении тромбозов

Пепсином (протеолитический фермент), используется при расстройствах пищеварения.

Лекция 9.

GLP , GCP, GMP,

План лекции

1. Определения понятий GLP , GCP, GMP
2. Причина введения международных правил GLP , GCP, GMP в фармацевтическое производство
3. Национальные, региональные правила GMP
4. Содержание правил GMP
 - 4.1.Терминология
 - 4.2.Обеспечение качества
 - 4.3.Персонал
 - 4.4.Здания и помещения
 - 4.5.Оборудование
 - 4.6.Процесс производства
 - 4.7.Отдел технического контроля
 - 4.8.Валидация
5. Правила организации лабораторных исследований GLP
6. Правила организации клинических испытаний GCP.

GLP – (Good Laboratory Practice) – хорошая лабораторная практика – правила организации лабораторных направлений.

GCP – (Good Clinical Practice) – хорошая клиническая практика – правила организации клинических испытаний.

GMP – (Good Manufacturing Practice) – хорошая производственная практика – правила организации производства и контроля качества лекарственных средств, это единая система требований к производству и контролю.

Правила GMP – это руководящий, нормативный документ, которому и производство и фирма обязаны подчиняться.

Правила GMP обязательны для всех предприятий, выпускающих готовые лекарственные формы (ГЛФ), продукцию медицинского назначения, а также субстанции.

Самые жесткие требования предъявляются к инъекционным лекарственным препаратам.

В 1969 году около 100 государств в мире заключили многостороннее соглашения между собой. «Система удостоверения качества

фармацевтических препаратов в международной торговле». Система была введена под эгидой Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ). Эта система была введена для оказания помощи органам здравоохранения импортирующих стран в оценке технического уровня производства и качества закупаемых ими лекарственных препаратов. В последующие годы эта система многократно пересматривалась.

Система дает выгоды импортерам. Эта система дает преимущества и экспортерам (высокоразвитые страны), когда препараты идут на экспорт без лишних препятствий.

К экспортерам лекарственных средств предъявляются следующие **требования:**

1. В стране должна быть государственная регистрация лекарственных средств.
2. В стране должно быть государственное инспектирование фармацевтических предприятий.
3. В стране должны быть приняты правила GMP.

Подобно Фармакопеям правила GMP неоднородны. Имеются:

- *Международные правила GMP*, принимает и разрабатывает Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ),
- *Региональные* – страны европейского экономического сообщества (ЕЭС),
- *Правила GMP ассоциации стран Юго-Восточной Азии*,
- *Национальные правила GMP* приняты в 30 странах мира.

Международные правила GMP по строгости требований усреднены, в ряде стран правила более либеральные (в соответствии с техническим уровнем производства). В Японии национальные правила GMP строже международных.

Правила GMP имеют 8 разделов

- I Терминология
- II Обеспечение качества
- III Персонал
- IV Здания и помещения
- V Оборудование
- VI Процесс производства
- VII Отдел технического контроля (ОТК)
- VIII Валидация (утверждение)

1-ый раздел: *терминология состоит из 25 пунктов (определений).*

Определения, что такое:

- фармацевтическое предприятие
- лекарственное вещество
- лекарственное средство
- карантин на сырье
- определение чистоты помещений, асептических условий и т.д.

2-ой раздел: *обеспечение качества*

Гарантию качества дает руководитель и квалифицированный персонал.

Условия обеспечения качества продукции на производстве:

- четкая регламентация всех производственных процессов
- квалифицированный персонал
- чистые помещения
- современное оборудование
- регистрация всех этапов производства и всех проводимых анализов
- соблюдение и регистрация порядка возврата неудачных серий

3-тий раздел: *персонал*

- руководящий персонал должен иметь профильное образование и практический опыт по производству лекарственных средств
- каждый специалист и руководящий работник на предприятии должен иметь строго определенные функции
- неруководящий персонал должен иметь график подготовки и переподготовки и график должен быть зарегистрирован
- требования соблюдения личной гигиены, гигиена и поведение регламентируются

4-тый раздел: *здания и помещения*

- производство должно располагаться вне жилых зон
- требуется исключить пересечение технологических линий
- производство бета-лактамовых антибиотиков должно осуществляться в отдельном помещении (для исключения аллергических реакций)
- классификация помещений по степени загрязненности механическими и микробными частицами
- помещения должны быть сухими

- помещения для производства и контроля качества должны иметь гладкие поверхности, доступные для мытья и дезинфекции, должны быть ультрафиолетовые установки (УФ), стационарные и переносные)
- для производства стерильных лекарственных средств соединения между стенами и потолками должны быть закругленными
- давление внутри помещений должно быть выше, чем снаружи на несколько мм ртутного столба
- должен быть минимум открытых коммуникаций
- не должно быть скользящих дверей, двери должны быть загерметизированы
- помещения для хранения сырья должны быть отделены от цехов производства.

5-ый раздел: *оборудование*

- оборудование должно быть адекватно технологическому процессу
- оборудование должно размещаться та, чтобы его можно было легко эксплуатировать
- все регистрирующие приборы должны быть откалиброваны
- поверхность оборудования должна быть гладкой, не корродирующей, не должна реагировать с веществами, задействованными в производстве
- должно быть рациональное и продуманное размещение оборудования – у персонала не должно быть лишних переходов в процессе работы
- оборудование должно регулярно проходить профилактический осмотр, что регистрируется в журналах
- оборудование для производства бета-лактамовых антибиотиков должно быть отдельным.

6-ой раздел: *процесс производства*

- должен быть сертификат качества на сырье
- перед отправлением на производство партия сырья проверяется
- выдача сырья регистрируется
- сырье подвергается проверке на микробную контаминацию или стерильность
- производственный процесс должен быть так построен, чтобы все было согласовано и безаварийно
- фильтры, содержащие асбест, не рекомендуются
- поэтапный контроль процесса производства и его регистрация в журналах (сырье - полупродукты – рабочее место – операции- технологический режим и т.д.). Порядок регистрации регламентируется, все записи делаются сразу после контроля и результаты хранят не менее 1 года.

7-ой раздел: *отдел контроля качества (ОТК) – обязательный для фармацевтических предприятий*

ОТК руководствуется государственными и отраслевыми документами, регламентирующими его деятельность

Задача ОТК

- не допускать выпуска брака
- укреплять производственную дисциплину

ОТК контролирует сырье и полупродукты, участвует в планировании и проведении постадийного контроля и хранит образцы каждой серии продукции не менее 3-х лет.

8-ой раздел: *валидация*

Валидация – это оценка и документальное подтверждение соответствия производственного процесса и качества продукции установленным требованиям. Директор предприятия специальным приказом назначает руководящего сотрудника или специалиста со стороны для проверки качества работы какого-либо цеха, технологической линии и т.д.

Валидация может быть

- периодическая, (проводится постоянно)
- внеплановая (при чрезвычайных происшествиях, при изменении технологии).

Валидация позволяет установить:

- соответствует ли технологический процесс регламенту
- соответствует ли качество готовой продукции требованиям нормативной технологической документации
- соответствует ли оборудование производственным целям
- каков предел возможности производственного процесса

Валидация оценивает:

- сам процесс
- предел возможных отклонений

При этом составляется отчет, если имеются какие либо не соответствия или нарушения – то производственный процесс прерывается.

На биотехнологическом производстве внеплановая валидация проводится если:

- производство меняет штамм продуцента
- изменена питательная среда (так как изменяется метаболизм продуцента и он может давать примеси).

GLP – правила организации лабораторных исследований

Новое лекарственное средство необходимо подвергнуть лабораторным испытаниям, прежде чем приступать к проведению клинических испытаний.

Лабораторные испытания (in vitro, in vivo) проводятся на клетках, бесклеточных системах и животных.

При испытании на животных можно получить различные результаты, поэтому важна правильная организация исследований.

Животные должны быть гетерогенны (разные), корм должен быть постоянным, одинаковым; требуется определенная планировка вивария, чтобы исключить стресс у животных; животные должны быть жизнеспособны.

GCP – правила организации клинических испытаний

Лекарственное средство допускается к клиническим испытаниям только после проведения лабораторных испытаний.

В правилах GCP изложены права больных и добровольцев:

- испытуемые должны быть информированы о том, что им вводится новый лекарственный препарат и о его свойствах
- больные имеют право на финансовое вознаграждение
- должен быть контроль за ходом испытаний со стороны медиков.

В Европе, Соединенных Штатах Америки (США) и России введены общественные комитеты по контролю за клиническими испытаниями лекарственных препаратов. В эти комитеты входят священники, представители милиции и прокуратуры, медицинской общественности, которые наблюдают за испытаниями лекарственных препаратов.

Цель клинических испытаний - получение достоверных результатов: лекарство лечит, оно безвредно и т.д.

Лекция 10.

ПРОБЛЕМЫ ЭКОЛОГИИ. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

План

1. Определение экологии
2. Сигнально-коммуникативные молекулы-феромоны
 - 2.1. феромоны-ремизеры
 - 2.2. феромоны-праймеры
 - 2.3. Классификация феромонов
3. Биотехнологические аспекты фармацевтического производства
 - 3.1. Этапы биотехнологического процесса
 - 3.2. Направления совершенствования биотехнологического производства
4. Проблемы биотехнологии в экологическом плане
 - 4.1. Различные пути утилизации отходов биотехнологического производства
5. Опасность биообъекта для окружающей среды
6. Продукты биотехнологического производства, опасные в экологическом плане.

***Экология** – наука об отношении организмов к окружающей среде (историческое определение)*

Экология изучает взаимодействие разных видов организмов с окружающей средой, которое влияет на другие организмы.

***Надорганизменные системы** - это взаимодействие организмов в биосфере (предмет изучения экологии)*

***Антропология** – это воздействие человека на биосферу.*

***Сигнально-коммуникативные молекулы** распространены в воздухе, на воде. Они передают сигналы от одного организма к другому (в надорганизмических системах (структурах)). Они влияют на поведение реципиента, они влияют на само развитие реципиента. Эти вещества в целом называются **феромонами**, что означает в переводе приносить, управлять.*

***Феромоны – ремизеры.** Они вызывают немедленный поведенческий эффект, например, сигнал тревоги.*

***Феромоны-праймеры.** Они вызывают длительный физиологический эффект в воспринимаемом организме, например, вещества, регулирующие особи насекомых к определенной касте.*

Классификация феромонов

1. По взаимодействию между видами животных.
 - 1.1. **анеомоны** (они дают выгоду донору, именно тому, кто вырабатывает феромоны)
 - 1.2. **кайромоны** (они дают выгоду тому, кто их воспринимает)
2. По практическому использованию феромонов
 - 2.1. **феромоны-ловушки** (вместо инсектицидов и ядохимикатов)
 - 2.2. **феромоны-микроорганизмы, которые также выделяют феромоны**, например, при процессе конъюгирования, когда идет сближение донора и реципиента. Если заингибировать этот процесс, то можно уменьшить конъюгацию, а это принципиально важно при таком явлении, как госпитальные инфекции

Биотехнологические аспекты фармацевтического производства.

Биотехнологическое производство наукоемкое производство и высоко эффективное производство, что влечет за собой значительное уменьшение количества отходов такого производства. При этом мало расходуется природных ресурсов, сам процесс является мало энергозатратным (мало энергоемким). Так потребление ресурсов (энергии) составляет всего 0,6-1% от всей промышленности, потребление воды 0,01%, выброс вредных веществ в атмосферу 0,00...%.

Этапы биотехнологического процесса

- подготовительные операции
- биосинтез в ферментере
- выделение и очистка вещества

Направление совершенствования биотехнологического производства

1. Совершенствование биосинтеза в ферментере приведет к уменьшению потребления энергии, уменьшению выброса вредных веществ. Это достигается выбором продуцента.
2. Замена дефицитных сред на недефицитные, а также использование недефицитных реактивов (например, китовый жир используется как пеногаситель (детергент), но он дефицит, так как был принят запрет на отстрел китов и стали выпускать синтетические пеногасители).
3. Работа с иммобилизованными биообъектами.
4. Совершенствование выделения и очистки; уменьшение количества используемых органических растворителей и введение мембранной

технологии; соблюдение правил GMP. Идеальное производство – это безотходное производство, что на практике получить невозможно. Реально иметь только малоотходное производство.

Проблема биотехнологии в экологическом плане

1. Уничтожение твердых отходов (мицелия, биомассы продуцента).

II Очистка жидких отходов (отходов от культуральной жидкости)

III Ликвидация газообразных отходов.

Уничтожение твердых отходов – пути утилизации

Известно, что при отделении мицелия фильтрованием получают сотни тонн мицелия в год. В нем имеются и остатки целевого продукта.

В настоящее время:

1. Мицелий подсушивают и отвозят на городские свалки (самый примитивный путь утилизации).
2. Помещают мицелий в грунтовые ямы на бетонный пол, перемешивают с почвой и оставляют на несколько лет – почвенные микроорганизмы перерабатывают мицелий (этот путь утилизации удобный, но не перспективный). Бетонный пол делают для того, чтобы после закладки мицелия дождевые воды не вымывали бы вещества из мицелия и они не попадали бы в грунтовые воды.

Более современные пути утилизации:

1. Мицелий можно стерилизовать, перемешивать и добавлять в корм сельскохозяйственных животных (в нашей стране не используется)
2. Мицелий можно добавлять в строительные материалы (например, в кирпич) – при этом увеличивается его прочность (как перспектива)
3. Из мицелия можно извлекать определенные фракции и использовать для определенных целей (например, из продуцента тетрациклина можно извлечь общую липидную фракцию и использовать ее как детергент вместо китового жира)

11. Очистка жидких отходов (культуральной жидкости)

1- этап. *Культуральная жидкость подается в первый отстойник с отсосом.*

II-ой этап. *Жидкость подается в аэротенк.* Аэротенк – это большой железобетонный бассейн, на дне которого уложены трубы, по которым непрерывно подается воздух из внешней среды.

Во внешнем воздухе имеется смесь микроорганизмов (биоценоз). Они окисляют органические вещества до CO_2 и H_2O , при этом количество органических веществ уменьшается на **80-90%**.

Биоциноз формируется сам по себе (из всех микроорганизмов, попавших вместе с воздухом из внешней среды, активно размножаются только те микроорганизмы, пищей для которых служат органические вещества, находящиеся в стоках). Эти микроорганизмы называют **активным илом**. Он состоит из нескольких десятков видов микроорганизмов:

- 70% относятся к роду *Pseudomonas*
- 20% относятся к роду *Bacterium*- споровые грамположительные палочки
- 10% относится к роду *Bacillus* и грамотрицательные кокки.

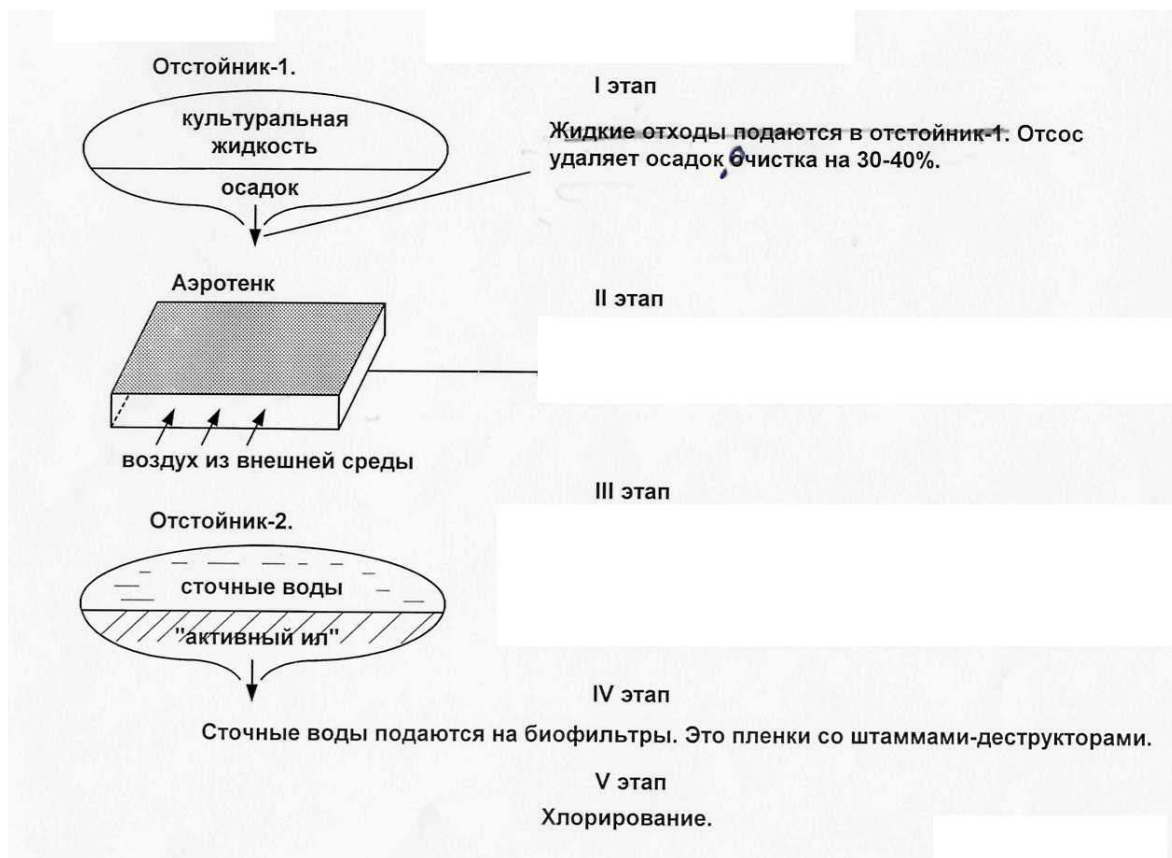
III этап. *Сточные воды из аэротенка подаются во второй отстойник.*

Во втором отстойнике происходит осаждение активного ила. Часть ила из отстойника вновь подают в аэротенк, а часть высушивают и используют как удобрение.

IV этап. *Сточные воды подаются на биофильтры.* Биофильтры составляют блок доочистки. Биофильтры – это пленки, расположенные перпендикулярно течению жидкости. В них вмонтированы штаммы-деструкторы (разрушители), полученные методом генной инженерии (они насыщены плазмидами и окислительными ферментами). Иногда эти штаммы добавляют в аэротенк (в качестве «закваски»). Однако, в аэротенке эти штаммы нельзя держать постоянно, так как они будут постепенно терять способность к деструкции (штаммы - это всего лишь искусственно созданный организм). В настоящее время в продаже имеются коммерческие «закваски» под фирменными названиями «Термобал», «Липобал», применяемые для окисления жиров. Приблизительная доза этих препаратов: 100 грамм на 1000 кубических метров (м^3) жидких отходов.

V этап. Хлорирование.

Рис. 21.



Ликвидация газообразных отходов: проводится на колонках с катализатором при температуре – 3000°C (происходит сжигание отходов до CO_2).

Биотехнологическое производство и опасность биообъекта для окружающей среды.

Опасность представляют микроорганизмы.

Контроль в этом случае предусматривает:

1. герметичность аппаратуры
2. стерилизацию ферментера и трубопроводов специальными веществами, не разъедающими металл, из которого изготовлена аппаратура.
3. генетические методы: вставление дефекта в биообъект, то есть уничтожается ген, обуславливающий образование фермента, синтезирующего какой-либо витамин или аминокислоту – при этом биообъект может размножаться только на определенной питательной среде, но при попадании в окружающую среду, он гибнет (в окружающей среде нет для него жизненно важных питательных веществ, привычной для него питательной среды).

4. физические методы, такие как уменьшение атмосферного давления в ферментере на несколько миллиметров (мм) ртутного столба (рт.ст.). В этом случае при нарушении герметичности не будет происходить выброс продуцента в атмосферу (согласно общим физическим законам разности давлений).
5. методы, позволяющие обнаруживать так называемые «убежавшие» в окружающую среду микроорганизмы. В производственном цехе делают смывы и в них опускают **зонды**. Эти зонды имеют антитела к антигенам биообъекта, антитела связаны с железом, играющим роль метки. Если в смывах имеются клетки с антигенами, то они будут прилипать к зонду.

Продукты опасные в экологическом плане

К продуктам, опасным в экологическом плане не относятся аминокислоты и белки. К продуктам, опасным в экологическом плане относятся антибиотики. Почему? Антибиотики способны влиять на микрофлору цехов и само биотехнологическое производство, если они находятся в воздухе цехов во взвешенном состоянии, поэтому в производстве антибиотиков обязательно применяются правила GMP. (смотри лекцию правила GMP, GCP, GLP).

Помимо применения в медицине антибиотики используют в ветеринарии, в животноводстве для увеличения привеса сельскохозяйственных животных, но опыт показывает, что в сельском хозяйстве нельзя применять те же антибиотики, что и для человека, так как к ним будет неизбежно развиваться такое явление как резистентность, то есть невосприимчивость организма к антибиотикам и, как следствие, невозможность проведения лечения этими антибиотиками в случае необходимости.

Лекция 11.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ – ИНСУЛИН, ИНТЕРФЕРОНЫ, ГОРМОНЫ РОСТА, ВАКЦИНЫ. ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ АНТИБИОТИКИ.

План лекции

1. Спектр биотехнологического производства рекомбинантных белков
2. Требования к микроорганизмам в производстве рекомбинантных белков
3. Правила безопасности в работе с рекомбинантными белками
4. Промышленное производство рекомбинантного инсулина
- 4.1 Схема получения рекомбинантного инсулина (фирма Eli Lilly – США)
- 4.2. Контроль концентрации инсулина в крови человека
5. Интерфероны
6. Гормоны роста человека
7. Вакцины
8. Противоопухолевые антибиотики.

Биотехнология рекомбинантных белков охватывает производство:

- гормонов (инсулина)
- вакцин (против гепатита В0)
- пептидных факторов роста тканей
- рекомбинантных интерферонов (они представляют неспецифическую защиту клетки от вирусов и злокачественных образований)

На первом месте среди них по значению стоит рекомбинантный инсулин, составляющий около 30% от всего рынка рекомбинантной продукции.

В проблеме производства рекомбинантных белков очень важно, чтобы используемые в этом случае микроорганизмы, в которые вносят чужеродные гены, удовлетворяли бы следующим свойствам:

1. Метаболизм микроорганизма должен быть хорошо изучен, поэтому в качестве продуцентов рекомбинантных белков используют именно такие микроорганизмы: это *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Микроорганизмы должны быть не патогенны.
3. Микроорганизмы должны хорошо и интенсивно размножаться в условиях ферментера.
4. Желательно, чтобы микроорганизм был способен выделять секретируемый им чужеродный белок в среду. Это можно достичь, если

ввести в клетку реципиента ген, который синтезирует рекомбинантный белок с дополнительной аминокислотной последовательностью, состоящий из гидрофобных аминокислот. Роль гидрофобных аминокислот состоит в том, что они перетаскивают белок в липидную мембрану, в которой с помощью определенных ферментов (сигнальных протеаз), гидрофобная последовательность отщепляется и образуется нужный целевой продукт – это рекомбинантный белок, выходящий в среду.

5. Должна быть возможность сделать клетки микроорганизмов компетентными для того, чтобы их клеточная стенка была бы проницаема для плазмид.

Правила безопасности при работе с рекомбинантными микроорганизмами:

1. Системы выброса оснащаются фильтрами, задерживающими микробные клетки.
2. После завершения процесса производится стерилизация оборудования, но не должно быть разъедания материалов (коррозия), из которых изготовлено оборудование.
3. В ферментере понижается давление на несколько миллиметров ртутного столба.
4. В клетку продуцента вставляется генетический дефект. Дефект заключается в том, что стираются несколько генов путем делеции, то есть избирательно удаляют гены, продуцирующие какую либо аминокислоту или фермент, синтезирующий витамин. Микроорганизм становится более капризным и уязвимым в случае изменения этой среды и соответственно не жизнеспособным.

В среде должна быть обязательно для нормального функционирования микроорганизма именно эта аминокислота или витамин, иначе микроорганизм размножаться не будет и мы не будем иметь целевой продукт.

Промышленное производство рекомбинантного инсулина

Инсулин, как вы знаете, является регулятором углеводного обмена. В организме человека инсулин синтезируется в бетаклетках островков Лангерганса поджелудочной железы. При отсутствии или недостатке его синтеза развивается

такое заболевание как сахарный диабет (инсулинозависимый диабет – 1 типа). При сахарном диабете повышается содержание глюкозы в крови и развиваются патологические процессы. Диабет II типа (инсулинозависимый) возникает при дефектах в структуре рецепторов, отвечающих за проникновение глюкозы в клетку. Все эти сведения касаются этиологии такого заболевания как сахарный диабет.

Следующий вопрос, который надо рассмотреть, это **структура инсулина**.

Итак, инсулин это пептидный гормон, состоящий из двух пептидных цепей:

А-цепь состоит из 21 аминокислотных остатков.

В-цепь состоит из 30 аминокислотных остатков

Эти две цепи связаны бисульфидными SS связями, которые обеспечивают пространственную структуру белка инсулина.

Рис.

При синтезе инсулина в поджелудочной железе вначале образуется предшественник инсулина, так называемый проинсулин. Этот проинсулин состоит из А-цепи, В-цепи и С-пептида, состоящего из 35 аминокислотных остатков.

С-пептид отщепляется под действием карбоксипептидазы и трипсина и проинсулин переходит в активный инсулин.

Есть разные способы получения инсулина. Мы остановимся на получении инсулина биосинтетическим путем, с точки зрения преимущества этого метода.

Итак, **преимущества получения инсулина биосинтетическим путем**.

До внедрения в промышленность метода получения инсулина с использованием рекомбинантных микроорганизмов существовал только один способ получения инсулина – из поджелудочных желез крупного рогатого скота и свиней. Инсулин, получаемый из поджелудочной железы крупного рогатого скота отличается от инсулина человека на 3 аминокислотных остатка, а инсулин, получаемый из железы свиньи, только на один аминокислотный остаток, то есть он ближе к человеческому инсулину. Тем не менее, при введении белков, отличающихся по структуре от белков человека даже в таком незначительном выражении, возможно возникновение аллергических реакций. Такой инсулин, как чужеродный белок, также может и инактивироваться в крови образующимися антителами.

Кроме того, для получения 1 килограмма инсулина требуется 35 тысяч голов свиней (если известно, что годовая потребность в инсулине -1 тонна препарата). С другой стороны, биосинтетическим путем можно получить такое же

количесвто инсулина, проведя биосинтез в 25 кубовом ферментере, используя рекомбинантный микроорганизм *Escherichia coli*.

Биосинтетический метод получения инсулина стал применяться в начале 80-х годов

(восьмидесятых годов).

Остановимся на схеме получения рекомбинантного инсулина (фирма Eli Lilly-Эли-Лилли, Соединенные Штаты Америки):

1. *I этап* Путем химического синтеза были созданы последовательности нуклеотидов, которые кодируют образование А и В цепей, то есть были созданы синтетические гены.
2. *II этап.* Каждый из синтетических генов вводят в плазмиды (в одну плазмиду вводят ген, синтезирующий цепь А, в другую плазмиду вводят ген, синтезирующий цепь В).
3. *III этап.* Вводят ген, кодирующий образование фермента бетагалактозидазы. Этот ген включают в каждую плазмиду для того, чтобы добиться бурной репликации плазмид.

Рис.

4. *IV этап.* Вводят плазмиды в клетку *Escherichia coli* – кишечной палочки и получают две культуры продуцента, одна культура синтезирует А-цепь, вторая В-цепь.
5. *V этап.* Помещают две культуры в ферментер. В среду добавляют галактозу, которая индуцирует образование фермента бетагалактозидазы. При этом плазмиды активно реплицируются, образуя много копий плазмид и, следовательно, много генов, синтезирующих А и В цепи.
6. *VI этап.* Клетки лизируют, выделяют А и В цепи, которые связаны с бетагалактозидазой. Все это обрабатывают бромцианом и отщепляют А и В-цепи от бетагалактозидазы. Затем производят дальнейшую очистку и выделение А и В цепей.
7. *VII этап.* Окисляют остатки цистеина, связывают и получают инсулин.

Схема биосинтеза инсулина

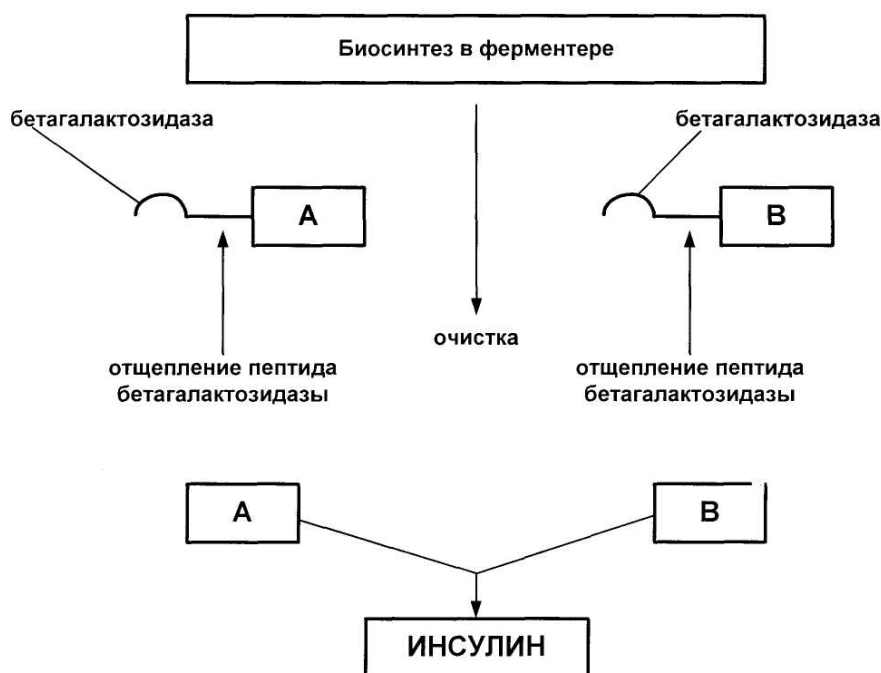


Рис.22

Инсулин, полученный этим путем является человеческим инсулином по своей структуре. Применение современных методов очистки исключает наличие в инсулине эндотоксинов и пирогенных примесей.

Контроль концентрации инсулина в крови человека

1. Определение концентрации глюкозы в крови человека
2. Применение метода радиоиммунного анализа (РИА).

Остановимся на применении радиоиммунного анализа. Для его проведения необходим специальный набор реагентов и счетчиков.

Принцип радиоиммунного анализа (РИА)

Вначале инсулин метят радиоактивным иодом I_{125} .

Затем берут определенное количество антител к инсулину в определенном объеме сыворотки и добавляют их к пробе крови (предварительно разведенной), в которой содержится немеченый (нерадиоактивный) инсулин из организма человека. Комплекс антигена (АГ) инсулин+ антитело (АТ) выпадает в осадок. Затем в эту же пробирку добавляют инсулин меченный радиоактивным иодом. В этом случае, оставшиеся после реакции с нерадиоактивным инсулином, антитела реагируют уже с радиоактивным инсулином и образующийся комплекс также выпадает в осадок. Полученный таким образом общий осадок отделяют от

реакционной смеси и определяют в нем радиоактивность. Закономерность получается такая: чем меньше инсулина в крови человека, тем больше свяжется меченого инсулина с антителами (так как останется больше не прореагировавших антител) и соответственно тем больше будет радиоактивность. Этот метод позволяет определить инсулин в концентрации 10^{-9}

-10^{-12} грамм на миллилитр (г/мл). Этот метод позволяет определить меченый инсулин независимо от любых примесей, которые могли бы исказить результат анализа.

Что необходимо иметь для проведения такого анализа?

В специальном наборе должны быть

- антитела к инсулину (эти антитела находятся в сыворотке лабораторных животных),
- проба крови с инсулином от испытуемого,
- оборудование для отделения осадка в котором можно измерить радиоактивность,
- счетчик ГСБ-1.

Если в целом представить себе схему этого анализа, то она выглядит следующим образом:

Рис.23



Интерфероны

Интерфероны – группа белковых веществ, вырабатываемых клетками, зараженными вирусами. Интерфероны индуцируют противовирусные реакции

Виды интерферонов:

И н т е р ф е р о н ы

α -группа	β -группа	γ -группа
лейкоцитарный интерферон	интерфероны фибробластов	иммунный интерферон Т-лимфоциты

Интерфероны обычно получают из донорской крови человека, хотя в настоящее время уже применяют генноинженерные способы получения интерферонов.

Методом генной инженерии получают также *реаферон* (*рекомбинантный α_2 -интерферон*). Ген человеческого α_2 -интерферона включают в штамм *Pseudomonas aerogenosa*//

Ген человеческого лейкоцитарного интерферона был получен синтетическим путем

(человеческий интерферон состоит из 150 аминокислот). Его включают в плазмиду

микроорганизма *Escherichia coli*, или в дрожжи.

Гормоны роста человека

Гормон роста человека (соматропин) состоит из 191 аминокислоты. Гормон секретируется передней долей гипофиза, он видоспецифичен, то есть можно применять только человеческий гормон. Этот гормон оказывает анаболическое действие, вызывает увеличение роста и массы тела человека при карликовости, связанной с недостаточностью гормона роста. Ген соматропина включают в микроорганизм *Escherichia coli*, или в клетки дрожжей.

Вакцины

Вирус гепатита В не размножается *in vitro*. Для получения такой вакцины этот вирус выращивают искусственно в клетках прокариот.

Противоопухолевые антибиотики

Противоопухолевые антибиотики могут обладать, но могут и не обладать антимикробной активностью, что будет зависеть от того, проникают ли они

внутри микроорганизмов. Противоопухолевые антибиотики подавляют синтез нуклеиновых кислот.

Классификация противоопухолевых антибиотиков:

1. *противоопухолевые антибиотики*, которые действуют на синтез предшественников пуринов и пиримидинов. (представителем таких антибиотиков является **азосерин**, который подавляет синтез пуринов и является структурным аналогом глутамина).
2. *противоопухолевые антибиотики*, которые действуют на стадии включения нуклеотидов в РНК. Такие антибиотики являются аналогами аденозина (нуклеотид). К ним относятся **тойокомицин, формицин, 5-фторурацил**.
3. *ДНК-тропные антибиотики* (реагируют более активно с ДНК опухолевых клеток). Это группа актиномицинов, в основе действия которых находится реакция с парами оснований (они имеют хромофор и две пептидные цепи). В результате их действия прекращается синтез по матрице ДНК. Представителями этой группы антибиотиков являются: **дактиномицин**- продукт жизнедеятельности актиномицета *Streptomyces parvulus*, **оливомицин**

Продуцируется лучистым грибом *Actinomyces olivoreticuli*, и **хромомицин**.

4. Группа антрациклинов. В своей структуре они имеют 4 шестичленных кольца и аминсахар. Продуцентами этой группы антибиотиков является актиномицеты.

Представители этой группы: **даунорубицин, доксорубицин**. Их применяют для лечения лейкозов, рака легких, рака молочной железы. Антрациклины кардиотоксичны, так как они в клетке подавляют синтез ДНК и РНК и вызывают в ДНК одно и двунитевые разрывы.

5. **Митомицин** отличается тем, что предварительно активируется в клетке (восстанавливается) и сшивает комплементарные нити ДНК, подавляя репликацию ДНК (в этом случае нити ДНК не могут разойтись).

6. **Блеомицин** - характеризуется избирательным подавлением синтеза ДНК, вызывая фрагментацию молекул ДНК. Он способен накапливаться в коже и поэтому особенно эффективен при раке кожи и слизистых оболочек. Этот антибиотик является продуктом жизнедеятельности гриба и по структуре является полипептидом.

Лекция 12.

ИММУНОБИОТЕХНОЛОГИЯ

План лекции

1. Основа иммунобиотехнологии
2. Вакцины
 - 2.1. Живые вакцины
 - 2.2. Неживые вакцины
 - 2.3. Комбинированные вакцины
 - 2.4. Токсины, как продукты жизнедеятельности микроорганизмов (экзотоксины, эндотоксины)
3. Иммунобиотехнологические препараты
4. Получение вакцин
5. Сыворотки
 - 5.1. Применение сывороток
 - 5.2. Получение сывороток
 - 5.3. Проблемы роста животных клеток
 - 5.4. Процесс культивирования животных клеток
 - 5.5. Процесс консервирования животных клеток
 - 5.6. Особенности питательной среды
6. Проблемы стерилизации в иммунобиотехнологии.

Иммунобиотехнология основана на реакции антиген (АГ)- антитело (АТ). В качестве примера иммунобиотехнологического генного процесса может служить получение вируса полиомиелита из культуры ткани живого человека для получения вакцины. Биопродукты (вакцины) должны проходить тщательную проверку на безопасность и эффективность. На эту стадию проверки вакцины уходит обычно около двух третей ($2/3$) стоимости вакцины.

Рассмотрим более подробно вакцины.

Вакцины – это препараты, приготовленные из убитых или ослабленных болезнетворных микроорганизмов или их токсинов. Как известно, вакцины применяются с целью профилактики или лечения. Введение вакцин вызывает иммунную реакцию, за которой следует приобретение устойчивости организма человека или животного к патогенным микроорганизмам.

Если рассмотреть состав вакцины, то в них входят:

- *действующий компонент*, представляющие специфические антигены,
- *консервант*, который определяет стабильность вакцины при ее хранении,

- *стабилизатор*, который продлевает срок годности вакцины,
 - *полимерный носитель*, который повышает иммуногенность антигена (АГ).
- Под иммуногенностью понимают свойство антигена вызывать иммунный ответ.*

В роли антигена можно использовать:

1. живые ослабевшие микроорганизмы
2. неживые, убитые микробные клетки или вирусные частицы
3. антигенные структуры, извлеченные из микроорганизма
4. продукты жизнедеятельности микроорганизмов, в качестве которых используют токсины, как вторичные метаболиты.

Классификация вакцин в соответствии с природой специфического антигена:

- живые
- неживые
- комбинированные.

Рассмотрим более подробно каждую из них.

1. Живые вакцины получают

а) из естественных штаммов микроорганизмов с ослабленной вирулентностью для человека, но содержащий полный набор антигенов (в качестве примера можно привести вирус оспы).

б) из искусственных ослабленных штаммов.

в) часть вакцин получают генноинженерным способом. Для получения таких вакцин используют штамм, несущий ген чужеродного антигена, например, вирус оспы со встроенным антигеном гепатита В.

2. Неживые вакцины – это:

а) *молекулярные и химические вакцины*. При этом молекулярные вакцины конструируют на основе специфического антигена, который находится в молекулярном виде. Эти вакцины могут быть получены и путем химического синтеза или биосинтеза. Примерами молекулярных вакцин являются **анатоксины**. Анатоксины – это бактериальный экзотоксин, потерявший токсичность в результате длительного воздействия формалина, но сохранивший антигенные свойства. Это **дифтерийный токсин, столбнячный токсин, ботулинический токсин**.

б) *корпускулярные вакцины*, которые получают из целой микробной клетки, которая инактивизирована температурой, ультрафиолетовым облучением или химическими методами, например, спиртом.

3. Комбинированные вакцины. Они комбинируются из отдельных вакцин, превращаясь при этом в **поливакцины**, которые способны иммунизировать сразу от нескольких инфекций. В качестве примера можно назвать поливакцину АКДС, содержащую дифтерийный и столбнячный анатоксины и коклюшные корпускулярные антигены. Эта вакцина, как известно, широко применяется в детской практике.

Рассмотрим подробнее **токсины** с точки зрения их, как продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

1 группа токсинов – это экзотоксины:

экзотоксины – это белковые вещества, выделяемые клетками бактерий во внешнюю среду. Они в значительной степени определяют болезнетворность микроорганизмов. Экзотоксины в своем строении имеют два центра. Один из них фиксирует молекулу токсина на соответствующем клеточном рецепторе, второй – токсический фрагмент – проникает внутрь клетки, где блокирует жизненно важные метаболические реакции. Экзотоксины могут быть термолабильны или термостабильны. *Известно, что под действием формалина они теряют токсичность, но сохраняют при этом иммуногенные свойства – такие токсины называются анатоксинами.*

2 группа токсинов – это эндотоксины. Эндотоксины являются структурными компонентами бактерий, представляя липополисахариды клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Эндотоксины менее токсичны, разрушаются при нагревании до 60-80⁰ С в течении 20 минут. Эндотоксины выходят из клетки бактерий при ее разложении. При введении в организм эндотоксины вызывают иммунный ответ. Получают сыворотку путем иммунизации животных чистым эндотоксином. *Однако эндотоксины относительно слабый иммуноген и сыворотка не может обладать высокой антитоксической активностью.*

Иммунобиотехнологические препараты:

Вакцины вводятся в организм для профилактики. При такой прививке активизируется иммунная система, вырабатываются антитела лимфоцитами клетками, которые сохраняют в памяти эту способность и при повторном попадании этого же антигена образуют комплекс антиген-антитело, который в свою очередь узнается организмом и утилизируется.

Вакцина для профилактики полиомиелита представляет поливалентный препарат из трех ослабленных штаммов вируса полиомиелита.

В тоже время половина из всех применяемых в настоящее время вакцин относится к **живым вакцинам** разного происхождения.

Это живые вакцины бактериального происхождения, применяемые для профилактики сибирской язвы, чумы, туберкулеза и др.

Это живые вакцины вирусного происхождения, применяемые для профилактики оспы, кори, гриппа, краснухи, полиомиелита и др.

Неживые вакцины используются для профилактики

а. **бактерийных инфекций**, таких как:

коклюш, дизентерия, холера, брюшной тиф, сыпной тиф.

б. **вирусных инфекций**:

герпес.

Примеры анатоксинов:

дифтерийный, столбнячный, газовой гангрены, ботулимический.

Классификация вакцин может быть представлена и по виду лекарственной формы:

- инъекционные (жидкие)
- пероральные (таблетки, капсулы, драже)
- ингаляционные (аэрозоли).

Получение вакцин

1. вакцины живые

1.1. живые бактериальные вакцины. Этот тип вакцин получается наиболее просто. В ферментере выращиваются чистые ослабленные культуры. Существует 4 основных стадии получения живых бактериальных вакцин:

- выращивание
- стабилизация
- стандартизация
- лиофильное высушивание.

В этих случаях штаммы продуцентов выращиваются на жидкой питательной среде в ферментере вместимостью до 1-2 м³.

1.2. живые вирусные вакцины. В этом случае вакцины получают путем культивирования штамма в курином эмбрионе или в культурах животных клеток.

2. молекулярные вакцины. Чтобы иметь представление об этом типе вакцин, надо знать, что в этом случае из микробной массы выделяют специфический антиген или экзотоксины. Их очищают, концентрируют. Затем токсины обезвреживают и получают **анатоксины**. Очень важно, что специфический антиген может быть также получен путем химического или биохимического синтеза.

*3. **корпускулярные вакцины.** Их можно получить из микробных клеток, которые предварительно культивируют в ферментере. Затем микробные клетки инактивируют температурой, или ультрафиолетовым облучением (УФ), или химическими веществами (фенолами или спиртом).*

Сыворотки

Применение сывороток

1. Сыворотки широко используются в случаях профилактики и лечения инфекционных заболеваний.
2. Сыворотки также используются при отравлении ядами микробов или животных – при столбняке, ботулизме дифтерии (для инактивации экзотоксинов), применяются сыворотки и от яда кобры, гадюки и др.
3. Сыворотки могут быть использованы и для диагностических целей, для создания различных диагностических наборов (например в тестах на определение беременности). В этом случае антитела используются в реакциях образования комплексов с антигенами (антиген (АГ) – антитело (АТ), когда происходит подтверждение наличия соответствующих антигенов, что может быть использовано в различных реакциях.

Профилактическое или лечебное действие сывороток основано на содержащихся в сыворотке антителах (АТ)

Для массового получения сыворотки вакцинируют ослов, лошадей. Введение такой сыворотки дает образование пассивного иммунитета, то есть организм получает готовые антитела. Сыворотки, которые получают путем иммунизации животных должны быть на контроле по такому показателю, как **титр антител** у животных, чтобы брать у них кровь в период максимального содержания антител. Из крови животных выделяют плазму крови, затем из плазмы удаляют фибрин и получают сыворотку. Это один способ получения сыворотки.

Другой способ получения сыворотки – это из культивируемых животных клеток. Однако главной проблемой в этом случае является обеспечение стабильного роста животных клеток. Дело в том, что клетки животных, изолированные из среды организма, часто не делятся *in vitro*. Для получения положительного результата в этом случае при переносе клеток из организма надо иметь в виду следующие условия этого переноса и его последствия:

1. Нужные нам клетки должны -

- преобладать в культуре,
- быстро адаптироваться к новым условиям,
- быстро расти.

Кроме того:

- должна быть полная стерильность при культивировании,
- питательные среды должны быть стерильными и при их изготовлении должна быть использована только стерильная вода

2. При росте клеток *in vitro*, с ними происходят перемены, то есть они:

- теряют способность к дифференциации,
- дегенерируют (перерождаются)
- трансформируются

Все эти перемены происходят с клетками животных вследствие их старения, старения самой архитектуры клеток. Если клеточная популяция сможет поддерживаться в гистологической дифференцированной форме, то они сохраняют свою специализацию.

Нормальные живые клетки растут только на поверхности – это так называемые субстрат зависимые клетки, монослойная культура. Клетки могут расти только до полного закрытия поверхности и если поверхности нет, то клетки не растут. В этом случае появляется проблема создания достаточной поверхности для роста клеток. Клетки могут выдерживать не более 50 удвоений, затем они умирают от старости.

Задача роста клеток – этот процесс еще называют **пролиферацией** – связан с увеличением биомассы за счет того, что число клеток умножается на среднюю массу клеток.

Рост клеток может быть достигнут двумя путями:

- за счет увеличения средней массы – это называется **гипертрофия**
- за счет увеличения числа клеток – это называется **гиперплазия**.

Клетки животных обычно в своей массе не увеличиваются, так как их масса удерживается в определенных пределах за счет регуляторных процессов, поэтому, когда говорят о росте животных клеток, то при этом подразумевают только увеличение их числа.

В организме взрослого человека имеется 10^{14} клеток и в организме человека каждую секунду происходит 20 делений клеток.

В организме человека имеется система регуляции деления клеток, представляющая собой комбинированный импульс, поступающий, как сигнал, от гормонов желез внутренней секреции и продуктов метаболизма. Если эта система контроля над ростом клеток будет нарушена, то развивается опухоль.

Одной из особенностей многоклеточных животных является степень специализации функций различных клеток тканей и органов, что определяется понятием **дифференциации**. Таким образом, клетки животных по мере роста зародыша становятся все более специализированными. Это ведет к образованию индивидуальных тканей с вполне конкретными функциями.

Существуют три проблемы роста животных клеток:

1. генетическая нестабильность
2. непостоянство генетических экспрессий
3. старение.

При выращивании животных клеток приходится постоянно отбирать клетки для консервирования.

В процессе развития клеток можно проводить **трансформацию** – это **изменение ростовых свойств культивируемых клеток, что является процессом необратимым и включает генетические изменения этих клеток.**

Изменение ростовых свойств клеток является одним из адаптационных процессов, который позволяет размножаться им в неблагоприятных условиях. Благодаря трансформации клетки получают возможность расти *in vitro* в виде суспензии до высокой плотности популяции этих клеток, что связано с понижением потребности в факторах роста. Трансформация позволяет расти клеткам в условиях, где отношение площади и объема менее благоприятно, чем у нормальных клеток, потому что у трансформированных клеток уже нет субстратной зависимости и геометрический фактор роста не имеет значения.

Что касается старения клетки, то этот показатель является ограничением потенциала деления (всего 50 делений). Если добиться повышенной способности к росту клетки, то это значит, что трансформация преобладает над старением.

Причины старения сводятся к двум моментам:

1. постепенное накопление трансформационных ошибок в следствии вредных влияний мутаций, когда происходит старение и гибель клетки,
2. генетическая запрограммированность смерти.

В самом процессе биотехнологического культивирования используют, получая после неоднократных пересевов, клеточную линию диплоидных

клеток, соблюдая определенную плотность популяции (часть клеток консервируют).

В качестве материала для культивирования можно использовать почки обезьян, почки собак, почки кроликов, куриный эмбрион (возраст -14 дней), клетки легких эмбриона человека (возраст -16 недель). Понятно, что чем моложе материал, тем дольше культивируется клетка.

Весьма важным является и **процесс консервирования**, как средство сохранения нужного генома и посевного материала клеток с определенным временем роста (сохраняют молодые клетки, являющиеся резервным фондом популяции).

Особенностью животных клеток является то, что они не способны выдерживать лиофилизации и их консервируют только в жидком азоте при температуре минус 196°C . При такой температуре клетки полностью стабильны. Для замораживания используют стеклянные ампулы определенных размеров, например, на

1 миллилитр (мл).

Однако в процессе замораживания могут происходить вредные процессы. Это:

1. образование кристаллического льда в клетке
2. обезвоживание
3. повышение концентрации растворенных веществ.

Возникновение этих вредных процессов во многом зависит от скорости замораживания. Существуют определенные **правила замораживания**, которые сводятся к следующему:

- нужно использовать ампулы только небольших размеров (на 1 мл),
- необходимо внесение криопротекторов (такие, как полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливинилпропил (ПВП), диметилсульфацил).
- скорость замораживания должна быть одинаковой внутри ампулы и около ее стенки, например,
 - лейкоциты охлаждают со скоростью $0,5 - 2^{\circ}$ в минуту,
 - фибробласты – $1 - 3^{\circ}$ в минуту,
 - клетки эпителия – $2 - 10^{\circ}$ в минуту.

Восстановление жизненных функций также проводится с определенной скоростью.

Очень важным является и представление о составе питательной среды для культивирования животных клеток. Прежде всего, это 13 незаменимых L- аминокислот с определенной концентрацией их содержания в среде, например, аргинин $0,6 \text{ ммоль/л}$,

цистеин 0,1 ммоль/л,
изолейцин 0,4 ммоль/л,
глутамин 2,0 ммоль/л и так далее.

Затем обязательным является и присутствие
белков,
липидов (из сыворотки),
углеводов,
витаминов (всего 8),
источников углерода (глюкоза 5,5 ммоль/л),
сыворотки крови – 5-10% по объему,
незаменимых жирных кислоты (линолевая, арахидоновая, линоленовая),
предшественников простагландинов,
неорганических ионов (натрия хлорид (NaCl), калия хлорид (KCl), кальция хлорид (CaCl₂) и т. д.,
микроэлементов (железо, медь, кобальт, цинк, селен и т. д. (всего 15).

И, наконец, проблемы стерилизации.

- стерилизация среды осуществляется мембранным фильтрованием, среду готовят на дистиллированной, стерилизованной воде,
- стерилизация оборудования происходит острым паром или химическим способом (если это пластмассовые детали).

Режим культивирования осуществляется при определенной температуре, обычно при 37⁰С.

Иммуноферментный анализ (ИФА) в медицинской практике

План лекции

1. Возможности биохимического анализа
2. Иммунохимические методы
 - 2.1.антитела
 - 2.2.антигены
 - 2.3.получение антител
 - 2.4.гибридомы
 - 2.5.принципы ИФА
 - 2.6.маркеры в ИФА
 - 2.7.основные методы ИФА
 - 2.8.Применение ИФА

Проблема биохимического анализа заключается в способности надежно определять нужное вещество в сложных многокомпонентных системах (средах). В решении этой проблемы применяется ИФА как наиболее специфичные, основанные на реакции связывания антител с антигеном в прочные комплексы. Высокая специфичность антител к широкому кругу различных веществ в сочетании с чувствительными методами регистрации, образующихся комплексов, обуславливает интенсивное развитие ИФА в различных областях медицины, ветеринарии, экологии.

Известно, что главным компонентом иммунохимической реакции являются **антитела (или иммуноглобулины), представляющие белки сыворотки крови, которые синтезируются в организме человека как проявление защитной реакции- иммунитета при попадании в него чужеродного вещества (ксенобиотика) – антигена.** Что касается структуры антител, то основным элементом ее является четырехцепочечная молекула из двух пар идентичных полипептидных цепей: легких (L) и тяжелых (H) с молекулярной массой 22000 и 50000-70000 грамм моль соответственно. Все цепи соединены дисульфидными связями. К обеим тяжелым цепям ковалентно присоединены олигосахаридные фрагменты (см. рис.) Схематическая структура молекул иммуноглобулина представлена на рисунке. Различают 5 классов иммуноглобулина человека это IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, **полипептидные цепи которых образуют глобулярные домены из 110 – 115 остатков.** Концевые домены и определяют биологические свойства иммуноглобулинов. **Вариабельные домены легких и тяжелых цепей образуют активный центр антител соответствующей специфичности.**

Во взаимодействии с антигеном принимает участие большое количество аминокислотных остатков молекулы антигена.

Антитела образуются не против всей молекулы белка или бактериальной клетки, а только к небольшим участкам на их поверхности, которые получили название **антигенных детерминант**. Антигенные детерминанты представляют собой **выпуклые части молекулы, которые могут входить внутрь активного центра антител**. В случае бактериальных клеток в качестве антигенных детерминант выступают короткие цепочки из 3-5 остатков сахаров, образующие стенку бактерий.

Низкомолекулярные соединения, например, некоторые лекарственные средства, сами не могут вызывать образование антител. Их называют **гаптенами**. Однако, после присоединения гаптенных к поверхности макромолекулы, организм начинает вырабатывать на них антитела.

Получение антител. Отвечая на этот вопрос, надо знать что такое иммунный ответ. Иммунный ответ это сложный процесс межклеточного взаимодействия различных типов лимфоидных клеток с участием специальных гормонов, в результате чего так называемые В-клетки активно синтезируют специфические антитела против данного антигена.

Для получения антител берут животных – это могут быть мыши, морские свинки, кролики, куры, овцы, козы, куры, лошади и делают им инъекции антигена. В присутствии стимуляторов иммунного ответа, в сыворотке крови накапливаются специфические антитела. Обычно антитела выделяют из сыворотки в виде гаммаглобулиновой фракции, осаждая сыворотку крови сульфатом аммония, спиртом или полиэтиленгликолем. Эти антитела имеют много примесей белков. Высокоочищенные антитела выделяют с помощью ионообменной хроматографии, аффинной хроматографии на иммуносорбентах.

Антитела, однородные по структуре и специфичности, производимые в неограниченных количествах называются моноклональными антителами.

Способ получения моноклональных антител. Такой способ был предложен в 1975 году учеными Г.Келером и К. Мильштейном. Они вводили антиген в организм мыши и получали активно продуцирующие антитела β - клетки. Эти клетки могут жить только в организме хозяина, но *если соединить иммунную клетку с клеткой опухолевой (эти клетки называют миеломные лимфоциты), то образуются гибридные клетки со свойствами своих предшественников, так как они способны долго жить в искусственных условиях и одновременно синтезировать антитела. Такие клетки называются гибридомами.* Существуют методы отбора отдельных клеток, синтезирующих только один тип антител. Такие клетки помещают в культуральную жидкость, где они растут, образуя много родственных «клонов», синтезирующих большое количество антител под названием моноклональных. Отсюда возникает название **моноклональные антитела**.

Проведение иммунохимического анализа.

Примером проведения такого анализа может служить хорошо Вам известная реакция гемагглютинации, когда взаимодействие белковых антигенов с антителами вызывает их осаждение, то есть преципитацию. Это только качественный или полуколичественный метод.

Проблема установления концентрации антигена решается на основе конкурентного связывания антителами меченного и немеченого антигена, что обусловило, (определило) широкое практическое применение этого принципа.

Итак, иммуноферментный анализ применяется в том случае, если можно:

1. получать специфические антитела,
2. получить высокоочищенные антигены,
3. ввести метку, «маркер» в исследуемое вещество,
4. разделить связанные и свободные компоненты реакции,
5. выбрать метод определения концентрации «маркера»,
6. оптимизировать и стандартизовать условия проведения анализа.

В качестве «маркеров» применяются

1. радиоактивные метки (это радиоиммунный анализ (РИА, с использованием радиоактивных атомов – тритий, радиоактивный иод и другие).
2. ферментные метки (если ферменты стабильны, активны и действуют в минимальных концентрациях). Суть: субстрат превращается в продукт и далее обнаруживается фотометрическим методом.
3. Субстратные метки (АТФ и НАД), которые «пришиваются» к молекуле антигена через адениновый остаток и сохраняют способность взаимодействия с ферментом.

Для введения ферментативной метки применяются химические, биохимические, иммунологические способы.

Основные методы иммуноферментного анализа.

- конкурентные на твердой фазе, суть которых заключается в том, что заданное количество антител конкурентно взаимодействует со смесью неизвестного количества измеряемого вещества и постоянного количества этого же вещества, связанного с какой-либо меткой. После завершения иммунохимической реакции измеряют количество метки, связанной с антителами, используя калибровочные графики.

- иммунометрические по принципу «сэндвич»-анализ, когда на твердой фазе иммобилизуют избыток антител, с которыми проводят инкубацию антигена. После удаления несвязавшихся компонентов (антигена) в систему добавляют избыток меченых антител, которые взаимодействуют с антигеном. Чувствительность и точность этого метода выше, чем конкурентных методом. Для сокращения времени анализа и повышения избирательности детекции антигена используют моноклональные антитела, так как они весьма специфичны.
- кинетические, принципы те же, но делают измерения в кинетическом режиме для ускорения анализа с использованием программного управления. Это позволяет повысить чувствительность и точность анализа.

Применение ИФА.

- 1. В диагностике микробных и вирусных возбудителей.**
- 2. В диагностике неинфекционных болезней (диабет, рак, сердечно-сосудистые заболевания).**
- 3. Для контроля (мониторинга) лекарственной терапии (различных психотропных лекарственных препаратов, препаратов, влияющих на сердечно-сосудистую систему и других)**
- 4. Для выявления отравления наркотиками, для выявления допинговых препаратов в организме человека**
- 5. В контроле технологических процессов, в определении качества биотехнологической продукции в микробиологических производствах:**
 - 5.1. Для быстрого выявления высокоэффективных микроорганизмов – продуцентов ферментов, антибиотиков и других веществ**
 - 5.2. Для контроля наличия посторонних микроорганизмов и бактериофагов в ферментерах**
 - 5.3. Для определения степени загрязненности воздуха**
 - 5.4. Для обнаружения в донорской крови вируса гепатита В**
 - 5.5. Для определения белковых примесей в препарате инсулина.**

Помимо медицинской практики методы иммуноферментного анализа применяются в ветеринарии и сельском хозяйстве, особенно в растениеводстве.

Лекция 13.

РЕГУЛЯЦИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ. МЕХАНИЗМЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ.

План лекции

1. Метаболизм микробной клетки и его влияние на биотехнологию производства лекарственных средств
- 1.2. Индукция и репрессия синтеза ферментов
- 1.3. Схема индукции Жакобо и Моно.
- 1.4. Аллостерический центр (определение, функционирование)
- 1.5. Ретроингибирование (схема, меры борьбы)
- 1.6. Строгий аминокислотный контроль (механизм, значение в биотехнологическом производстве)
- 1.7. Катаболитная репрессия
- 1.8. Регуляция обмена азотсодержащих соединений
2. Перенос вещества через мембраны
- 2.1. Виды транспорта
- 2.2. Влияние характера переноса вещества через мембраны с эффектом продуктивности промышленных штаммов микроорганизмов при получении лекарственных средств.

Известно, что рост клетки, ее нормальное функционирование и даже само выживание зависит от того, насколько эта клетка обладает способностью управлять процессами биосинтеза, а также вносить качественные преобразования в работу метаболического аппарата, отвечая на изменение условий среды. Такие функции клетки потребовали развития и наследственного закрепления весьма сложных и тонких регуляторных механизмов, обеспечивающих прежде всего экономичность метаболических процессов и, конечно, высокий уровень их координации.

Часто цели биотехнологов, направленные на усиление образования того или иного продукта, или синтез нового продукта, естественно встречают сопротивление клетки, желающей сохранить свою стабильность, что влечет за собой изменение регуляторных механизмов клетки.

В микробной клетке в процессе ее роста и жизнедеятельности происходит огромное число реакций, катализируемых ферментами. Участниками таких реакций могут быть первичные и вторичные метаболиты. К первичным метаболитам относятся аминокислоты, сахара, аминосахара, структурные

белки, липиды, пурины, пиримидины и др. Вторичные метаболиты представляют вещества, образующиеся в ответ на стрессовую ситуацию, изменение экологии, например, это антибиотики, феромоны.

1. Индукция и репрессия синтеза ферментов

Механизмы индукции и репрессии предохраняют клетку от напрасной траты аминокислот и энергии на образование ненужных в данных условиях ферментов. С другой стороны, если появляется необходимость, эти ферменты могут быстро синтезироваться.

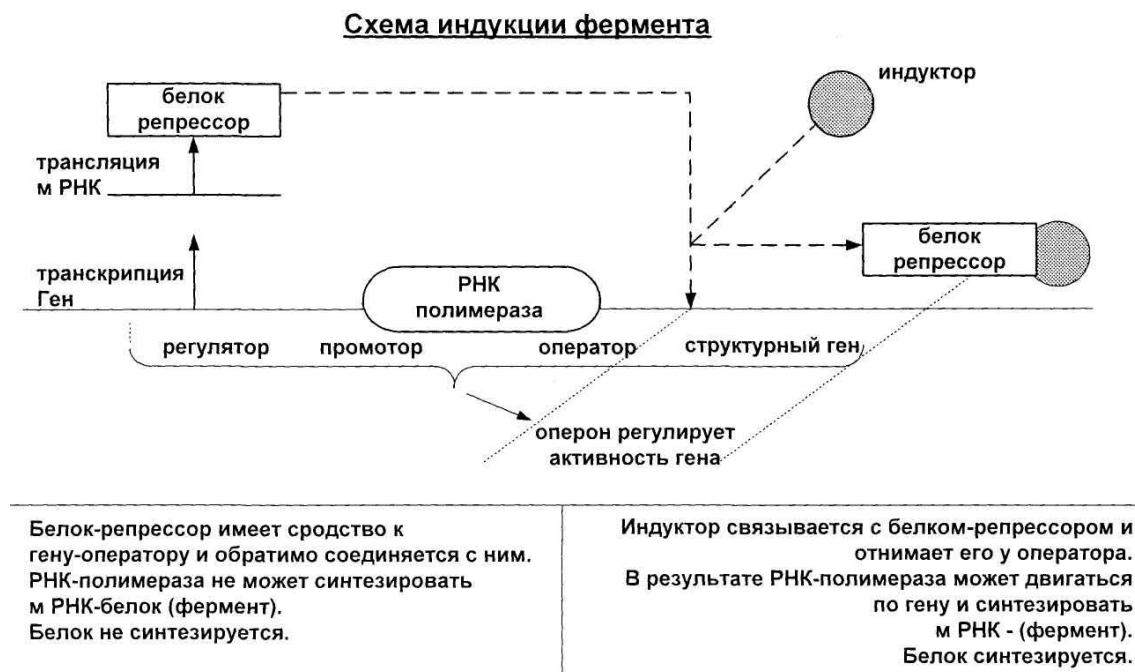
Из многих тысяч ферментов микробные клетки в процессе роста способны синтезировать постоянно и не зависимо от питательной среды так называемые конститутивные ферменты (примером таких ферментов являются ферменты гликолиза, превращающие глюкозу в пируват).

Другие ферменты, называемые адаптивными или индуцибельными, образуются только тогда, когда их субстраты (или структурные аналоги субстратов) присутствуют в среде. Например, клетки *E.coli.*, которые растут на среде с глюкозой, содержат только следы ферментов метаболизма лактозы. Если же эти клетки перенести в среду, содержащую в качестве единственного источника углерода лактозу, то можно наблюдать значительное повышение активности бетагалактозидазы. Этот фермент способен гидролизовать лактозу на D-галактозу и D-глюкозу. Это пример индукции фермента. Клетка получает возможность полностью усвоить лактозу в результате последовательной индукции ферментов, которые превращают лактозу в метаболиты, непосредственно используемые клеткой.

Индукция фермента – это относительное увеличение скорости синтеза фермента в ответ на появление химического соединения – индуктора.

Явление индукции ферментов впервые было изучено лауреатами Нобелевской премии Ф. Жакобом и Ж.. Моно.

Рис.24.



В 1961 году Ф.Жакоб и Ф.Моно на основании генетического и биохимического изучения усвоения лактозы клетками *E.coli* предложили гипотезу о регуляции активности генов у бактерий, получившую широкую известность как «модель оперона». Согласно этой модели, на хромосоме имеется по крайней мере четыре компонента системы регуляции: структурный ген (или гены, контролируемые связанными между собой биохимическими функциями), ген-регулятор, оператор и промотор, которые составляют оперон. Ген-регулятор (R), определяет структуру белка-репрессора.

Этот белок способен связываться с оператором (O), который контролирует функционирование расположенных рядом структурных генов (S_1, S_2, S_3). Промотор (P) является начальным участком для связывания РНК-полимеразы, представляющей фермент, который катализирует транскрипцию ДНК в мРНК. Если белок-репрессор связан с оператором, то РНК-полимераза не имеет возможности перемещаться (или присоединяться) к промотору и в этом случае м РНК, которые комплементарны последовательности генов S_1, S_2, S_3 , не образуются (рис.2,а). Следовательно, и соответствующие ферменты также не синтезируются.

В другом случае, когда оператор свободен от белка-репрессора, РНК-полимераза, присоединившись к промотору (P), может перемещаться и

транскрибировать гены S_1 , S_2 , S_3 . Образование индуцибельных ферментов происходит при добавлении индуктора, который связывается с белком-репрессором и инактивирует его (рис. 2,а).

Жакоб и Моно считали, что репрессор представляет собой аллостерический белок, который содержит два специфических центра. Один центр обладает сродством к нуклеотидной последовательности оператора, а другой центр обладает сродством к молекуле индуктора.

Присоединение индуктора к репрессору ведет к снижению сродства первого аллостерического центра к оператору, в результате оператор освобождается от репрессора.

Мутации в гене-регуляторе или в операторе могут нарушать образование репрессора или его связывание. В обоих случаях потребность в индукторе для синтеза ферментов исчезает. Такие мутанты называются конститутивными, так как у них соответствующие ферменты синтезируются постоянно. Получение конститутивных мутантов имеет важное значение в селекции промышленных штаммов микроорганизмов.

Комментарий к определению «аллостерический белок» Исследование механизма подавления под действием конечного продукта, проведенные *in vitro* с использованием очищенных ферментов показали, что ингибитор образует комплекс с ферментом, связываясь со специфическим участком, полностью отличающимся от активного центра фермента. Этот участок фермента получил название аллостерический участок или аллостерический центр (от греческого «аллос»-другой, «стереос» - пространственный), а ферменты, имеющие аллостерический центр, - аллостерическими ферментами.

Аллостерический центр – это участок фермента, который образует комплекс с конечным продуктом, в результате чего искажается трехмерная структура фермента (в том числе и его активного центра) и фермент становится не способным катализировать реакцию.

Аллостерические ферменты представляют собой олигомеры, состоящие из двух, четырех, шести (или более) идентичных или различных субъединиц, способных взаимодействовать друг с другом. Связывание ингибитора искажает трехмерную структуру фермента. Это искажение передается активному центру и вызывает подавление активности фермента. Таким образом, некоторые метаболиты обладают способностью передавать информацию (как правило, путем изменения концентрации) ключевым ферментам о состоянии обмена веществ в клетке, в частности, подавать

сигнал о необходимости прекращения дальнейшего функционирования данного метаболического пути.

При мутационном повреждении аллостерического центра процесс биосинтеза не будет более подавляться конечным продуктом, и этот продукт начнет выделяться в среду. Для отбора таких мутантов используют структурные аналоги метаболитов. Например, 5-метилтриптофан, аналог триптофана, так же как и триптофан, подавляет антранилатсинтетазу, но не заменяет триптофан в белке и поэтому задерживает рост бактерий.

Для общего обозначения регуляторных молекул, которые ингибируют или активируют аллостерические ферменты, используют термин аллостерические эффекторы.

Получение мутантов, устойчивых к аналогам метаболитов, часто используют в селекции продуцентов аминокислот, нуклеотидов и витаминов.

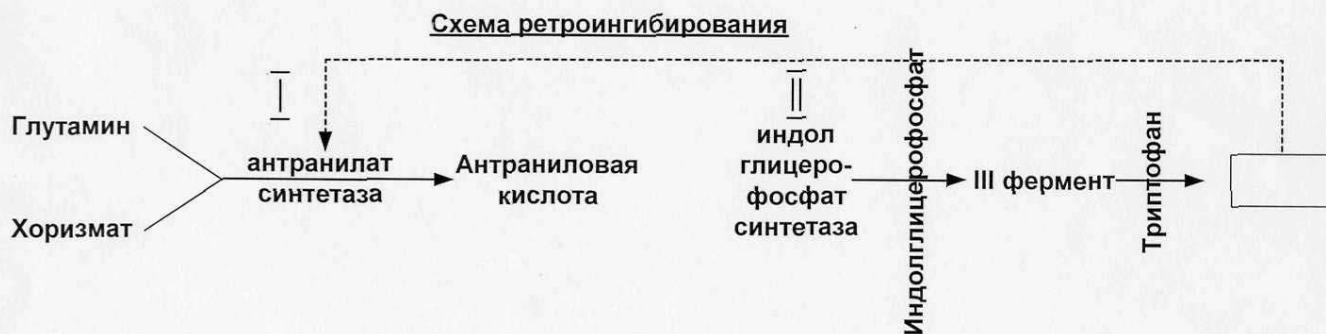
Активные и неактивные формы фермента могут различаться также наличием или отсутствием каких-либо химических групп, ковалентно связанных с белком. Взаимный переход фермента из одной формы в другую достигается путем фосфорилирования –дефосфолирования (ферменты метаболизма гликогена эукариотических клеток), аденилирования – деаденилирования (глутаминсинтетаза *E.coli*), ацетилирования – деацетилирования. Ковалентную модификацию можно рассматривать как частный случай аллостерической регуляции.

Наиболее гибким и широко распространенным способом контроля метаболизма в клетке является регуляция активности фермента по принципу обратной связи.

Известно, что процессы биосинтеза многих незаменимых (первичных метаболитов) характеризуются тем, что конечный продукт данного (конкретного) биосинтетического пути при повышении его концентрации подавляет активность первого фермента этого пути. В результате такого подавления и соответствующий процесс биосинтеза останавливается. Конечный продукт, а также и промежуточные продукты, участвующие в его образовании, не накапливаются в клетке. Этот механизм автоматической регуляции называют подавлением под действием конечного продукта или **ретроингибированием**.

Ретроингибирование (ингибирование по принципу обратной связи)

Это процесс подавления ключевого (первого) фермента метаболического пути конечным продуктом.



Аллостерический центр - участок фермента, который образует комплекс с конечным продуктом, в результате чего искажается трехмерная структура фермента (в т.ч. и его активного центра) и фермент становится не способным катализировать реакцию.

Это высокоспецифическое подавление активности первого фермента заключительного этапа пути биосинтеза триптофана обеспечивает строгую и очень гибкую регуляцию новообразования этой аминокислоты в зависимости от скорости включения ее в белок и присутствия в ростовой фазе.

В процессе роста бактерий преимущественно используют добавление аминокислот, пуринов, пиримидинов, так как эти соединения оказывают ингибирующее действие на свой собственный синтез из молекул предшественников.

Борьба с ретроингибированием

1. Создание мутантных штаммов, которых фермент бы не имел аллостерического центра.
2. Удаление накапливающегося целевого продукта: ферментацию в этом случае осуществляют с сорбентом (активированным углем), на котором триптофан сорбируется.
3. Действие на аллостерический центр специальных активатором — аллостерических эффекторов, которые более активно связываются с аллостерическим центром, чем ингибитор (триптофан).

Строгий аминокислотный контроль

Система внутриклеточной регуляции, аминокислотный контроль метаболизма и функции гуанидинтетрафосфата

Если перевести клетки с бедной среды на богатую, они начинают быстро размножаться, при этом резко повышается скорость образования РНК, образуется много рибосом и повышается синтез белка. В случае перевода клеток с богатой среды на бедную скорость синтеза белка снижается. Это изменение скорости синтеза белка происходит благодаря строгому аминокислотному контролю синтеза РНК.

Ключевую роль в механизме строгого аминокислотного контроля синтеза РНК играет ген *rel A*. Важно знать, что от механизма строгого аминокислотного контроля во многом зависит успех ферментации, биосинтез целевых продуктов.

Stringent control – строгий контроль синтеза РНК имеет место у *rel A* положительных клеток «+», то есть у клеток, имеющих ген *rel A*).

Рассмотрим механизм строгого аминокислотного контроля.

У *rel A* положительных клеток на бедной среде обнаруживаются два соединения, являющиеся производными пирофосфорилированного гуанозина :

- гуанозинтетрафосфат (гуанозин-5' дифосфат-3' дифосфат)
- гуанозинпентофосфат (гуанозин-5' трифосфат-3' дифосфат)

Когда клетка находится на бедной среде, то она испытывает нехватку аминокислот. Вместо аминоацил тРНК на молекулу иРНК садится пустая РНК. Это служит сигналом для активации связанного с рибосомой белкового фактора – фермента пирофосфаттрансферазы. Специфическая пирофосфаттрансфераза переносит фосфатные остатки на ГТФ – гуанозинтрифосфат, который превращается в пирофосфорилированные гуанозиновые производные – это гуанозинтетрафосфат и гуанозинпентофосфат. Гуанозинпентофосфат не выполняет в клетке полезных функций, поэтому другой фермент отщепляет от гуанозинпентофосфата один фосфатный остаток и он превращается в гуанозинтетрафосфат.

Гуанозинтетрафосфат связывается с ферментом РНК-полимеразой, в результате этого снижается ее сродство к промоторам разных генов, то есть с промоторами одних генов она может связываться, а с промоторами других генов не может. В результате этого экспрессия одних генов снижается, а других усиливается.

Гены, прекращающие работу – это те гены, которые должны синтезировать ферменты, участвующие в синтезе РНК и рибосомных белков. Таким образом, при недостатке аминокислот в среде белок не синтезируется. Но при появлении аминокислот в среде снова начинается синтез рибосом и белков.

При дефиците энергии клетке выгодно перейти в спокойное состояние, что и делается за счет снижения распада гуанозинтетрафосфата. Все эти механизмы адаптации имеются у *rel A* положительных клеток.

Значение строгого аминокислотного контроля в биотехнологическом производстве.

Строгий аминокислотный контроль может оказывать негативное и позитивное влияние. Позитивное влияние строгий аминокислотный контроль имеет тогда, когда необходимо получить чистый продукт без белковых примесей. Это необходимо при синтезе антибиотиков, витаминов. При накоплении биомассы строгий аминокислотный контроль мешает биотехнологу.

Катаболитная репрессия. Перенос вещества через мембрану клетки

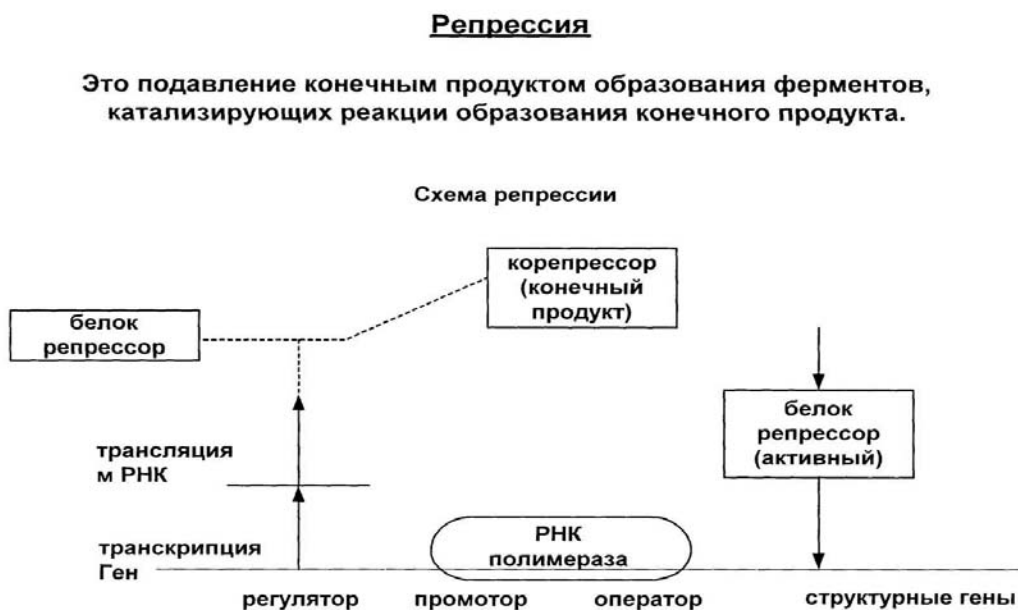


Рис.26.

В природных условиях в среде может находиться одновременно несколько субстратов, которые микробная клетка способна усваивать в качестве источников углерода и энергии. Однако это не приводит к синтезу всех ферментов, необходимых для катаболизма. В первую очередь образуются те ферменты, которые обеспечивают утилизацию наилучшего субстрата для

поддержания наиболее высокой скорости роста. Для многих микроорганизмов таким субстратом является глюкоза. Клетка усваивает ее в первую очередь. Таким образом глюкоза может влиять на утилизацию других субстратов, вызывая у микроорганизмов катаболитную репрессию.

Глюкоза относится к легко усвояемым или быстро ассимилируемым субстратам, которые вызывают постоянную более или менее выраженную репрессию катаболических ферментов. В результате подавляется окисление других субстратов.

Катаболиты глюкозы (АТФ) накапливаются внутри клетки и подавляют синтез катаболических ферментов. Помимо репрессии имеет место и процесс ретроингибирования – подавление активности ключевого фермента по принципу обратной связи – АТФ подавляет активность фермента гликолиза фосфофруктолазы, связываясь с ее аллостерическим центром.

- Для биотехнолога важно иметь такие мутанты, у которых не было бы процесса катаболитной репрессии, например, она может неблагоприятно отразиться на синтезе антибиотиков.
- Генные инженеры при получении новых продуцентов должны обращать внимание на механизм репрессии. Если репрессия синтеза конечного продукта имеет место, то можно получить штаммы, у которых этот механизм нарушен. У таких штаммов ген-оператор не реагирует с репрессором.

Регуляция обмена азотсодержащих соединений

Все микроорганизмы хорошо усваивают азот из солей аммония, органических азотсодержащих соединений (это и атмосферный азот и такие сложные органические молекулы, как гистидин, пролин, аргинин. Конечным продуктом катаболизма азотсодержащих соединений является аммиак. В свою очередь, аммиак необходим для синтеза аминокислот.

Ключевыми соединениями в биосинтезе азотсодержащих веществ являются глутамин, глутамат, аспартат.

Глутамин, глутамат и аспартат могут превращаться друг в друга в результате следующих реакций:

1. Глутамат + NH_3 + АТФ \rightarrow глутамин + АДФ + Ф
2. Глутамин + α -кетоглутарат + НАДФН \rightarrow 2 глутамат + НАДФ⁺
3. Глутамат + оксалоацетат \leftrightarrow аспартат + α -кетоглутарат

Ферменты, катализирующие эти реакции обнаружены у всех микроорганизмов, способных усваивать аммиак в качестве единственного источника азота.

Первую реакцию катализирует фермент глутаматсинтетаза, состоящая из 12 субъединиц (молекулярная масса 600000) Ингибиторами глутаматсинтетазы является АМФ. 12 молекул АМФ садятся на 12 субъединиц глутаматсинтетазы и ингибируют ее, при этом прекращается синтез целого ряда азотистых продуктов.

Так как синтез некоторых ферментов (например, протеиназ), а также многих вторичных метаболитов подвержен азотной репрессии, то продукция этих соединений может быть увеличена не только в результате замены катиона аммония в среде на менее эффективные источники азота, но и с помощью специфических мутаций, снимающих репрессию аммиаком. Кроме того, регуляция соответствующих генов может быть изменена с помощью методов генной инженерии.

Перенос вещества через мембраны

Известно, что любая живая клетка окружена мембраной – ее часто можно встретить под названием плазматической. Мембрана функционирует как стена, отделяющая живое содержимое от неживого окружения. Однако плазматическая мембрана не просто оболочка, так как она избирательно проницаема и регулирует поступление в клетку низкомолекулярных веществ (ионов, молекул) и выход их из клетки наружу.

Клеточные мембраны построены из двойного слоя фосфолипидов с включением и полипептидов. Например, в мембранах бактерий находится около 300 различных белков, которые участвуют в процессе дыхания, транспорта электронов и биогенеза самой мембраны. Двойной липидный слой плазматической мембраны должен полностью препятствовать проникновению всех полярных молекул, которыми являются в своем большинстве молекулы питательных веществ. Для того, чтобы питательные вещества поступали в клетку существуют специальные мембранные белки и модифицированные участки мембраны.

У микроорганизмов плазматическая мембрана хрупкая и в тоже время эластичная, имеющая в своем окружении клеточную оболочку (или клеточную

стенку). Клеточная оболочка – это прочный сетчатый каркас, пропускающий многие молекулы.

У эукариотов клеточная стенка состоит из связанных различным образом полимеров глюкозы, глюкозамина или N-ацетилглюкозамина. Общим компонентом клеточной стенки прокариот является пептидогликан, состоящий из чередующихся субъединиц N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты. Пептидогликан прилежит к мембране.

У грамотрицательных бактерий оболочка клетки имеет более сложное строение, чем у грамположительных. Она содержит дополнительный барьер проницаемости, так называемую внешнюю мембрану, состоящую из двойного слоя липополисахаридов и фосфолипидов. Внешняя мембрана содержит около 50 различных белков, многие из которых участвуют в переносе веществ. Промежуток между плазматической мембраной и внешней мембраной грамотрицательных бактерий называется периплазматическим пространством или периплазмой. Здесь находится около 100 различных белков, которые участвуют в транспорте и катаболизме многих соединений.

Виды транспорта переноса веществ через мембраны.

Пассивная диффузия определяет поступление в клетку небольшой группы веществ, в том случае, если концентрация их в среде выше, чем концентрация в самой клетке. В этом случае, очевидно, они (вещества) не взаимодействуют со специфическими компонентами клеточной мембраны. Таким путем обычно поступают в клетку: вода, неполярные и малополярные молекулы газов (кислород, азот, водород) и углеводороды.

Облегченная диффузия определяет поступление веществ в клетку с помощью специфических мембранных переносчиков. Мембранные переносчики являются мембранными белками под общим названием **пермеазы**, которые иногда индуцируются своими субстратами. Переносимое вещество связывается с пермеазой снаружи и освобождается уже внутри клетки. При облегченной диффузии аналогично пассивной диффузии, переносимый субстрат движется по градиенту концентрации (то есть от более высокой к более низкой концентрации). Очень важно, что ни один из этих процессов не требует метаболической энергии.

Системы активного транспорта могут обеспечить внутри клетки значительно большие (в тысячи раз) концентрации растворенных веществ, чем их концентрации во внешней среде. Такие системы обеспечивают возможность развития микроорганизмов в условиях низкого содержания питательных веществ. Активный транспорт специфичен по отношению к субстрату. Эта

специфичность обеспечивается мембранным переносчиком. Так, например, когда переносчик обращен к внешней поверхности мембраны, он имеет высокое сродство к субстрату, а когда обращен к ее внутренней поверхности – низкое. Поэтому субстрат как бы «накачивается» в клетку, что сопряжено с затратой метаболической энергии, которая обеспечивает диссоциацию субстрата и переносчика на внутренней поверхности мембраны. Так, например, с помощью механизма активного транспорта в клетку поступает лактоза (ее перенос происходит при участии бетагалактозидпермеазы). Если блокировать образование энергии (например, азидом натрия), то активный транспорт лактозы прекращается.

У микроорганизмов, в частности у *E.coli.*, обнаружены также системы активного транспорта, которые используют химическую энергию АТФ. Такие системы обычно функционируют с помощью расположенных в периплазме связывающих белков. Это водорастворимые белки, обладающие высоким сродством к некоторым аминокислотам, витаминам, пептидам, сахарам и органическим кислотам. Сами они не могут транспортировать субстраты через плазматическую мембрану, но способны стимулировать активность мембранных компонентов системы транспорта.

Известно, что движение веществ через мембрану не является однонаправленным. Микроорганизмы освобождаются от токсичных продуктов собственного метаболизма, выделяют избыточные питательные вещества, многие виды микроорганизмов продуцируют антибиотики и экзоферменты.

Определенные низкомолекулярные соединения могут выводиться наружу с помощью тех же механизмов пассивной и облегченной диффузии, когда концентрация их в клетке превышает концентрацию во внешней среде.

Изменение работы систем, обеспечивающих перенос веществ через мембраны, является важным методом повышения продуктивности промышленных штаммов микроорганизмов. С этой целью используют физиологические факторы и мутации, неспецифически повышающие проницаемость плазматических мембран, а также мутации, активирующие выделение метаболитов из клетки или нарушающих их реаккумуляцию.

Лекция 14.

ПОЛУЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ БИОТРАНСФОРМАЦИИ СТЕРОИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

План

1. .Возможности использования микроорганизмов в создании лекарственных средств в целом и стероидной структуры, в частности.
2. Краткая историческая справка по развитию трансформации стероидов.
3. Основные стероидные препараты:
 - 3.1. Структура стероидных препаратов.
 - 3.2. Сырье для получения стероидных гормонов.
 - 3.3. Пути биосинтеза стероидных гормонов в организме (холестерин).
 - 3.4. Основные микробиологические трансформации стероидов промышленного использования.
4. Пути дальнейшего развития микробиологической трансформации стероидов.

Применение микроорганизмов в области синтеза лекарственных средств можно разделить на два направления:

1. полный биосинтез микроорганизмами биологически активных веществ (антибиотиков, витаминов, ферментов, стероидов, аминокислот и других веществ)
2. микробиологические трансформации, состоящие в совместном использовании отдельных химических и микробиологических стадий в общем синтезе лекарственных средств.

Преимущества использования микроорганизмов в биосинтезе перед тонким органическим синтезом в создании лекарственных средств заключается в том, что:

- значительно упрощается синтез лекарственных средств в количественном выражении стадий такого синтеза
- появляется возможность осуществления тех реакций, которые достаточно трудны или вообще не осуществимы в химическом синтезе
- продукты биосинтеза получаются более чистые, без побочных примесей
- позволяют осуществлять рентабельный промышленный синтез лекарственных средств вообще и, в частности, стероидных гормонов

(пример промышленного синтеза гидрокортизона, преднизолонa, дексаметазона, осуществленного только после разработки микробиологических способов их получения).

Как известно, вышеперечисленные препараты широко применяются при лечении тяжелых ревматических заболеваний, бронхиальной астмы, различных воспалительных процессов и хронических кожных заболеваний.

Нужно отметить, что большинство процессов микробиологической трансформации приводит к незначительной перестройке молекулы субстрата. Эта трансформация может осуществляться одним или несколькими ферментами.

В настоящее время принята классификация микробиологических трансформаций по типу возникновения или отщепления функциональных групп.

К основным процессам микробиологической трансформации относятся: окисление, восстановление, гидролиз, дегидрирование, декарбоксилирование, дезаминирование, образование гликозидов, метилирование, ацетилирование и другие реакции.

Что касается истории развития микробиологической трансформации стероидов, то первые сообщения на эту тему появились раньше, чем было установлено строение основных представителей стероидов. Еще в конце девятнадцатого века (XIX) стало известно, что бактериальная флора кишечника млекопитающих превращает холестерин в капростерин, а холевую кислоту в дезоксихолевую.

В 1908 году была открыта способность кишечной палочки (*E.coli*) окислять гидроксильные группы стероидных соединений.

В 1948 году впервые осуществили введение гидроксильной группы в молекулу стероида микробиологическим путем.

В 1949 году было выявлено эффективное антиревматическое свойство кортизона и ученые синтезировали ацетат кортизона из дезоксихолевой кислоты с выходом продукта всего 15%.

Но только в 1952 году, после получения 11- α -гидроксипрогестерона (авторы Петерсон и Меррей) из прогестерона культурой *Rhizopus nigricans* уже с высоким выходом продукта, представилась возможность промышленного использования микроорганизмов в синтезе лекарственных средств стероидной структуры.

И, наконец, в 1955 году ученый Нобил сообщил о возможности микробиологического 1,2-дегидрирования, в результате чего из кортизона при

помощи *Corinebacterium simplex* был получен широко известный Вам преднизолон, который более активен и менее токсичен.

Вопрос о структуре основных стероидных препаратов. Все они характеризуются

наличием в молекуле специфического циклического скелета (ядра) – циклопентанпергидрофенантрена, построенного из четырех колец, три из которых шестичленные (А, В и С) и одно пятичленное (Д). Для обозначения различных положений этого кольца принята следующая нумерация (смотри рис.)

Производные этого циклического ядра называются стеринами или стеролами. К стеринам (стеролам) относятся стероиды, у которых в положении С-3 имеется гидроксильная группа.

Основные представители стероидных препаратов:

***кортикостероиды (гидрокортизон, преднизолон),
прогестогены (прогестерон, оксипрогестерон),
андрогены (тестостерон, метилтестостерон),
эстрогены (эстрон).***

Все они содержат при С-3 кетогруппу, кроме эстрогенов. Андрогены и эстрогены содержат при С-17 карбонильную или гидроксильную группу. Их аналоги при С-17 имеют алкильную или этинильную группы. Прогестогены и кортикостероиды принадлежат к замещенным прегнанам, то есть при С-17 содержат гидроксизамещенную ацетильную группу.

Отличие кортикостероидов в том, что они имеют кислородную группу при С-11.

Проблема сырья для получения стероидных препаратов (стероидных гормонов).

Одним из наиболее важных и изученных стероинов является ***холестерин*** (класс зоостеринов). Он обнаруживается почти во всех органах и тканях животных и человека, принимает участие в развитии растущего организма. Спинной мозг и мозг рогатого скота является наилучшим материалом для промышленного получения холестерина. Смотри формулу. Установлена в 1932 году.

Класс фитостеринов (стерины растений).

Эргостерин имеет отличие от холестерина в дополнительной метильной группе при С-24 и двух дополнительных двойных связях при С-7 и С-22,23. Эргостерин является провитамином витамина Д (строение его

установлено в 1934 г). Особенно много эргостерина у дрожжевых микроорганизмов, в пекарских дрожжах.

Стигмастерин содержится в соевом масле, в сахарном тростнике и отличается от холестерина наличием этильной группы при C-24.

β -ситостерин. Это наиболее экономичный вид стероидного сырья. Содержится во всех растениях и в отходах древесины. Коммерческий источник его – это тростник и хлопковое масло. **β -ситостерин** является аналогом стигмастерина, но в отличие от него не имеет двойной связи в боковой цепи (смотри формулу).

Диосгенин содержится в растении диоскорея – это импортное сырье, дорогое. **Соласодин** содержится в паслене дольчатом, который растет в Казахстане. Это сырье дорогое и не рентабельное для производства.

Для практического решения вопроса об использовании ситостерина в производстве стероидных гормонов необходимо осуществить направленное окисление боковой цепи стерина с образованием 17-кетоандростана (АД) с помощью мутантных штаммов *Mycobacterium vacca*. Но, возникает одна проблема. Так как стероиды трудно растворимы в воде, то и целевой продукт трансформации – АД практически на 99% выделяется в виде кристаллов. Поэтому культуральную жидкость необходимо отфильтровать и отделить биомассу с целевым продуктом –АД, затем добавит ацетон и еще раз отфильтровать, отделяя от биомассы 17-кетоандростан (АД) –целевой продукт. Затем ацетоновый раствор концентрируют и выделяют АД для последующей перекристаллизации. ***Полученный АД уже химическим способом превращают в лекарственные препараты - это тестостерон и его эфиры:***

метилтестостерон

оксипрогестерон

капронат

стеринолактон и другие.

Микробиологические трансформации стероидов промышленного применения (сводная таблица стр. 94).

Субстратами для проведения трансформаций могут служить и сами модифицированные стероиды. Например,

- ключевым веществом в синтезе гидрокортизона, кортизона и преднизолона служит «вещество S Рейхштейна» (4-прегнен-17- α ,21-диол-3,20-дион), которое короче принято называть «вещество S». Это вещество само должно быть модифицировано с помощью

биотрансформации из моноацетата «вещества R» (21-ацетат-5-прегнен-3-β, 17α, 21-триол-20-дион) с помощью культуры *Corynebacterium mediolanum*.

Процесс ферментативного превращения моноацетата «вещества R» в «вещество

S Рейхштейна» с помощью культуры *Corynebacterium mediolanum* состоит из следующих стадий:

- гидролиза 21-ацетогруппы
- окисления 3β-гидроксигруппы в 3-кетогруппу
- перемещения двойной связи от C₅ к C₄.

Трансформация заканчивается практически количественным выходом «вещества S Рейхштейна».

- При получении кортизона применяется давно и успешно с хорошим выходом продукта реакция биотрансформации – это 11α гидроксирование. В качестве микроорганизма трансформатора применяется гриб *Rhizopus nigricans*.

Получение 14 α-гидроксипрогестерона при помощи *Bacillus cereus* является примером гидроксирования при помощи бактерий.

15 α- гидроксирование осуществляется такими микроорганизмами как *Fusarium* и *Penicillium*.

Применяя дегидрогенизацию стероидов можно получить препарат преднизолон из кортизона и преднизолон из гидрокортизона с выходом до 86%, используя реакцию дегидрогенизации с помощью бактерий и актиномицетов, особенно часто используют такие микоформы как *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Nocardia*

- Окисление гидроксильной группы в кетогруппу – одна из наиболее часто применяемых реакций с использованием микроорганизмов таких как бактерии, актиномицеты, грибы.
- Использование гидролиза эфиров стероидов имеет практическое значение, так как ацилированные стероиды являются обычными промежуточными продуктами химического синтеза, в котором применяется ацильная защита функциональных групп. В этом случае также целесообразно использовать микробиологическое расщепление во избежание появления побочных продуктов химического синтеза. Например, так преобразуют ацетат кортизона в кортизон.
- Очень важен также и процесс отщепления боковых цепей стероидов в связи с поиском новых источников сырья для восполнения истощенных

запасов диоскореи. Сегодня потребность в стероидных препаратах продолжает расти.

Существующие трудности при использовании фитостероинов заключаются в необходимости селективного удаления насыщенной алифатической боковой цепи и сохранением ядра (скелета) молекулы, то есть стоит проблема отщепления боковой цепи, не затрагивая стероидного ядра. Эта проблема имеет свое решение:

1. это синтез модифицированных стероидов, ограничивающее действие микроорганизмов
2. это инкубация стероидов в присутствии соединений, ингибирующих действие ферментов гидролаз
3. это получение мутантных штаммов ограниченного действия на стероидное ядро.

Что касается методов и процессов микробиологической трансформации, то эта часть изложена более подробно в практикуме. (стр. 99).

Проблема растворимости стероидов. Решение задачи по повышению растворимости стероидов:

1. применение органических растворителей- ацетона, спирта, диметилформамида,
2. применение ультразвука, измельчение в пудру,
3. использование образования водорастворимых форм стероидов в виде натриевых и других солей,
4. заключение стероидов в растворимый комплекс с циклодекстрином – это природные циклические олигосахариды с гидрофильно, гидрофобными свойствами внешней и внутренней поверхности.

Пути интенсификации микробиологических трансформаций. Наиболее перспективным считают применение закрепленных (иммобилизованных) живых клеток микроорганизмов. Преимущества этого направления:

- не нужно выделять и очищать ферменты,
- более высокая активность работы клеток,
- стабильность работы клеток,
- не нужно выделять и очищать продукты реакции (они уже изолированы от биомассы),
- применение автоматизации процесса
- длительное функционирование клеток микроорганизма.

Наиболее мягкий способ иммобилизации – это метод включения клеток в альгинатный гель.

Стероиды были одними из первых субстратов, которые удалось трансформировать с помощью иммобилизованных клеток.

Лекция 15.

БИОТЕХНОЛОГИЯ В ПРОИЗВОДСТВЕ ВИТАМИНОВ

План лекции

1. Значение витаминов для человека
2. Источники витаминов
3. Водорастворимые витамины
 - 3.1.Рибофлавин (витамин В₂)
 - 3.2.Цианокоболамин (витамин В₁₂)
 - 3.3.Пантотеновая кислота (витамин В₃)
 - 3.4.Аскорбиновая кислота (витамин С)
4. Жирорастворимые витамины
 - 4.1.Эргостерин (витамин Д₂)
 - 4.2.β-каротин
5. Убихиноны
6. Перспективы развития биотехнологии в получении витаминных препаратов.

Витамины представляют группу незаменимых органических соединений различной химической природы. Они необходимы любому организму в небольших концентрациях с целью выполнения в нем каталитических и регуляторных функций. Они не являются материалом для биосинтетических процессов, они не являются источниками энергии.

Что касается источника витаминов – это в первую очередь растения. Витамины поступают в организм человека с пищевыми продуктами. Недостаток витаминов может привести к различным заболеваниям (это цинга, различные анемии и так далее).

Использование витаминов:

1. это лечебные препараты
2. это компоненты сбалансированного питания
3. это компоненты парфюмерной продукции
4. это биологически активные добавки
5. это компоненты для интенсификации биотехнологических процессов производства.

Известно, что высокой биологической активностью обладают, как правило, не сами витамины, а их производные – коферменты. Открыты также коферменты, для которых не обнаружено витаминных аналогов.

Коферментные формы на основе различных витаминов обладают широким спектром действия и эффективно используются в медицинской практике.

Большинство витаминов либо выделяют из природных источников, либо синтезируют химическим путем. Однако, с помощью биотехнологии сегодня производят особо сложные по строению витамины В₂, В₁₂, β-каротин (провитамин А), РР и предшественники витамина Д (эргостерина).

Кроме того, в синтезе витамина С (аскорбиновой кислоты) используют микроорганизмы как селективные окислители d-сорбита в L-сорбозу.

Получение витамина В₂ (рибофлавин). Вначале этот витамин выделяли из природного сырья (в максимальных концентрациях он присутствует в моркови и в печени). Затем был разработан как химический, так и микробиологический способы промышленного синтеза. Для рибофлавина характерно функционирование в коэнзимных формах:

- флавиномононуклеотид (ФМН)
- флавинадениндинуклеотид (ФАД).

К источникам рибофлавина относятся

- высшие растения
- дрожжи
- мицелиальные грибы.

Все они способны синтезировать рибофлавин.

Активным продуцентом рибофлавина являются культура дрожжеподобного гриба *Eremothecium ashbyii* и *Ashbya gossypii*.

Сверхсинтез рибофлавина можно получить, если действовать на дикие штаммы мутагенами, нарушающими механизм ретроингибирования синтеза витамина В₂, флавиновыми нуклеотидами, а также изменением состава культуральной среды.

В состав среды для роста продуцентов рибофлавина входят:

- соевая мука
- кукурузный экстракт
- сахароза
- карбонат кальция
- хлорид натрия
- витамины
- технический жир.

Перед подачей в ферментер среду стерилизуют с помощью антибиотиков и антисептиков во избежание ее инфицирования. По завершении процесса

ферментации культуральную жидкость концентрируют, высушивают и смешивают с наполнителями. В 1983 году в институте генетики был сконструирован рекомбинантный штамм продуцента *Bacillus subtilis*, способный синтезировать в три раза больше по сравнению с *Eremothecium ashbyii* и этот продуцент более устойчив к экзогенной кантамации.

Получение витамина В₁₂.

Этот витамин был открыт одновременно в США и в Англии. В 1972 г. в Гарвардском университете был осуществлен химический синтез витамина В₁₂, включающий 37 стадий его получения, что лишало возможности организовать промышленное производство этого витамина. С другой стороны это производство было необходимо, так как витамин В₁₂ очень важен в коррекции определенных нарушений в организме человека и животных. Он регулирует углеводный и липидный обмен, участвует в метаболизме незаменимых аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований, стимулирует образование гемоглобина, применяется для лечения злокачественной анемии, лучевой болезни, заболеваний печени и в других случаях.

Сначала витамин В₁₂ получали исключительно из природного сырья (1 тонна печени – 15 миллиграмм витамина).

Единственный способ его получения в настоящее время – это микробиологический синтез в промышленном масштабе. Интересно, что обнаружение витамин В₁₂ как побочного продукта при производстве антибиотиков стимулировало поиск продуцентов этого витамина. Продуцентом витамина В₁₂ являются пропионовокислые бактерии из рода *Propionibacterium*. Применение мутантов и добавление в среду предшественника витамина В₁₂ - 5,6 диметилбензимидазола (5,6 ДМБ) резко повышает продуктивность продуцента. Этому способствует также добавление в питательные среды кукурузного и мясного экстракта, соевой муки, рыбной муки. Выращивание пропионовых бактерий производится периодическим методом в анаэробных условиях на среде с кукурузным экстрактом, глюкозой, солями кобальта и сульфатом аммония. Образующиеся кислоты нейтрализуются щелочью. Через 72 часа после начала ферментации вносят предшественники - 5,6 ДМБ. Длительность ферментации – трое суток. Полученную массу сепарируют, стабилизируют нитритом натрия, охлаждают, нейтрализуют, коагулируют белки и фильтруют. Очищают на ионообменной смоле, кристаллизуют и проводят химическую очистку продукта. Далее следует получение различных лекарственных форм поливитаминных

препаратов. Для увеличения производства витамина В₁₂ перспективным является применение генной инженерии при получении гибридных штаммов и использовании методов иммобилизации на полимерах.

Витамин В₃ (пантотеновая кислота). Способ получения – тонкий органический синтез и микробиологический синтез с использованием иммобилизованных клеток бактерий, актиномицетов (основной метод).

Витамин РР. Используется биотехнологический метод, метод экстракции из микроорганизмов, обычно из пекарских дрожжей с добавлением предшественников. Используется штамм – *Brevibacterium ammoniagenes*.

Аскорбиновая кислота. Здесь применяется в основном химический синтез или же одна стадия осуществляется биотехнологическим способом с применением уксусно-кислых бактерий, проводящих реакцию трансформации d-сорбита в L-сорбозу. Для получения сорбозы культуру продуцента *Gluconobacter oxydans* выращивают в ферментерах периодического действия с мешалкой, барботером, усиленной аэрацией в течение 20-40 часов. Выход сорбозы достигает 98% от начального сорбита. Питательная среда: кукурузный дрожжевой экстракт до 20%. Сорбозу выделяют из культуральной жидкости. Развитие микробиологического метода получило развитие в производстве 2-кето L-гулоновой кислоты – это промежуточный продукт синтеза витамина С. Продуценты: *Acetobacter*, *Erwinia*, *Gluconobacter*. Перспективно создание генноинженерных штаммов продуцентов.

Жирорастворимые витамины.

Эргостерин (витамин Д₂)

Эргостерин – это основной компонент стерина дрожжеподобных грибов рода *Candida*, использующих углеводы. Есть несколько вариантов выращивания дрожжей – продуцентов эргостерина.

Продуценты – это дрожжи, плесени, особенно *Saccharomyces cerevisiae*.

Питательная среда должна содержать источники углерода, азота, фосфора.

Ферментация идет в аэробных условиях около 12-20 часов. Для получения кристаллического витамина Д₂, биомассу гидролизуют, охлаждают, фильтруют, делают спиртовые экстракты, которые омыляют (обрабатывают щелочью), кристаллизуют, очищают, растворяя в эфире, удаляют эфир, а затем эргостерин облучают ультрафиолетовыми лучами (УФ-облучение), так как витамин Д₂ из эргостерина образуется только после ультрафиолетового облучения (УФ-облучения).

Источником получения эргостерина может служить и мицелий грибов, который остается как отход (побочный продукт) антибиотической промышленности. Микроорганизмы *Cryptococcus curvatus* на средах с отходами молочной промышленности и при переработке хлопка синтезируют значительные количества эргостерина. Это все относится к вопросу рентабельности и экологичности биотехнологического производства.

β-каротин. Каротиноиды (политерпены) – это природный пигмент. Общий путь биосинтеза из изопреновых единиц. Источник – это высшие растения, водоросли, микроорганизмы. Получение - это тонкий органический синтез (химический способ) и биотехнология (использование мицелиальных грибов). Питательная среда – кукурузно-соевая среда. Процесс получения многостадийный. β-каротин экстрагируется подсолнечным маслом и используется в виде масляных. Если используют химический синтез, то более рентабельно после экстракции его кристаллизовать.

Витамин РР – в его производстве используется биотехнологический метод, применяя способ экстракции из микроорганизмов, обычно это пекарские дрожжи. В качестве штамма используется *Brevibacterium ammoniagenes*.

Убихиноны (коферменты Q) – 2,3 диметокси, 5-метилбензохинон.

Эти соединения синтезируются в организме животных и человека. Участие убихинона в метаболических процессах проявляет регуляторный эффект, он же принимает участие в тканевом дыхании, окислительном фосфорилировании, в переносе электронов.

Получение убихинонов – это биотехнология на основе каллусных культур риса или опухолевой ткани. Продуценты – бактерии, дрожжи и дрожжеподобные микроорганизмы. Сухая масса грибов рода *Candida* содержит смесь убихинонов. Это один из примеров, когда биотехнология совмещает в едином процессе получение убихинонов и эргостерина из микробных липидов. Применение убихинонов – при ишемической болезни сердца и при повышенных нагрузках.

Уксуснокислые бактерии, используемые при окислении сорбита в сорбозу (при получении витамина С) содержат убихинон-10) с десятью изопреновыми единицами в боковой цепи, который является коферментом организма человека.

Заключение.

1. Применение генной инженерии при синтезе витамина В₂ и витамина С – открыло новые возможности селекции высокоактивных продуцентов.
2. Внедрение непрерывного способа ферментации в производстве сорбозы увеличило скорости образования этого сахара почти в два раза.
3. Дробная подача компонентов в питательные среды обеспечило высокий уровень ферментации в производстве витамина В₁₂ и сорбозы.
4. Применение иммобилизованных клеток при получении витаминов В₁₂ и В₃ привело к разработке новых конструкций биореакторов.
5. Утилизация различных промышленных отходов существенно снижает себестоимость получаемой продукции – витаминов В₂, В₁₂ и β-каротина, улучшает экологию производства.

Таким образом, получение этих важных биологически активных веществ (БАВ) свидетельствует о существенном вкладе биотехнологии и в этом секторе фармацевтической промышленности.

Лекция 16.

ПОЛУЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ КУЛЬТУР КЛЕТОК РАСТЕНИЙ МЕТОДОМ БИОТЕХНОЛОГИИ

План лекции

1. Гармония отношений человека и растительного мира
2. Возможности развития использования биотехнологии в получении культуры клеток и тканей растений при получении лекарственных средств
 - 2.1. Краткая историческая справка по получению каллусной культуры
 - 2.2. Определение каллусной культуры (получение каллуса, особенности питательной среды, стадии получения биомассы, преимущества каллусных и суспензионных культур)
 - 2.3. Факторы увеличения накопления вторичных метаболитов (питательные среды, значение регуляторов роста растений – ауксины, цитокинины, влияние предшественников на рост клеток, оптимизация технологических параметров – температура, pH, перемешивание в суспензионных культурах)
 - 2.4. Технологический режим выращивания растительных клеток. Биореакторы.
 - 2.5. Методы иммобилизации в технологии выращивания растительных клеток (условия иммобилизации, способы иммобилизации, преимущества иммобилизации клеток, биотрансформация на примере *Digitalis lunata*)
 - 2.6. Биотрансформация как перспективное направление в получении лекарственных средств на основе культур клеток растений.

Нас окружает разноцветный, но не всегда, ароматный, но не везде и в тоже время всегда бесконечно разнообразный и удивительный в своих проявлениях и радостный, и печальный, постоянный и меняющийся мир, с поэтическим названием «флора». Этот мир одновременно и таит в себе, и предлагает нам свои щедрые дары для поддержания жизни, здоровья или в иное время просто настроения. Он успокаивает, лечит и дает силы каждый раз для нового дня. Такая связь предполагает и приглашает к доброму и бережному отношению к этому миру. Но с другой стороны мы хорошо знаем, что лекарственные растения играют значительную роль в фармацевтической промышленности и такие лекарственные препараты как настойки и экстракты составляют до 25% от общего объема востребованных лекарственных средств (см. табл. с.24, 25).

Известно около 20000 веществ, которые получают только из растений и в этом плане мир растений эксплуатируется человеком настолько давно и упорно, что воспроизводство этих растений создает проблемы, т.е. оно не успевает за темпами своего уничтожения в нарушение гармонии нашей связи.

Таким образом, мы не можем отказаться от эксплуатации растительного мира для получения необходимых лекарственных средств, бизнес и конкуренция на лекарственном рынке мира вообще и на российском, в частности, бизнес-есть бизнес, но делать это должны с разумной и максимальной бережностью, сохраняя наши природные богатства. И тут на помощь приходит биотехнология! Поэтому все большее внимание в мире привлекает технология выращивания культур клеток растений *in vitro* с целью получения природных веществ различного применения и спектра действия.

Первый вопрос. Так что же конкретно лежит в основе перспективного развития биотехнологического направления в получении веществ растительного происхождения, помимо решения экологических проблем. Ответ.

1. -это независимость от влияния климатических, сезонных и географических условий,
2. -это уменьшение (освобождение для других нужд) площадей почвы в хозяйственном обороте страны (мы уходим от истощения почвы также и дополнительных экономических затрат),
3. -это получение уже известных веществ, присущих интактному растению (например, никотин, кодеин, хинин, диосгенин и т.д.)
4. -это синтез новых продуктов, веществ,
5. -это использование культуры клеток для биотрансформации конечного продукта.

Второй вопрос по поводу рентабельности такого производства. В вашем пособии приведена табл.9 с подробной информацией о выпуске ЛС, изготовленных на основе биомасс культур клеток растений фармацевтическими предприятиями Японии, с.104. И далее в табл.10 представлены данные по выходу продуктов, используемых как биологически активные, из биомасс культур клеток растений, получаемых путем выращивания *in vitro*, в сравнении с традиционным способом производства ЛС, основанном на переработке плантационного сырья.

В нашей стране разработаны и внедрены в промышленное производство технологии получения БАВ из биомассы женьшеня и родиолы розовой. В Японии особенно широко выведен на поток процесс производства пигмента и антибиотического агента – шиконина с использованием культуры воробейника.

Промышленный способ выращивания изолированных культур дает возможность за короткий срок 30-45 суток получать значительный объем ценного лекарственного сырья.

Метод биотехнологии получения ЛС на основе культур клеток растений, начинается с процесса получения культуры каллусной ткани или каллуса.

Краткая историческая справка. Впервые каллусная культура была получена в 1902 году (начало прошлого века) Хаберландом. **Культура каллусной ткани состоит из сообщества клеток, выращиваемых на искусственной питательной среде.** Что касается использования таких культур, то надо отметить, что до середины 50-х годов прошлого века использовали их как модельную систему для исследования физиологических и биохимических процессов, работая с изолированными клетками и органами растений. А в 60-х годах было доказано, что культуры клеток растений могут быть продуцентами и синтезировать на искусственных питательных средах различные вещества, присущие интактному растению. В этой связи мы можем обратиться к такому понятию как **тотипотентность**.

Приведем определение тотипотентности. **Тотипотентность – это способность любой клетки образовывать полноценное растение, что предопределено его генетическим и физиологическим потенциалом (или естественными возможностями), необходимым для образования вторичных метаболитов.**

Третий вопрос. Нас интересует насколько такой процесс по выделению вторичных метаболитов является стабильным. Стабильность по выходу продукта вторичных метаболитов связывают с двумя параметрами:

1. с дифференцировкой клеток,
2. со стадией культивирования

Например, дифференцированные корневые каллусы *Atropa belladonna* синтезируют тропановые алкалоиды, а недифференцированные уже не способны к их синтезу. Но с другой стороны *Rauwolfia serpentina* способна синтезировать индолиловые алкалоиды недифференцированными клетками с достаточно большим выходом метаболитов. Отсюда можно сделать вывод, что морфологическая специализация клеток не является основной предпосылкой БАВ, т.е. здесь нет прямой связи.

Теперь остановимся на вопросе получения первичного каллуса.

Если еще раз обратиться к определению каллуса, то можно добавить к тому, что уже было сказано ранее. **Каллус (от латинского *callus*- толстая кожа, мозоль), представляет ткань, которая образуется в местах повреждения органов растения и обычно возникающая при неорганизованной**

пролиферации клеток растения. Используется для получения изолированных тканей и клеток растения.

Можно вспомнить, что клетка *in vitro* – это морфофизиологическая, дифференцированная структурная живая система, основными составляющими которой являются клеточные стенки, ядро, протопласт, система вакуолей.

Клетки отличаются по форме и размеру.

Основа клеточной стенки – полисахарид, целлюлоза, вакуоли с клеточным соком, из воды и растворенных в ней солей и органических веществ; протопласт состоит из белков и структурно включает протоплазму с органоидами и, наконец, ядро для осуществления всех основных функций клетки.

Ядро клетки состоит из перилолимфы, хроматина и одного или нескольких ядрышек.

Что касается основного способа деления клеток, то это **митоз**, который подразделяется на 4 фазы: профазы, метафазы, анафазы и телофазы.

-Профаза - строятся структурные элементы хромосом, оболочка ядра исчезает

-Метафаза – меняется положение хромосом, они располагаются в виде метафазной пластинки, из которой ведется подсчет и морфологическое описание хромосом

-Анафаза – расхождение хромосом к противоположным полюсам клетки и формирование двух полностью идентичных наборов хромосом

Телофаза – группа хромосом собранная на полюсах.

В процессе цитокинеза формируется клеточная оболочка, разделяющая материнскую клетку на 2 новые, идентичные одна другой клетки.

Что касается источников получения каллусов - изолированные культуры каллусов получают из различных органов растений (корни, побеги, листья) или из определенного типа клеток (эндосперма, пыльца).

Технология получения каллуса- Выбранный эксплантат, представляющий вырезанные маленькие кусочки (2-4 мм) растительной ткани, которые находятся в подходящем биологическом состоянии (они молоды, здоровы), что необходимо для получения каллусных культур. Этот растительный материал тщательно моют, стерилизуют гипохлоридом натрия, 96% спиртом или 0,1% сулемы, затем тщательно промывают дистиллированной водой и помещают на синтетическую агаризованную питательную среду. Сосуды закрывают ватно-марлевыми тампонами. Конечно, при этом необходимо соблюдать строгие правила антисептики (работают только в боксах). Для образования каллуса и роста ткани сосуды переносят в темное помещение, где строго поддерживают

определенный режим. Это касается температуры и влажности. Известно, что для большинства культур эти параметры таковы: температура $+24-26^{\circ}$, а влажность 65-70%. Через 2-3 недели на раневой поверхности образуется первичный каллус.

Весьма существенным в вопросе обеспечения роста и синтеза продуктов вторичного метаболизма является подбор ингредиентов среды культивирования, что определяется конечной целью биотехнолога. Это:

1. формирование биомассы
2. синтез вторичных продуктов.

Остановимся на стадиях получения биомассы, обозначим эти стадии как технологию получения биомассы:

1. Приготовление оборудования
2. Приготовление питательной среды
3. Стерилизация питательной среды
4. Посев ткани на питательную среду
5. Выращивание биомассы
6. Съем сырой биомассы и высушивание.

Что касается особенностей 2-ой стадии, то компоненты среды можно разделить на 6 групп, что будет отражать и ее приготовление:

1. макроэлементы
2. микроэлементы
3. источники железа
4. органические добавки – витамины
5. источники углерода
6. органические добавки – регуляторы роста растений –ауксины и цитокинины (играют роль пусковых механизмов).

Культивирование ведется на жидких и твердых питательных средах.

Теперь рассмотрим факторы, от которых зависит накопление вторичных метаболитов в процессе культивирования растительных клеток.

Первый фактор.

1. Регуляторы роста растений как мы уже говорили, являются пусковыми механизмами первичного и вторичного метаболизма, влияя таким образом на потенциал продуктивности культур клеток. В качестве регуляторов роста и синтеза продуктов вторичного метаболизма выступают
 - ауксины (индолитриуксусная кислота (ИУК), нафтилуксусная кислота (НУК) и 2,4 дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4Д) и

- цитокинины -6-бензиламинопурин (БАП), N-изоптен и 6-фурфуроиламинопурин (кинетин)

Что касается цитокининов, то они по разному влияют на накопление вторичных метаболитов- одни не реагируют на внесение в среду кинетика, а другие культуры клеток при этом начинают образовывать например, алкалоиды (на примере культуры клеток в первом случае *Datura tatula* и во втором случае, *Scopolia maxima*) Таким образом, существование цитокининзависимых и цитокининнезависимых клеток, если связывать это с природой самого растения, зависит от изменений в фенотипе (внешних), а не в генотипе (внутренних) культуры клеток.

Второй фактор.

Для синтеза вторичных метаболитов весьма существенным является внесение в питательную среду известных предшественников, стимулирующих определенные ферментативные пути метаболизма. Например, внесение всем известного фенилаланина в среду для культивирования клеток увеличивает выход диосгенина на 100%

Третий фактор.

Накопление вторичных метаболитов также зависит от температуры, pH, а при суспензионном культивировании от аэрации, перемешивания, скорости вращения сосудов, от газового состава и т.д.

Таким образом, если мы хотим иметь гарантию возможности получения любого продукта с фармакологической активностью, мы должны иметь в виду наиболее благоприятные условия на стадии роста и синтеза вторичных метаболитов для каждой культуры клеток растений (т.е. знать ее характер, капризы, требования, наконец саму природу на уровне фенотипа и генотипа).

Итак мы уверены, что промышленное производство может эффективно работать, реализуя возможность накопления промышленного сырья путем выращивания клеток и тканей растений, используя каллусные и суспензионные культуры (помня, что суспензионные культуры получают из каллусных).

Теперь перечислим преимущества каллусных культур в технологии получения растительного сырья. Прежде всего - это:

- - надежность и стабильность по выходу биомассы и продуктов вторичного метаболизма
- - возможность использования каллусной системы для иммобилизации и последующей биотрансформации

Недостаток: в необходимости применения ручного труда

В литературе приводятся интересные данные по технологии получения субстанции женьшеня, радиолы розовой и унгерии на основе каллусных культур. Кстати, известно, что препараты женьшеня широко применяются в косметической, пищевой, медицинской промышленности.

Если сравнивать преимущества каллусных культур и суспензионных между собой, то оказывается, что выход продуктов вторичного метаболизма выше именно в каллусных культурах, но управление процессом культивирования легче осуществлять при работе в суспензионных культурах.

При производстве настоек женьшеня, плантационное выращивание этой культуры в количественном отношении по выходу панаксозидов имеет преимущество перед каллусным сырьем, но по токсичности, препараты, получаемые из каллусного сырья менее опасны.

Четвертый фактор.

Рентабельность производства на примере женьшеня стала преобладать в технологии получения «бородатых корней», где по условиям роста и скопления клеток возникают субпопуляции с повышенной дифференцировкой – это самые продуктивные клетки по биоактивным веществам.

Перспективность новых технологий получения биомасс лекарственных растений, содержащих то или иное активное начало в виде каллусных и суспензионных культур заложена в их неоспоримых преимуществах, таких как:

1. стандартность накапливаемого сырья
2. хороший выход активного начала (см.табл.5)
3. сокращение сроков культивирования для накопления растительной биомассы (вместо месяцев и недель счет идет на дни и часы) Краткий комментарий с учетом кривой роста микроорганизмов в периодическом режиме, представленной в предыдущих лекциях. В начале логарифмической фазы (лог.фазы) клетки малы и обладают плотной цитоплазмой, но в стационарной фазе вакуолизируются и сильно увеличиваются в размерах. Деление клеток идет путем митоза, время удвоения их биомассы варьирует от 25 до 100 часов. Очень важно, что из-за низкой интенсивности дыхания клеток потребность их в кислороде снижена и нет проблем в обеспечении культуры системами интенсивной аэрации.
4. возможность промышленного производства биомасс экзотических растений, малодоступных для нашей страны, например, таких как раувольфия, диоскорея, унгерия и др.

5. использование разных технологических режимов, но предпочтительнее растительные клетки выращивать в периодическом режиме, хотя можно использовать и полунепрерывное и непрерывное культивирование, если нарастание биомассы коррелирует с синтезом вторичных метаболитов.
6. использование методов иммобилизации и биотрансформации для повышения выхода продуктов вторичного метаболизма применительно к растительным клеткам. Здесь логично представить некоторый комментарий по влиянию на синтез и накопление вторичных метаболитов и уровнем их агрегатного состояния, т.е. чем ближе клетки к целому растению тем выше у них должны быть метаболические потенциалы.

Однако здесь необходимо различать механизмы накопления вторичных метаболитов. Они разные.

Если имеется прямая связь — один механизм накопления, когда определяющим в росте клетки является действительно уровень агрегации, когда достаточная ее степень может быть достигнута в медленно растущих культурах.

В случае обратной связи включается другой механизм накопления вторичных метаболитов и в этом случае уже определяющим фактором является не агрегация, а кинетика скорости роста, когда первичные и вторичные пути метаболизма по разному конкурируют за предшественник в быстро и медленно растущих организмах.

Вывод. Иммобилизованные клетки с низкой скоростью роста, способны к интенсивной выработке метаболитов.

Одним из основных условий иммобилизации является:

- выделение метаболита в питательную среду
- свободное извлечение метаболита из питательной среды. (например, к таким клеткам относятся клетки, продуцирующие алкалоиды)

Способы иммобилизации

- клетки встраивают в альгинат кальция
- клетки встраивают в агарозные шарики
- клетки встраивают в трехмерные сетчатые структуры из нейлона, порошкового металла, полиуретана. (в частности такие системы используются для *Digitalis lanata* и др. стр.110).

Каковы преимущества иммобилизованных клеток по сравнению с суспензионными культурами? Это:

- многократное использование
- четкое отделение биомассы от продуктов метаболизма

- увеличение продолжительности культивирования на стадии продуцирования
- получение большого количества вторичных метаболитов.

Биотрансформация – это метод, использующий ферменты, локализованные в клетке растения и способные менять функциональные группы добавленных из вне химических соединений. Метод используется для повышения биологической активности конкретной химической структуры и проведения серий специфических химических реакций за счет включения одного или нескольких последовательно связанных ферментов. В качестве примера можно привести превращение дигитоксина в дигогсин клетками *Digitalis lanata*.

Недеференцированные культуры клеток *Digitalis lanata* сами не образуют сердечных гликозидов, но могут осуществлять реакции биотрансформации субстратов, добавленных в питательную среду.

Биотрансформация дигитоксина в дигогсин идет за счет реакции 12-гидроксилирования, катализируемой ферментом, находящимся в клетках *Digitalis lanata*.

Итак, для дальнейшего развития этого направления получения лекарственных средств на основе клеток растений с использованием биотрансформации необходимо следующее:

1. селекция специализированных линий клеток
2. оптимизация условий культивирования
3. сокращения времени ферментации
4. увеличение срока работы клеток.

Лекция 17.

ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ЖИВЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ-СИМБИОНТОВ (НОРМОФЛОРЫ И ПРОБИОТИКИ)

План лекции

1. Микроэкология человека. Экологические ниши
2. Причины дисбактериозов в современном мире
3. Симбиоз человека и микрофлоры и его классификация
4. Нормальная (резидентская) микрофлора желудочно-кишечного тракта и ее значение для здоровья человека (противопатогенная функция, влияние на усвоение лактозы, влияние на холестерин, антитоксическое действие, влияние на иммунитет)
5. Гнотобиология. Гнотобионты.
6. Технология культивирования клеток микроорганизмов при получении препаратов нормофлор. Применение нормофлор.
7. Методы микробиологического и биохимического контроля в производстве препаратов пробиотиков (практическая часть)

Наше время характеризуется тем, что наряду с достижениями цивилизации, в частности, с развитием и активным применением природных и полусинтетических антибиотиков, с использованием ядохимикатов в сельском хозяйстве для повышения его рентабельности и других продуктов химического синтеза, имеет место значительное расширение распространения таких негативных явлений как дисбактериозы. Эта неблагоприятная ситуация в нашей жизни связана с подавлением молочнокислых бактерий, обитающих в желудочно-кишечном тракте человека, что в свою очередь создает условия для усиленного размножения условно патогенных и гнилостных микроорганизмов. Одновременно оказывает влияние на возникновение дисбактериоза изменение характера нашего питания, экологические факторы внешней среды, различные стрессовые ситуации.

Мы знаем, что сожительство двух различных организмов называется симбиозом, в рассматриваемом случае этот симбиоз имеет 4 варианта развития в зависимости от их взаимоотношений – это:

- мутуализм (симбиоз взаимовыгодный)
- паразитизм (симбиоз не взаимовыгодный, т.е. один живет за счет другого)
- нейтрализм (симбиоз без влияния друг на друга)
- комменсализм (симбиоз с выгодой для одного без вреда для другого).

Микрофлору можно различать еще и как пристеночную и полостную.

Нормальная или резидентская микрофлора желудочно-кишечного тракта представлена следующими видами ее:

- бифидобактерии (наиболее распространены, особенно преобладают у младенцев)
- лактобациллы и энтерококки
- грамотрицательные бактерии (рода *Bacteroides*)
- грамположительные бактерии (рода *Clostridium*)
- энтеробактерии (*E.coli*)
- стафилококки
- пентострептококки
- дифтероиды.
- дрожжеподобные грибы (рода *Candida*) в небольших количествах, плесневые грибки)

Чем полезна нормальная микрофлора для человека? Ее необходимость обусловлена тем, что:

1. она обеспечивает синтез витаминов, аминокислот, органических кислот и других биологически активных соединений,
2. она увеличивает неспецифическую резистентность организма хозяина к инфекционным заболеваниям, препятствуя развитию патогенных микроорганизмов (явление колонизационной резистентности)

В резидентской микрофлоре доминируют молочно-кислые бактерии. Они подавляют развитие патогенных и гнилостных микроорганизмов (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Proteus*) за счет колонизации (адгезии) эпителия кишечника. Механизм этого подавления до конца не ясен, однако известно, что противопатогенные свойства молочно-кислых бактерий определяются:

- образованием молочной кислоты и понижением pH
- образованием пероксида водорода (перекиси водорода) (бактерицидное действие)
- образованием антибиотических веществ (ацидофилин, ацидолин, низин и др.)
- образованием биопленки на эпителии кишечника (адгезия)
- антиэнтеротоксической активностью против *E.coli*.
- изменением окислительно-восстановительного потенциала, как неблагоприятной среды для аэробных микроорганизмов.

Кроме того, молочнокислые бактерии способны расщеплять лактозу и метаболизировать холестерин (против атеросклероза). Они же обнаруживают и

противоопухолевую активность, обезвреживая канцерогены, когда он тем или иным способом попадают в организм, или какие либо токсические вещества, выделяемые внутри организма. Например, лактобациллы потребляют нитриты продуктов, предотвращая тем самым образование канцерогенных нитрозаминов в организме человека. Они угнетают клостридии, пептострептококки и стафилококки, снижая выработку этими организмами ферментов (азотредуктазы, нитроредуктазы и других), вызывающих образование канцерогенов. Наконец, молочнокислые бактерии и компоненты их клеточных стенок прямо подавляют опухолевые клетки, а также стимулируют иммунные реакции организма. Такие результаты наблюдений, конечно, требуют дальнейших исследований. Поэтому в последние годы получила развитие **гнотобиология** – как раздел экспериментальной биологии, занимающийся выращиванием стерильных животных (**гнотобионтов**), а также животных, микрофлора которых представлена одним или несколькими видами микроорганизмов.

Особое значение имеют данные по иммунобиологии, полученные на гнотобиотических животных, то есть микроорганизмы эти носят защитный характер от множества инфекций (усиливают иммунитет).

Таким образом, становится актуальной задача внедренных в практику препаратов на основе живых культур симбионов.

Важнейшим компонентом этих препаратов являются молочнокислые бактерии:

- лактобациллы
- энтерококки
- бифидумбактерии.

Следует отметить, что получение препаратов требует совершенствования технологии культивирования микроорганизмов.

Технология культивирования.

Выделяются штаммы из здорового организма человека, проводят идентификацию до вида. Проверяют безвредность штамма для клеток кишечника. Отбирают штаммы антагонистически активные. Культивируют на искусственных питательных средах. Штаммы должны выдерживать замораживание и высушивание. Лиофильный штамм поступает в лабораторию, на производство, где его проверяют на соответствие паспорту. Затем культивируют, высевая на питательную среду (это может быть молоко, агар и другие). Защищают клетки от замораживания с помощью криопротекторов.

Сегодня наиболее широко известны следующие продукты нормофлоров:

- колибактерин
- бифидумбактерин
- лактобактерин
- бификол (смесь коли и бифидумбактерина)
- примадофиллюс бифиллюс
- ацилакт
- бифидорм
- энтерол

Гастрофарм – не пробиотик

Бактисубтил – не продуцент гидролитических ферментов плюс (+)

Антибиотические вещества типа полимиксина (грамотрицательный)

Применение нормофлоров в педиатрии при острых кишечных инфекциях, длительных кишечных дисфункциях.

Показания: - недоношенным детям в случаях, когда у матерей был токсикоз
- при нарушениях кормления грудью (мастит, трещины сосков и т.д.)

- детям с – анемией
 - рахитом
 - диарезом
 - на искусственном вскармливании
- детям старшего возраста
 - при колитах
 - энтероколитах, с дефицитом бифидофлоры
 - при дисбактериозе кишечника.

Методы микробиологического и биохимического контроля в производстве препаратов пробиотиков.

1. Приготовление сред для учета молочнокислых бактерий, бифидумбактерий и энтерококков
2. Микроскопическое исследование с применением окрашивания метиленовой синью под микроскопом при иммерсионном увеличении:
-лактобациллы выглядят как хорошо окрашенные крупные палочки, соединенные в цепочки,

-культура энтерококка представлена кокками, расположенными попарно или в виде цепочек, хорошо окрашенных метиленовой синью,

-культура бифидобактерий представлена либо в виде ветвящихся клеток, либо в виде булабовидных и веретенообразных форм.

3. Определение концентрации жизнеспособных клеток. На плотных питательных средах учета молочнокислые бактерии, вырастая, образуют следующие типы колоний:

-лактобациллы – в виде комочков ваты, гладкие формы образуются редко

-энтерококки образуют круглые поверхностные или лодочковидные колонии в толще агара,

-бифидобактерии образуют гладкие колонии или колони в виде чечевичек в толще агара.

4. Определение активной и титруемой кислотности (потенциометрически).

В конце ферментации рН культуральной жидкости варьирует от 3,9 до 4,5 в зависимости от вида молочнокислых бактерий. Титуемая кислотность определяется путем титрования 10 мл культуральной жидкости, разбавленной 1:1 дистиллированной водой, в присутствии 2-3 капель раствора фенолфталеина 0,1 Н раствором щелочи NaOH. Обычно она составляет в градусах специальной шкалы по Тернеру для суточных культур:

-ацидофильные палочки – 180-200

-бифидобактерии - 140

-энтерококки -100

Лекция 18.

ГЕНОМИКА И ПРОТЕОМИКА. ИХ ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.

Успехи генетики, молекулярной биологии и биохимии привели к формированию в девяностых годах прошлого века двух новых фундаментальных дисциплин - геномики и протеомики. Бурное развитие этих дисциплин обеспечивает в наше время прогресс в ряде разделов биотехнологии, в том числе фармацевтической.

Название геномика происходит от слова геном, то есть совокупности всех генов организма. Слово протеомика является производным от протеома - под последним подразумевается совокупность всех - структурных и каталитических белков в клетке эукариота или прокариота. Обе дисциплины можно считать как бы терминологическим оформлением современного этапа развития, соответственно, генетики и белковой химии, приближающим их к целостной клетке. И по времени возникновения и в методологическом аспекте главенствующее значение здесь занимает геномика. Неоднократно декларировалось, что протеомика базируется на геномике, являясь следующим, после нее этапом познания живого уже на белковом уровне.

Как уже упоминалось в предыдущих лекциях генетика начала XIX века получила позднее название формальной, поскольку исследования велись на уровне ген-признак (открытие знаменитых основополагающих законов Менделя). Существование гена было постулировано, но материальная его природа оставалась неизвестной. В пятидесятые годы XX века после появления и быстрого подтверждения справедливости концепции Уитсона и Крика о двойной спирали ДНК и о гене как участке ДНК, началось бурное развитие молекулярной генетики: были установлены размеры отдельных генов, функционально различные участки в гене и т.д. Параллельно биохимиками с участием генетиков было осуществлено установление матричного механизма белкового синтеза с передачей генетического кода от ДНК к белку.

Геномика ставит своей задачей полную генетическую характеристику именно всей клетки: установление количества содержащихся в ней генов и их последовательности, установление количества нуклеотидов в каждом гене, и что надо подчеркнуть, их последовательности, установление функций каждого гена применительно к метаболизму организма или, говоря более общими словами, применительно к его жизнедеятельности.

Иными словами геномика позволяет выразить сущность организма - его видовые (и даже индивидуальные) отличия от других организмов, его потенциальные возможности, предвидеть его реакцию на внешние воздействия, зная последовательность нуклеотидов в каждом из его генов и зная число генов.

Минимальные геномы у некоторых видов микроорганизмов состоят из нескольких сотен генов. Геном человека приближается к ста тысячам генов. Размеры отдельных генов варьируют - примерно от одной тысячи пар нуклеотидов и выше.

Таким образом, количество пар нуклеотидов, составляющих индивидуальный геном измеряется как минимум сотнями тысяч, обычно же многими миллионами пар нуклеотидов.

Отсюда следует, что для полного знания генома организма надо определить последовательность (sequence) миллионов пар (А-Т, Г-Ц) нуклеотидов. Провести "секвенирование", согласно вошедшему в употребление выражению, целого генома можно только при автоматизации соответствующего оборудования. Хранить же полученные данные и пользоваться ими невозможно без компьютерной техники. Более того, для этого служат специальные базы (банки) данных. Некоторые из них имеют статус международных. Широкую известность имеют базы данных института геномных исследований (США), Гейдельбергского Университета (Германия). Общаясь с такими базами, исследователи, секвенирующие конкретный геном конкретного организма, могут сопоставить свои данные с тем, что уже известно, сделать объективные выводы в отношении своей работы, пополнить базы данных новыми сведениями и т.п.

Геномика таким образом, теснейшим образом связана с биоинформатикой, которая базируется на базах данных и компьютерной технике.

Секвенирование сотен миллионов пар нуклеотидов при всей его автоматизации требует необычно большого количества исполнителей отдельных исследований. Хотя, работа их ни в коем случае не является механической, но все же имеет тенденцию к монотонности. Это привело к дискуссиям о наступившем периоде "индустриализации науки" и потере творческой самостоятельности ученых.

Необходимо иметь в виду, что разнообразие геномов (по последовательности нуклеотидов) не исчерпывается признаками принадлежности организма к определенному биологическому виду. Например, у микроорганизмов в геноме зафиксированы различия между отдельными штаммами одного и того же вида, используемыми как продуценты в

биотехнологической промышленности. Такие различия обнаруживаются по разной последовательности нуклеотидов в аналогичных по функциям генах.

Внутривидовые различия в геномах могут обнаруживаться по всей лестнице живых существ, включая человека (в последнем случае индивидуальные различия выявляемые при анализе ДНК составляют, в частности, новый эффективный прием судебной экспертизы).

Таким образом, багаж сведений скапливающихся на базах данных, фактически не может иметь верхней границы.

В настоящее время в качестве ежесуточного итога работы многих десятков лабораторий в разных странах мира секвенируется приблизительно один миллион пар нуклеотидов.

Как все, недавно возникшие научные дисциплины, геномика дифференцируется по нескольким направлениям (специализируются, соответственно, и базы данных). Прежде всего, здесь должна быть упомянута структурная геномика. Ее задача - идентификация генов с помощью специальных компьютерных программ. Ведется поиск открытых рамок считывания со старт-кодонами и терминирующими кодонами, то есть идентифицируются структурные гены. В результате, изучаемый геном характеризуется по молекулярной массе, количеству генов, нуклеотидной последовательности в каждом гене. У прокариот - в геноме-хромосоме, у эукариот - в каждой из хромосом.

Далее, следует назвать сравнительную геномику и соответствующие базы данных. Сравнительная геномика позволяет относительно быстро, связавшись с базой данных и получив ответ на свой запрос, установить, является ли изученный (по последовательности нуклеотидов) ген уникальным, или он уже был идентифицирован в другой лаборатории и сведения о нем поступили на базу данных. Сравнительная геномика позволяет получить сведения о степени гомологии родственных генов (степени гомологии по последовательности нуклеотидов в открытой рамке считывания). Сравнительная геномика дает возможность при систематической работе в этом направлении получить ответ на вопрос об эволюционной близости одного организма другому и на ряд подобных вопросов, относящихся к фундаментальной биологии. В тоже время здесь заложены возможности ответа и на вопросы практического характера. Так, например, если ведется поиск ингибиторов данного гена (вернее кодируемого им белкового продукта) у патогенного микроорганизма с целью создания на их основе лекарственных средств, важно знать есть ли ген с такой или близкой последовательностью нуклеотидов в организме хозяина. Это позволяет строить

предположения о степени безопасности создаваемых лекарств. Количество примеров, демонстрирующих практическую значимость сравнительной геномики, может быть очень большим.

После структурной и сравнительной геномики должна быть названа функциональная или метаболическая геномика, как сформировавшаяся научная дисциплина. Ее целью является установление связи между геномом и метаболизмом, кластерами генов и многоступенчатыми метаболическими процессами, отдельными генами и конкретными метаболическими реакциями (здесь также есть специализированные базы данных). Применительно к функциональной геномике надо отнести понятие так называемых "модельных" организмов - прежде всего это некоторые микроорганизмы, т.е. прокариоты и низшие эукариоты с полностью секвенированным геномом и досконально изученным метаболизмом, то есть микроорганизмы, у которых прослежены связи между генами и кодируемыми этими генами белками - ферментными и структурными. Примерами таких модельных микроорганизмов могут служить *Escherichia coli* (прокариот) и *Saccharomyces cerevisiae* (так называемые пекарные дрожжи, у эукариот). Сопоставление гена у изучаемого организма с близким по степени гомологии геном у модельного организма позволяет делать заключение или, по крайней мере, строить предположения о функции гена-объекта исследования. Отсутствие гомологии указывает на необходимость специального изучения функций нового гена. Разумеется, это лишь схема хода рассуждений. Число модельных организмов с полностью секвенированным геномом и соотношением функций генов к фенотипу постоянно растет.

Особое значение применительно к фармации, функциональная геномика имеет при установлении так называемой существенности отдельных генов. Под существенностью подразумевается необходимость гена (кодируемого им продукта) для жизнедеятельности клетки. Так при создании антимикробных лекарственных препаратов именно существенные гены (кодируемые этими генами продукты) должны быть мишенями для практически ценных антимикробных веществ. Следует сразу же заметить, что иногда ген приобретает значение существенности только в особых условиях, в которых может оказаться патогенный микроорганизм, однако, это особые случаи.

ПРОТЕОМИКА.

Название протеомики как научной дисциплины происходит от слова протеон. По аналогии с геномом протеон означает совокупность всех белков

клетки. Возможность оперировать таким понятием и сама его целесообразность появилась в результате успехов генетики и белковой химии.

Если геномика имеет целью получить информацию о всех потенциальных свойствах клетки, которые не реализуются на данный момент, например, молчащие гены, то протеомика дает возможность охарактеризовать клетку именно в данный конкретный момент, зафиксировав все находящиеся в ней белки. Это, своего рода, моментальная фотография функционального состояния клетки на уровне ее протеона, то есть совокупности всех ферментных и структурных белков, которые работают, в отличие от неэкспрессирующихся генов.

При этом, если геномика появилась прежде всего в результате развития техники секвенирования, то для протеомики такую же основополагающую роль играет техника двухмерного электрофореза - разделение белков в одном направлении по молекулярной массе, а в другом по изоэлектрической точке. Сам по себе этот метод не является новым, однако, в настоящее время он в значительной мере усовершенствован, что позволяет следить в динамике за сотнями белков одновременно.

Образно говоря, это как бы киносъемка клетки на молекулярном (белковом) уровне. Кадры своеобразной киноленты последовательно фиксируют нарастание и падение количества индивидуальных белков клетки во времени, например, при ее переходе из одной фазы клеточного цикла в другую; при реакции клетки на изменения внешней среды; отражают посттрансляционные превращения белков и т.п.

Протеомика позволяет следить за белковыми взаимодействиями. Это относится, например, к передаче сигналов от поверхности клетки к факторам избирательной транскрипции в ядре. С ее помощью может быть преобразована, таким образом, не только технология скрининга иммуносупрессоров но и ингибиторов сигнальной трансдукции в целом.

Методы протеомики позволяют получить более полную, всестороннюю, картину взаимодействия с клеткой новых потенциальных антимикробных агентов. Работы по изучению динамики биосинтеза ферментов вторичного метаболизма у микроорганизмов при использовании протеомики могут быть переведены на новый, более высокий уровень. Это непосредственно связано с совершенствованием продукции многочисленных классов лекарственных веществ.

Возвращаясь к связи между протеомикой и геномикой следует подчеркнуть, что протеомика может быть названа продолжением именно

функциональной геномики. В отличие от геномики, предметом изучения протеомики являются продукты, кодируемые генами, экспрессирующимися в данный момент.

ГЕНОМИКА И АНТИМИКРОБНЫЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ.

Исходя из размеров генома и количества генов понятно, что задача полного секвенирования генома решается быстрее в случае микроорганизмов в отличие от высших эукариот. К настоящему времени полностью секвенирован геном нескольких десятков видов бактерий, в том числе патогенных. У разных видов бактерий размер варьирует, но в целом он близок к нескольким тысячам генов и нескольким миллионам пар оснований, соответственно, например, у *Escherichia coli* - четыре с небольшим тысячи генов и четыре с небольшим миллиона пар оснований.

Большинство генов могут рассматриваться как существенные (то есть, как жизненноважные для бактерий*) и, следовательно, как мишени для антибактериальных веществ.

В клинике в настоящее время используется порядка ста природных и синтетических антибактериальных веществ. Каждое из них имеет свою мишень. Как правило, это или фермент, или рибосомный белок. Всего реализованных мишеней также около ста. Следовательно, подавляющее количество генов в качестве мишеней для антибактериальных агентов все еще не используются.

Для доказательства «существенности» генов применяется метод избирательного выбивания гена из генома (knockout) с проверкой выживания организма после такой процедуры.

В настоящее время представляет интерес вышеуказанная новая технология скрининга антибактериальных (или шире - антимикробных) агентов. Традиционно их первичный отбор производился, начиная с испытания действия на рост тест-культуры микроорганизма.

Высокоактивные, подавляющие рост вещества (природные или синтетические), отобранные на этом этапе, проходят дальнейшие испытания, в частности, определяется антимикробный спектр их действия, их активность в

* Геномика позволяет установить минимальный «СЭТ» генов, достаточный, чтобы обеспечить существование отдельного организма. Так, сопоставляя гены микроорганизмов с маленьким геномом (0,5-0,8 мегабаз) были выявлены 256 общих для них генов, так называемых «существенных». Из них 95 генов были включены в трансляцию, 18 - в репликацию, 9 - в транскрипцию, 23 - в метаболизм нуклеотидов. Далее, были выявлены общие для небольшого генома гены, кодирующие белки группы шаперонов; а также гены, кодирующие белки энергетического и липидного метаболизма.

опытах *in vivo* на лабораторных животных, токсичность как для макроорганизма в целом, так и для отдельных его органов и тканей.

При благоприятных результатах, когда по завершении предклинических испытаний ставится вопрос о передаче препарата в клинику, обычно начинается углубленное изучение механизма его действия на субклеточном и молекулярном уровне, то есть ведется поиск его внутриклеточной мишени или, по недавно укоренившейся терминологии "таргета" (target-мишень), - макромолекулы или макромолекулярного комплекса. Затем выявляется ген, кодирующий образование этой макромолекулы или гены, которые кодируют образование макромолекул, входящих в макромолекулярный комплекс.

Новая же технология скрининга, создается на основе знания полностью секвенированного генома патогенна и «существенных» генов в геноме. В лабораториях, работающих в области создания новых антимикробных лекарств, предварительно выбирается ген, который будет использован для их испытания как таргет (точнее как таргет, будет использован продукт этого гена).

Международные базы данных позволяют получить сведения о гене и его распространенности среди патогенов; о продукте, кодируемом этим геном; и об участии этого продукта (как правило, фермента) в том или ином метаболическом цикле; о катализировании им конкретной реакции в цикле. Иными словами, исходным тест-объектом для отбора антимикробных веществ, избирательных ингибиторов метаболизма, является не микробная культура, а ген, или точнее, кодируемый им продукт.

Таргетный скрининг позволяет в соответствии с выбором гена вести отбор биологически активных веществ, в частности, антимикробных препаратов с запланированным иным механизмом действия в отличие от традиционного метода (поиск, ведущийся методом от клетки к гену).

Первый этап таргетного скрининга начинается с выделения этого гена (соответствующего фрагмента ДНК) из генома. Далее, используя полимеразную цепную реакцию (ПЦР), фрагмент ДНК амплифицируется. Количество копий гена умножается. Конструируются:

- 1) бесклеточная система, где наработанная матрица служит для получения информационной РНК, специфичной для гена;
- 2) бесклеточная рибосомная система, где эта информационная РНК служит для наработки белкового продукт, кодируемого данным геном.

Следует отметить, что методика ПЦР, а также методы получения бесклеточных систем транскрипции и трансляции в настоящее время достаточно хорошо отработаны и в значительной мере автоматизированы.

Бесклеточная система, непосредственно используемая для испытания, первичного отбора и оценки активности потенциальных лекарственных веществ - ингибиторов фермента, (продукта изучаемого гена), содержит этот продукт и его субстрат (субстраты).

Когда наработан белок (продукт избранного для изучения гена), тогда возникает вопрос, как узнать функцию этого белка? Например, какую реакцию он катализирует как фермент, для того, чтобы по подавлению этой реакции отбирать ингибиторы. Если имеется близкое сходство белка с белком из "модельного" организма, подобрать бесклеточную систему - субстрат для нового белка, не является трудной задачей.

Если сходство есть, но не очень близкое, прибегают к анализу "мотивов" - коротких участков аминокислотной последовательности, которые распределены по всей длине белковой цепи при выравнивании и могут оказаться сходными у двух белков. Когда такого сходства нет, или сходство обнаружено, но нет ясности в функции самого гомолога, то есть белка, взятого для сравнения, то прибегают еще к одному пути установления функций изучаемого белка. Устанавливают, с какими белками он контранскрибируется. Если транскрипт - часть полицистронной информационной РНК, необходимой для протекания в последующем определенного метаболического процесса с участием нескольких ферментов, тогда поиск функции изучаемого белка, включенного в группу этих ферментов, сужается.

В целом подходы к установлению функций продуктов изучаемых генов многочисленны и их разнообразие неуклонно растет. Таким образом, можно, в конечном счете, проводить серийные испытания потенциальных ингибиторов функций почти любого из тысяч генов, составляющих геном патогена и обнаруживать все возможные "уязвимые точки" микробной клетки.

Подобный путь достижения цели породил в литературе термин "обратная генетика" - исследование ведется не от клетки и ее фенотипа к гену и геному, а, наоборот, от гена к клетке, и к ее фенотипу. Что касается скрининга лекарственных веществ, осуществляемого таким путем, то он получил название "таргетного скрининга" или «скрининга по мишени».

Таргетный скрининг и его технология, схематически описанная выше, широко обсуждается в настоящее время. Неоспоримое достоинство в том, что любой ген становится доступен для ингибиторов его функций.

Однако, в отношении таргетного скрининга высказываются и критические замечания, которые не носят принципиального характера. Однако, в них отмечается, что обнаружение ингибитора таргета – это только начало пути создания антимикробного агента, пригодного для клиники. Требуется, например, чтобы это вещество проникало через оболочку микробной клетки, не подвергалось ферментативной инактивации и т.п. Тем не менее, таргетный скрининг с некоторыми его модификациями и дополнительными тестами, начинает занимать важное место в создании антимикробных лекарств.

Полное секвенирование генома в сочетании с применением методов генетической инженерии как достижение структурной геномики, вносит свой вклад в фармацию еще в одном отношении. У патогенных микроорганизмов открыты гены, «существенные» для протекания инфекционного процесса, но не «существенные» при росте *in vitro* - на искусственных питательных средах. В последнем случае они ускользают от внимания исследователя, не поддаются идентификации и не могут быть использованы как таргеты при поиске лекарств. После того, как эти гены были отдифференцированы - такая возможность появилась. То есть, возможность наработки, согласно описанной выше процедуре, ДНК-матрицы, соответствующей информационной РНК, затем наработка генного продукта и, наконец, отбора ингибиторов функций этого генного продукта.

Скрытые или по образному выражению "молчащие" *in vitro* гены патогенных микроорганизмов получили название *ivi* генов (генов вирулентности), несмотря на то, что в их число входят не только гены, кодирующие образование токсинов, адгезинов и других факторов вирулентности. К ним относят также гены ферментов и транспортных белков, позволяющих патогенной микробной клетке жить и размножаться в тканях макроорганизма в условиях дефицита некоторых органических веществ и неорганических ионов. Можно привести такой пример: микробная клетка находясь *in vivo*, испытывает недостаток ионов железа, чего не бывает на обычных питательных средах. В этом случае в клетке синтезируется специальная система транспорта железа в клетку из среды с малой его концентрацией; фактически транспорт идет против градиента концентрации. Для образования такой системы необходима экспрессия определенных генов. Из молчащих («несущественных») они становятся «существенными», то есть подавление их функций отобранными ингибиторами приведет к подавлению роста (размножения) патогена именно в условиях *in vivo*, т.е. в инфицированном

организме. Это, собственно, и есть цель исследователей, создающих новые лекарственные препараты.

К числу генов, становящихся «существенными» для патогена именно *in vivo* относятся гены, кодирующие оптимальный компонентный состав системы, а также недостаток в пуринах и их предшественниках.

Вышеизложенное, конечно, не означает, что во время инфекции в клетке патогена экспрессируются только *ivi* гены. Большинство генов экспрессируется и *in vivo* и *in vitro*. Их продукты необходимы клетке всегда. Такие гены получили образное название "house keeping gens", что означает, "гены, на которых держится дом". Эти гены экспрессируются в любых условиях, поскольку без них клетка просто не может существовать.

Соотношение между house keeping gens и *ivi* gens у разных патогенных бактерий варьирует, но более 90% генов принадлежит к первой группе. Поскольку ингибиторы house keeping gens обнаруживаются при поиске на питательных средах *in vitro*, практически все применяемые в клинике антибиотики и синтетические антибактериальные препараты являются ингибиторами функций именно этих генов*.

Гены, кодирующие эти защитные ферменты не относятся к house keeping gens. При этом, ингибиторы бета-лактамаз сами почти не обладают антибактериальной активностью и применяются вместе с бета-лактамными антибиотиками. Последние, в свою очередь, ингибируют активность транспептидазы пептидогликана, гена принадлежащего к house keeping gens.

Таким образом, *ivi* гены (их продукты) составляют набор таргетов для использования их только в будущем. Также представляют значительный интерес пути выявления и выделения *ivi* генов с последующим их использованием в бесклеточных системах отбора ингибиторов. Работы в этом направлении ведутся в ряде лабораторий. В качестве примера приведем одну из таких работ. Ее авторы назвали свой метод IVET - данная аббревиатура означает In Vivo Expression Technology.

Геном патогенной бактерии (в данном случае речь идет о штамме *Salmonella typhi* murgium) с помощью большого набора рестриктаз делится на сотни фрагментов. Каждый отдельный фрагмент генноинженерными методами соединяется с лишенным промотора геном хлорамфеникол-ацетилтрансферазы. Такой, лишенный промотора ген, не может реплицироваться при его введении в клетку. Однако, он мог реплицироваться, если соединенный с ним ген

* В клинике применяются ингибиторы бета-лактамаз (сульбактам, клавулановая кислота и др.).

(подразумевается, что это фрагмент ДНК- салмонеллы) имел бы промотор для своей репликации.

Тогда, этот промотор, вызвал бы репликацию не только своего гена, но и репликацию следующего за ним гена, хотя и не имеющего промотора. Таким образом, репликация гена хлорамфеникол-ацетилтрансферазы могла происходить в клетке, только за счет использования или "захвата" чужого промотора.

На следующем этапе работы к этому сдвоенному фрагменту, (обозначенному х-cat, где х - фрагмент генома салмонеллы, а cat - ген хлорамфеникол-ацетилтрансферазы; далее присоединяется также лишенный промотора лактозный оперон (lac Z). Этот оперон нужен для системы окисления лактозы; в результате, генные инженеры получали фрагмент уже из трех частей: х-cat - lacZ. И этот фрагмент состоящий из трех разнородных частей, включался в плазмиду. Фактически в данном случае надо говорить, не об одном фрагменте, а о многих фрагментах, так как часть х, происходящая из генома салмонеллы, зависит от использованной рестриктазы и поэтому содержит разные участки генома.

Фрагменты х-cat - lacZ различаются именно по х. В результате, получился набор различных плазмид, а после введения их в клетку E.coli - набор различных штаммов E.coli с разными частями генома салмонеллы.

Следующий этап работы заключался во внедрении E.coli в организм лабораторного животного (мыши) и введении животному хлорамфеникола. Спустя сутки из ткани животного высевалась бактериальная культура, причем высев производился на твердую индикаторную среду с лактозой. Анализировались (визуально) выросшие колонии. Они оказывались или красного цвета (окисляющие лактозу, меняющие рН) или - белого (бесцветные). Красные доминировали, их было свыше 90%. Однако, отбирались и подвергались дальнейшему изучению именно белые. Ход рассуждений в данном случае был следующим. Если из животного, которому ввели хлорамфеникол высевалась жизнеспособная клетка, давшая колонию на твердой среде, значит в этой клетке экспрессировался ген хлорамфеникол- аетилтрансферазы и образовывался, соответственно, фермент, инактивирующий (ацетилирующий) антибиотик. Следовательно, в данном фрагменте х - есть ген с промотором. Этот ген экспрессировался в организме животного, а вслед за ним экспрессировался и ген хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (лишенный, напомним, собственного промотора). Но, экспрессироваться мог ген, принадлежащий как к *ivi* генам, так и к *house keeping gens*. Однако, это еще не позволяет "поймать" *ivi* ген и

утверждать, что в фрагменте х именно один из таких генов. Если, колония на индикаторной среде с лактозой выросла бесцветная, значит на искусственной питательной среде, данный промотор не работал и ген во фрагменте х не экспрессировался. Вероятно, что он нужен только при развитии инфекционного процесса и принадлежит к генам вирулентности. В случае же колоний красного цвета экспрессируется ген, кодирующий образование фермента, расщепляющего лактозу; при этом меняется цвет индикатора и колония окрашивается. Отсюда можно сделать вывод о том, что в данном фрагменте х содержится (вместе с промотором) ген, принадлежащий к *house keeping gens*, т.е. он экспрессируется всегда: и в организме животного и на искусственной питательной среде. Такой ген в данной случае не представляет интереса. Его можно обнаружить более традиционным путем (для подбора в последующем ингибиторов кодируемого им продукта).

Авторы рассмотренного метода (метода IVET) приводят результаты конкретной серии своих экспериментов, в соответствии с которой, на 212.000 колоний красного цвета пришлось только около 2600 колоний неокрашенных. Из клеток *E.coli*, образовавших эти, последнего типа колонии, было затем выделено около ста генов, принадлежащих к "скрытым" генам сальмонеллы (*ivi* генам). Из них около пятидесяти были новыми, т.е. ранее не описанными, и их продукты представляли интерес как потенциальные таргеты для отбора антимикробных агентов.

Метод IVET не является единственным путем идентификации *ivi* генов у патогенных микроорганизмов. Разрабатываются и другие подходы, например, с использованием направленного мутагенеза.

Интерес к *ivi* генам обусловлен не только тем, что они (их продукты) практически не использованы как таргеты, но и тем, что здесь следует надеяться на высокую избирательность действия (безопасность) создаваемых лекарственных средств. Вместе с тем необходимо отметить, что в настоящее время геномика уже позволяет дифференцировать гены патогенных микроорганизмов по многим показателям и это, в свою очередь, позволяет вести скрининг антимикробных агентов все более целенаправленно. В качестве примера можно привести результаты, полученные при изучении представителей рода *Chlamydia* (внутриклеточных паразитов с относительно небольшим геномом - порядка одного миллиона пар нуклеотидов), которые вызывают инфекции бронхолегочного и мочеполового трактов. Прежде всего гены этого прокариота были разделены на *house keeping gens* и *ivi* гены. Далее, была выявлена группа генов, влияющих на апоптоз клетки - хозяина. Далее, были

идентифицированы гены, дублирующие систему жизнеобеспечения паразита. При этом было показано, что ряд этих генов близок по степени гомологии генам высших растений и приблизительно 27 % из них уникальны для рода *Chlamydia*.

Классификации различных генов становятся все более многочисленными и разнообразными, а, следовательно, и таргетный скрининг, начинающийся с генов, в идеале должен вести к все более четким результатам, то есть антимикробным агентам с четко определенными свойствами.