

Комплект ситуационных задач

по дисциплине «Биотехнология»

Код формируемой компетенции ОК-1, ПК-1, ПК-3, ПК-4, ПК-28, ПК-48, ПК-49

1. Задачи реконструктивного уровня

Раздел 1. Предмет и содержание биотехнологии. Государственная регламентация производства ЛП биотехнологическими методами.

Тема 1.6 Структура биотехнологического производства. Государственная регламентация производства ЛП биотехнологическими методами. Аппаратура (ферментёры и биореакторы).

Задача 1.

Биотехнология как наука и производство основана на использовании определенных агентов и процессов для воздействия на живую природу с целью получения ценных продуктов, в том числе и ЛС.

В части анализа роли биотехнологии для современной фармации:

- сравните, что отличает современную биотехнологию в ее историческом развитии; приведите схему биотехнологического производства;
- расшифруйте, что понимают под терминами «агенты» и «процессы» в биотехнологии;
- представьте на конкретных примерах возможности воздействия на живую природу для получения ЛС.

Задача 2.

Биотехнологическое производство в фармацевтической промышленности - это система устройств периодического или непрерывного действия. С позиции системного подхода можно реально оценить соответствие конкретного устройства целям и задачам этого производства во взаимосвязи всех слагаемых процесса.

В свете представленных задач производственного процесса при анализе ситуации используйте:

- технологическую схему производства с разделением ее на подготовительную и основную части и их краткой характеристикой;
- классификацию биосинтеза по технологическим параметрам;
- реализацию системного подхода в зависимости от цели и поставленной задачи с выбором типа ферментационного процесса.

Задача 3.

Биосинтез ЛС или БАВ в условиях производства требует создания стерильных условий при многостадийности всего процесса в целом. При этом для успешного осуществления биосинтеза необходимо не допустить контаминации целевого продукта.

В условиях поставленной задачи укажите:

- в чем выражается многостадийность биосинтеза;
- способы предотвращения контаминации целевого продукта;
- схему очистки воздуха, используемую в процессе биосинтеза.

Задача 4.

Правила GMP - руководящий нормативный документ международного значения, который должны обязательно принимать к сведению как отдельные фирмы, так и все производство фармацевтических препаратов в целом. Это правила организации и контроля производства, которые составляют единую систему требований к качеству выпускаемой продукции. Все производства, интегрированные в международный рынок ЛС и медицинских препаратов, выпускающие готовые лекарственные формы и любую продукцию медицинского назначения, включая субстанции, обязаны работать по этим правилам. В то же время каждая страна, производящая ЛС, имеет свою Государственную фармакопею как руководящий документ проверки качества той или иной медицинской продукции.

Проведите сравнительный анализ:

- правил GMP и государственных фармакопей с позиций требований для экспорта фармацевтической продукции;
- необходимости проведения валидации как любого фармацевтического производства, так и биотехнологической продукции в частности;
- правил международного значения для получения достоверных данных о проведенных испытаниях и безопасности ЛС.

Задача 5.

Очевидно, что биосинтез ЛС необходимо проводить в асептических условиях. Тем не менее проблема стерильности инъекционных препаратов и обсемененности препаратов для наружного применения остается одной из самых сложных при производстве ЛС. В этом случае можно обратиться к радиационной стерилизации

ЛС.

Предложите выбор радиационной стерилизации фармацевтических препаратов на конкретных примерах, используя ваши представления:

- о видах и дозах облучения, режиме стерилизации, установках;
- о лекарственных формах, разрешенных для этого вида стерилизации;
- причинах влияния облучения на внешний вид порошка и стеклянную тару.

Задача 6.

Биотехнологическое производство в фармацевтической промышленности - это система устройств периодического или непрерывного действия. С позиции системного подхода можно реально оценить соответствие конкретного устройства целям и задачам конкретного производства во взаимосвязи всех слагаемых процесса.

В свете представленных задач производственного процесса при анализе ситуации используйте особенности:

- конструкции ферментера («обвязка ферментера»);
- систем регуляции процесса, устройств теплосистем и массообмена;
- устройств систем аэрации.

Эталоны ответов:

Задача 1.

Современная биотехнология решает многие проблемы в части фармации по созданию новых эффективных и безопасных ЛС, профилактических препаратов и различных диагностикумов. Значительная часть фармацевтической продукции сегодня полностью или частично относится именно к биотехнологическому производству. Номенклатура лекарственных препаратов, полученных на основе биообъектов, в силу объективных причин имеет тенденцию к своему расширению. В категорию лекарственных препаратов биотехнологического производства входят:

- собственно ЛС - аминокислоты и препараты на их основе, антибиотики, ферменты, коферменты, кровезаменители и плазмозаменители, гормоны стероидной и полипептидной природы, алкалоиды;
- профилактические средства - вакцины, анатоксины, интерфероны, сыворотки, иммуномодуляторы, нормофлоры;
- -диагностические средства - ферментные и иммунные диагностикумы, препараты на основе моноклональных антител и иммобилизованных клеток.

В современном представлении «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 ЛС.

Биотехнология позволяет организовать не только рентабельное, экологичное, стабильное и качественное производство ЛС, но и развивать науку на самых ее передовых рубежах: это геномика и протеомика, сигнально-коммуникативные системы, антисмысловые олигонуклеотиды и т.д.

В историческом аспекте биотехнология прошла три этапа: эмпирический, научный (родоначальник - Л. Пастер), современный.

Под термином «агенты» понимают биообъекты как продуценты (источник ЛС) и ферменты (биокатализаторы). Процессы означают продуцирование (биосинтез) либо биотрансформацию (биокатализ). В качестве примера биообъектов-продуцентов можно привести грибы (эукариоты), актиномицеты и бактерии (прокариоты); в качестве примера промышленного биокатализатора - аминоксилазу, используемую при получении 6-АПК как основы для создания полусинтетических антибиотиков (метициллина, карбенициллина, оксциллина и т.д.).

Схема биотехнологического производства включает:

- исходное сырье, энергетические ресурсы, квалифицированный труд;
- биообъект (продуцент, фермент);
- ферментер (биореактор);
- ферментация (биокаталитическая реакция);
- БАВ;
- побочные продукты, отходы производства.

Примеры биообъектов и их целевых антибиотических продуктов:

- грибы-продуценты β -лактамов;
- *Penicillium chrysogenum* - пенициллины;
- *Acremonium chrysogenum* - цефалоспорины;
- актиномицеты, *Streptomyces* - аминогликозиды;
- бактерии *Bacillus Micromonospora polytuxa* - полимиксин;
- *Bacillus brevis* - грамицидин и т.д.

Задача 2.

Биотехнологическое производство ЛС и БАВ строится на использовании исходного сырья, энергетики,

реализованного труда, биообъектов, процессов и аппаратов. В условиях такого производства технология делится на ряд подготовительных и основных этапов.

К числу подготовительных этапов относятся:

- выращивание посевной среды (инокулята) сначала в пробирках, затем в колбах на качалках с последующим перемещением ее в инокулятор и далее в ферментер;
- подготовка питательной среды;
- подготовка ферментационного оборудования.

Основные операции (стадии): биосинтез, разделение биомассы и культуральной жидкости, концентрирование, очистка (ультрафильтрация, экстракция, сорбция), получение конечной субстанции или готовой лекарственной формы с последующей расфасовкой и упаковкой.

Процессы ферментации (биосинтеза) можно классифицировать по технологическим параметрам, например по организации материальных потоков. Процессы представлены ниже.

- Периодический (задаются и остаются без изменений все параметры ферментации - температура, рН, обороты мешалки). Этот процесс - нерегулируемый и используется, например, при выращивании пропионовых бактерий для получения витамина В12 в анаэробных условиях на специально подобранной среде или в случае получения биомассы как целевого продукта.
- Полуциклический (регулируемая ферментация). В ходе процесса добавляют питательные вещества, регулируют рН, в случае необходимости добавляют предшественники. Пример: при получении вторичных метаболитов антибиотиков (при биосинтезе пенициллина на 2, 3 сут. необходимо добавить ФУК).
- Непрерывный процесс. В процессе биосинтеза отбирают небольшую часть культуральной жидкости (10-15%) и переносят в другой ферментер. Культуральная жидкость выполняет роль посевного материала. В первый ферментер добавляют равное количество питательной среды или воды. Получается замкнутый цикл. Например, совершенствование стадии получения сорбозы (для повышения выхода целевого продукта) при синтезе аскорбиновой кислоты при переходе от периодического культивирования продуцента *Gluconobacter oxydans* к непрерывному позволило увеличить скорость образования сорбозы в 1,7 раза.
- Многоциклический процесс отличается тем, что в конце ферментации 90% культуральной жидкости сливают из ферментера, а оставшаяся часть выполняет роль посевного материала.

В двух последних случаях отпадает необходимость в стадии выращивания посевной среды.

При выборе типа ферментации в зависимости от поставленной задачи имеет существенное значение, что является целевым продуктом: первичные или вторичные метаболиты. Критерием в выборе типа ферментации (поверхностная или глубинная) служат также объемы производства. Если это промышленное производство, то, безусловно, это глубинная ферментация, а если нужны небольшие объемы, к примеру, в лабораторных условиях, то это поверхностная ферментация (биологические матрасы).

Задача 3.

Многостадийность биосинтеза выражается в выращивании посевной среды (многоэтапность), в приготовлении соответствующей питательной среды многокомпонентного состава, в самом процессе ведения биосинтеза (биокатализа), в выделении, очистке, концентрировании, сушке, фасовке и упаковке ЛС. Все эти этапы требуют стерильных условий производства, его асептики, начиная с воздуха, оборудования и заканчивая асептикой питательной и посевной среды.

Биосинтез осуществляют с использованием жидкой питательной среды, при глубинном культивировании. Емкости ферментеров имеют объем от 100 л (1 м³) до 10 000 л (100 м³), и все коммуникации стерилизуют острым паром (130 °С) в течение 1 ч. Стерилизацию воздуха производят методом фильтрации по следующей схеме: воздух с улицы поступает в фильтр предварительной очистки, где он очищается от пыли и влаги, затем на компрессор, где воздух нагревается, далее в холодильник для охлаждения, после чего под давлением проходит в головной фильтр (общий для цеха ферментации) и, наконец, в индивидуальный фильтр для каждого ферментера.

Поступающий с улицы воздух содержит от 1000 до 100 000 клеток микроорганизмов в 1 м³, среди которых могут встречаться и патогенные штаммы. Именно поэтому, чтобы не допустить контаминации культуральной жидкости, индивидуальные фильтры не должны пропускать микроорганизмы размером более 0,25 микрона (мкм). Для сравнения, размеры, например, кокков составляют 0,5-1,5 мкм, кишечной палочки - 0,4-0,8 мкм. При этом существует так называемый коэффициент проскока, поэтому 100% стерилизация не всегда возможна.

Фильтры стерилизуют острым паром при 120-130 °С в течение 30 мин. Для проверки эффективности стерилизации проводят биологический анализ проб. Питательную среду стерилизуют с применением термического нагревания (в 1 г кукурузной муки содержится от 104 до 109 клеток микроорганизмов). К воде как компоненту питательной среды предъявляют те же требования, что и к питьевой воде (водопроводная вода должна содержать не более 100 микробных клеток в 1 мл).

Задача 4.

Правила GMP - правила организации производства и контроля качества ЛС, единственная система

требований к производству и контролю, руководящий нормативный документ для производителей и фирм, выпускающих ЛС, для всей продукции медицинского назначения и субстанций. Самые жесткие требования предъявляют к инъекционным лекарственным препаратам. Эта система требований была введена в развитых странах в 1969 г. под эгидой ВОЗ. В последующие годы ее неоднократно пересматривали. Внедрение этой системы

приносит выгоду импортерам и имеет значительные преимущества для экспортеров, так как является гарантией высокого качества предлагаемой продукции при соблюдении определенных требований:

- обязательной государственной регистрации ЛС;
- обязательного государственного инспектирования и надзора за фармацевтическими предприятиями;
- в стране должны быть приняты правила GMP; подобно фармакопеям, правила GMP неоднородны, поэтому существуют:
- международные правила GMP (разрабатывает ВОЗ);
- региональные правила GMP (например, в странах Европейского экономического сообщества, ассоциации стран Юго-Восточной Азии); •
- национальные правила GMP (внедрены в 30 странах мира).

В некоторых странах, в частности в Японии, национальные правила GMP ужесточены по сравнению с международными.

В перечне разделов правил GMP особое место занимает раздел валидации. Валидация - оценка и документальное подтверждение соответствия производственного процесса и качества продукции установленным требованиям. Валидация бывает периодической и внеплановой и оценивает как сам производственный процесс, так и пределы его возможностей.

На биотехнологическом производстве внеплановую валидацию проводят, если производство меняет штамм продуцента или изменена питательная среда (меняется метаболизм продуцента и возможно появление нежелательных примесей).

Для получения достоверных данных о проведенных испытаниях и безопасности ЛС используют правила GLP - правила организации лабораторных исследований. Перед клиническими испытаниями проводят лабораторные исследования (*in vitro*, *in vivo*). При испытании на животных можно получить различные результаты, поэтому важна правильная организация исследований. Животные должны быть гете-рогенны (разные виды), их питание должно быть постоянным и одинаковым; требуется определенная планировка вивария для исключения стресса у животных и поддержания их жизнеспособности.

Правила GCP - правила организации клинических испытаний с соблюдением прав больных и добровольцев, с созданием общественных и этических комитетов по контролю клинических испытаний лекарственных препаратов. Цель клинических испытаний: получение достоверных результатов по терапевтическому эффекту ЛС и безвредности его применения на пациентах. Для исключения вероятности необъективности трактования полученных данных рекомендуют увеличивать количество учреждений, где проходят испытания, а не ограничиваться рамками одного учреждения и одним и тем же количеством испытуемых.

Задача 5.

В реальных условиях радиационную или лучевую стерилизацию применяют на отдельных производствах. Разрешенными для стерилизации ЛС являются у-лучи изотопа кобальта (^{60}Co) и быстрые электроны с энергией не выше 5 млн эВ (электронвольт), получаемые на ускорителях при отсутствии наведенной радиации у обработанных лекарственных препаратов (нет расщепления атомного ядра). Стерилизующая доза ионизирующего облучения составляет 2,5 млн рад, т.е. 2,5 мегарад.

Промышленная установка представляет собой герметическую стерилизационную камеру со стандартными стержнями с Co . Стержни могут автоматически вдвигаться и удаляться из камеры. Режим стерилизации подбирают таким образом, чтобы нужная доза набиралась препаратом примерно за сутки. В случае применения быстрых электронов стерилизующая доза набирается за несколько секунд. Флаконы подаются по одному к «окошку», набирают дозу и двигаются дальше.

Лучевая стерилизация обеспечивает необходимый результат, при этом лекарственные препараты сохраняют свою активность и удовлетворяют фармакопейным тестам. Внешний вид облученных препаратов может меняться, например белые порошки теряют блеск и приобретают матовый оттенок.

Также необходимо иметь в виду, что под влиянием облучения меняется кристаллическая решетка стекла. Оно мутнеет, темнеет, но при этом полностью сохраняет свои функциональные качества. Потемнение стекла обратимо и со временем исчезает.

Существует опыт применения такой стерилизации на примере антибиотиков. Порошки красного цвета (актиномицины) и желтого (тетрациклины) становятся более тусклыми, но обладают прежней активностью. При стерилизации природных и полусинтетических пенициллинов, аминогликозидов и тетрациклинов снижения активности также не происходит. Исключение составляют полиеновые антибиотики: например, нистатин заметно теряет свою активность.

Задача 6.

Объем ферментационных аппаратов для промышленного производства, например антибиотиков,

колеблется от 1 до 150 м³. Цилиндрическая поверхность снабжена так называемой тепловой рубашкой, представляющей собой систему змеевиков для обеспечения постоянной температуры. Также ферментер снабжен мешалкой (пропеллерной, турбинной) для обеспечения хорошего массообмена и специальным устройством для подачи стерильного воздуха определенной температуры - барботером. В нижней части аппарата имеются отбойники, необходимые для создания вихревых потоков, которые препятствуют образованию «застойных зон». Выращивание посевного материала проходит в отдельном ферментере - инокуляторе. Современные ферментеры снабжены контрольно-измерительной аппаратурой, которая обеспечивает контроль pH, температуры внутри ферментера, количества кислорода в среде, давления внутри аппарата и т.д.

Важность аэрации на стадии ферментации обусловлена тем, что большинство используемых микроорганизмов-продуцентов являются аэробами. В целом потребность в кислороде зависит от концентрации биомассы и ее метаболической активности, что требует регулирования скорости подачи воздуха в аппарат. Регуляцию осуществляют по совокупности параметров, характеризующих метаболическую активность культуры: скорости потребления углерода, азота, кислорода, интенсивности дыхания, изменения pH, концентрации растворенного кислорода, вязкости культуральной жидкости, концентрации биомассы и т.д. Кроме того, добавление компонентов питательной среды ведет к значительному разбавлению культуральной жидкости и увеличению ее объема в ферментере, что позволяет делать периодические отборы культуральной жидкости, которая затем передается в цех очистки.

Критерии оценки по вопросам знаний, умений и навыков биотехнолога

- Поиск и отбор продуцентов ЛС.
- Применение различных способов ферментации при получении ЛС.
- Знание оборудования и условий проведения ферментации при получении ЛС.
- Знание методов контроля процесса ферментации.
- Определение подлинности целевого продукта.
- Количественная оценка целевого продукта.

Раздел 2. Биообъекты в производстве лекарственных, профилактических и диагностических препаратов. Совершенствование биообъектов.

Тема 2.4 Совершенствование биообъектов методами клеточной и генетической инженерии. Имобилизованные биообъекты.

Задача 1.

Существуют вполне определенные требования и условия для создания и развития биотехнологического производства ЛС. В частности, это касается проблемы выбора биообъектов для масштабирования производства. Имеются существенные различия между диким штаммом и промышленным штаммом. Штамм обладает вполне конкретными свойствами природного характера, а производственный процесс имеет свои требования к этому штамму. Существуют способы воздействия на дикий штамм с целью удовлетворения требований производства ЛС.

Проанализируйте данную ситуацию с точки зрения:

- представления о биообъекте и его функциях;
- соответствия свойств продуцента требованиям производства ЛС и проблем безопасности при работе с продуцентами;
- применения конкретных методов преобразования биообъекта для дальнейшего использования его в создании новых продуцентов ЛС.

Задача 2.

Как известно, при использовании клеточной инженерии при создании новых продуцентов широко применяя методику прото-пластирования (получения протопластов) как процесс конструкции гибридных структур.

В плане решения задачи получения новых продуцентов как источников новых ЛС предложите:

- схему получения протопластов и гибридных структур;
- условия сохранения протопластов;
- конечные цели, достигаемые с помощью продуктов гибридной природы.

Задача 3.

В современной биотехнологии при создании ЛС особое место отводится генной инженерии, суть технологии которой заключается

в искусственном соединении отдельных фрагментов ДНК *in vitro* с последующим введением изолированной ДНК в живую клетку с целью получения рекомбинантных белков. Для осуществления этого необходимы определенные условия, наличие транспортного устройства для внесения ДНК в клетку продуцента, использование ферментов для включения нового гена. Генная инженерия оперирует такими понятиями, как вектор, рестриктазы, липкие концы, сайт узнавания, лигазы, ген-маркер, компетентность клетки, экзон, интрон.

С представленных общих позиций по генной инженерии сформулируйте конкретные условия:

- расшифруйте понятие «вектор» и пути его введения в клетку; предложите ферменты, работающие в этой ситуации;
- предложите технику генно-инженерного эксперимента (стадии);

—сравните процесс образования мРНК у эукариот и прокариот.

Задача 4.

Возникновение таких новых дисциплин, как геномика и протеомика, является настоящим прорывом в биологии и имеет большое значение при создании новых, более эффективных ЛС. Если геномика обозначает совокупность всех генов организма, то протеомика подразумевает совокупность всех каталитических и структурных белков в клетке эукариота или прокариота. Задача геномики - полная генетическая характеристика именно всей клетки. Геномика позволяет выразить сущность организма, его видовые и индивидуальные отличия, предвидеть реакцию на внешние воздействия. Геномика имеет свою классификацию, открывает новые возможности для генотерапии, создания нетрадиционных ЛС, таких, как антисмысловые олигонуклеотиды.

В свете представленной краткой информации приведите:

- классификацию геномики с обозначением соответствующих задач;
- возможности генотерапии;
- ситуации возможного применения антисмысловых олигонуклеотидов.

Задача 5.

Современный скрининг ЛС предполагает получение новых ЛС, более эффективных и безопасных. Скрининг как метод предполагает поиск и отбор продуцентов, с помощью которых можно получать новые ЛС с достаточной степенью функциональной активности, определяемой по биологическим тестам с дальнейшей расшифровкой химической структуры и механизма действия. Скрининг можно проводить в классическом варианте или на геномном уровне.

Проанализируйте последние достижения геномики и протеомики, помогающие в решении проблем поиска новых эффективных и безопасных ЛС. В ответе используйте:

- современные данные о последних достижениях геномики и протеомики;
- понятие таргетного скрининга;
- международные программы поиска ш-генов.

Эталоны ответов:

Задача 1.

Из определения биотехнологии следует, что основным инструментом получения или модификации ЛС является биообъект. Именно поэтому - это продуцент, биосинтезирующий нужный продукт, либо фермент, катализирующий присущую ему реакцию. Для использования активно функционирующего биообъекта необходимо знать его свойства с целью его совершенствования. Все биообъекты можно подразделить на:

- макрообъекты (человек, млекопитающие, рептилии, рыбы, насекомые, растения);
- микрообъекты (эукариоты - низшие грибы, водоросли, кроме нитчатых; прокариоты- актиномицеты, бактерии, сине-зеленые водоросли);
- микробиосистемы (ферменты, протопласты).

Выбор биообъекта зависит от его конкретных свойств, таких, как безвредность, устойчивость к фагам и вирусам, активность биосинтеза, скорость роста и накопление биомассы, стабильность по производительности, чувствительность к условиям культивирования (аэрация, pH, температура), потребность в источниках углеводов и азота, использование дешевых и доступных питательных сред, соответствие условиям промышленного производства (отсутствие неприятного запаха, невысокая вязкость среды).

Повышение биосинтетической активности биообъекта возможно прежде всего благодаря использованию методов мутагенеза и селекции. Методы современной селекции сочетаются с применением геномной инженерии, которая манипулирует ДНК, изменяя либо число и порядок расположения генов, либо проводя внутригенные изменения. Важной характеристикой мутантов является их способность к реверсии (обратное мутирование). Типы мутаций: делеция, дупликация, амплификация и др.

Проблема безопасности в работе с продуцентами на физическом уровне предполагает понижение давления внутри ферментера для предотвращения возможного выброса культуральной жидкости во внешнюю среду. На биологическом уровне это прежде всего неукоснительное соблюдение правил GMP, одновременно можно, например, сделать биообъект «капризным» в отношении компонентов питательной среды, тогда во внешней среде без них он существовать не сможет.

Задача 2.

Одним из способов модификации биообъекта с целью усиления его функциональной активности является метод клеточной инженерии.

Клеточная инженерия - это техника обмена фрагментами ДНК, участками хромосом у прокариот и участками и целыми хромосомами у эукариот независимо от степени эволюции.

Для получения гибридных клеток применяют технику протопластирования, которая включает следующие этапы:

- выбор биообъектов (прокариот, эукариот);
- обработку клеточных стенок ферментами;
- стабилизацию протопластов (10% гипертонический раствор аннита, сахарозы, хлорида натрия);
- слияние протопластов в среде ПЭГ; для облегчения фузии клетки обрабатывают солями металлов, ферментами или быстроменяют температуру, т.е. делают их компетентными; при слиянии (фузии)

получается протопласт с двумя наборами хромосом - диплоидный набор (рекомбинация ДНК);

- регенерацию (восстановление стенки протопласта).

Полученный гибрид засевают на плотную питательную среду. Чтобы отличить гибридную клетку от негибридной, необходимо на 4-й стадии включить еще один протопласт, несущий маркер. Маркер - это участок гена, кодирующий образование какого-либо фермента, который «заявляет» о себе при высеве на питательную среду, например маркер β -лактамаза. Если в питательной среде находится бензилпенициллин, то вырастут только клетки, содержащие β -лактамазу, а это могут быть только клетки-гибриды. При протопластировании и слиянии протопластов может происходить явление амплификации (увеличения) количества генов. Например, если амплифицируется ген, ответственный за синтез целевого продукта, то выход последнего (витамины, гормоны, антибиотики) соответственно увеличивается.

Задача 3.

Цели генной инженерии - создание новых продуцентов целевых продуктов (новые ЛС, диагностические и профилактические препараты).

Суть технологии - соединение фрагментов ДНК *in vitro* с последующим введением изолированной ДНК в живую клетку посредством ферментов эндонуклеаз, в частности рестриктаз.

Техника генно-инженерного эксперимента

- Получение чужеродного фрагмента ДНК для последующей вставки его в клетку хозяина.
- Выделение плазмиды из клетки-донора (например, *E. coli*).
- Конструирование рекомбинантной плазмиды (вектора). Векторрекомбинант (плазида в виде фага или изолированной ДНК, или вируса) получают с помощью фермента рестриктазы, разрезающей фосфодиэфирные связи в строго определенном месте последовательности оснований нуклеотидной цепи (сайт узнавания). При этом образуется два липких конца. Далее следует стадия отжига - процесс смещения двух фрагментов ДНК, при котором восстанавливаются только водородные связи. Для восстановления фосфодиэфирных связей используют ферменты ДНК-лигазы, которые «сшивают, склеивают» молекулы ДНК.
- Включение вектора в клетку хозяина. Вектор включается в клетку хозяина при условии, если цитоплазматическая мембрана близко подходит к клеточной стенке, тогда вектор проникает внутрь клетки через так называемые окошечки, которые образуются при обработке ее ферментами, в результате чего эта клетка становится компетентной.
- Отбор гибридных клонов. Проводят посев на питательную среду, содержащую, например, антибиотик бензилпенициллин. При этом вырастают только клоны, имеющие в своем геноме ген-маркер, кодирующий синтез, например, фермента β -лактамазы.

Ген-маркер заранее внедряется в геном гибридной плазмиды.

В процессе образования молекулы мРНК имеет место процесс сплайсинга (сращивания). У эукариот, в отличие от прокариот, ген представляет собой мозаичную структуру, содержащую наряду с экзонами (последовательности оснований, несущие информацию) интроны (последовательности оснований, не несущие информацию). Однако фермент РНК-полимераза катализирует транскрипцию как экзона, так и интронов. В процессе сплайсинга у эукариот интроны с помощью ферментов вырезаются, а экзоны после удаления интронов сращиваются. При этом образуется функционирующая (зрелая) мРНК. У прокариот нет такого процесса (так как их гены не содержат интроны), и образующаяся в результате транскрипции молекула мРНК сразу же способна к функционированию.

Задача 4.

Согласно целям и задачам, различают структурную, сравнительную и функциональную геномику. Структурная геномика занимается идентификацией геномов клеток и отдельных структурных генов по определенным характеристикам: общее количество генов в геноме и их последовательность, молекулярная масса, нуклеотидная последовательность в каждом гене. Эти характеристики относятся к геному-хромосоме у прокариот и к каждой из хромосом у эукариот. Сравнительная геномика получает сведения о степени гомологии родственных генов, что позволяет ответить на вопрос об эволюционной близости одного организма другому. Она также позволяет вести поиск ингибиторов какого-либо гена (вернее, кодируемого им белкового продукта) у патогенного микроорганизма с целью создания на их основе ЛС, однако при этом необходимо знать, есть ли ген с такой или близкой последовательностью нуклеотидов в организме хозяина. Таким путем можно определять также степень безопасности ЛС. Функциональная или метаболическая геномика устанавливает связь между геномом и метаболизмом, кластерами генов и многоступенчатыми метаболическими процессами, отдельными генами и конкретными метаболическими реакциями (в этом случае имеются свои специализированные базы данных).

Практическим применением достижений геномики является генотерапия. Для реализации возможностей генотерапии требуется предварительное создание рекомбинантной генетической конструкции с нормальной копией дефектного гена, а также создания для этой конструкции вектора, переносящего ее в клетки организма пациента. Векторы строятся на основе ретровирусов или аденовирусов и их генетических модификаций с тем условием, чтобы при сохранении способности проникать в клетку они теряли бы способность к автономной репликации. Современная генотерапия направлена только на соматические клетки. Генотерапия *ex vivo* предполагает введение путем трансфузии или трансплантации исправленных копий дефектного гена,

предварительно извлеченных из клеток организма пациента. В этом случае снимается проблема отторжения клеток и необходимость проведения терапии иммуносупрессорами. При генотерапии *in vivo* осуществляется доставка в ткани пациента нормального, но выделенного из клеток другого организма гена (чужеродного).

Антисмысловые олигонуклеотиды - ЛС XXI века, представляющие собой комплементарную для определенного участка гена последовательность нуклеотидов (длиной 15-20 нуклеотидов), которая за счет водородных связей будет реагировать или с ДНК гена, или с его иРНК, матрицей для которой служит вышеуказанная ДНК. Такие ЛС могут использоваться в случае гиперпродукции нормального функционально активного белка, что является причиной некоторых как наследственных, так и ненаследственных заболеваний.

Подавление образования избыточного белка в случае применения антисмысловых олигонуклеотидов будет происходить либо на стадии транскрипции (реакция с ДНК), либо на стадии трансляции (реакция с иРНК). В качестве защиты от эндонуклеаз клетки предлагают «упаковку» таких нуклеотидов в липосомы.

Задача 5.

Успехи молекулярной биологии в развитии таких направлений, как геномика и протеомика, позволяют исследователю при использовании соответствующих международных баз данных получать сведения о каждом гене, входящем в геном тест-объекта, получить любой ген в изолированном состоянии, копировать его с помощью ПЦР и на полученной таким образом матрице нарабатывать сначала информационную РНК (иРНК), а затем уже в бесклеточной рибосомной системе и специфический для этого гена белок. Данный белок рассматривают как таргет, т.е. мишень для оценки на молекулярном уровне потенциальных биологически активных агентов как природных, так и синтетических соединений. Используя такой метод скрининга, можно целенаправленно вести поиск ингибиторов функций продукта конкретного гена. Таким образом, таргетный скрининг ЛС начинается не с клетки, а с конкретного гена в качестве тест-объекта. Предпочтение тому или иному гену отдают исходя из задачи (какого рода ЛС мы хотели бы получить) и с учетом данных структурной, сравнительной и метаболической геномики. В дальнейшем отобранные таким образом БАВ должны быть испытаны на предмет клеточной проницаемости, достижения мишени, токсичности и т.д. В качестве частного случая можно указать на перспективность использования таргетного скрининга при поиске «молчащих» или скрытых генов вирулентности (*v^h*-генов). С учетом проблемы обнаружения этих генов *in vitro* используют метод так называемого захвата чужого промотора (IVET). Суть метода представлена ниже.

Геном патогенной бактерии «режется» рестриктазами на сотни фрагментов.

Каждый фрагмент соединяется с лишенным промотора геном хлорамфеникол-ацетилтрансферазы:

Далее к этой генно-инженерной конструкции присоединяется лишенный промотора лактозный оперон:

- Представленная комбинация включается в плазмиду. Получается набор плазмид, различающихся только по фрагменту «х» генома сальмонеллы.
- Наборы плазмид вводят в клетку *E. coli*, и получается ряд различных штаммов *E. coli* с разными частями генома сальмонеллы.
- Производят внедрение *E. coli* в организм лабораторного животного (мышь) с одновременным введением ей хлорамфеникола.
- Через сутки из ткани животного на твердую индикаторную среду с лактозой высевают бактериальную культуру.
- Анализ колоний. Красные колонии (90%) и бесцветные колонии (10%). Если на индикаторной среде с лактозой выросла бесцветная колония, значит, на искусственной питательной среде данный промотор (промотор лактозного оперона) не работал, и ген во фрагментах х₁, х₂, х₃... х_n не экспрессировался. Именно здесь и нужно искать *i*-гены, т.е. гены вирулентности.

Тема 2.8 Получение лекарственных средств на основе культур клеток растений методом биотехнологии.

Задача 1.

Довольно часто при получении ЛС биотехнологическими методами синтез метаболитов в суспензионной культуре останавливается на промежуточных этапах, не доходя до целевого продукта. В этом случае на помощь приходит биотрансформация (биоconversion), которая особенно эффективна в бактериальных клетках, но в ряде случаев такой процесс можно провести и с помощью культур растительных клеток, осуществляющих самые различные реакции биотрансформации, такие, как гидроксирование, изомеризация, этерификация и т.д., что в результате приводит к структурно-функциональным изменениям трансформируемого химического соединения.

Успешно применяют биотрансформацию карденолидов, гликозиды которых широко распространены в практике лечения болезней сердца. В качестве примера можно привести биотрансформацию растения *Digitalis Lanata*.

Проанализируйте метод биотрансформации с точки зрения:

- оптимизации условий проведения биотрансформации как метода получения ЛС и ожидаемого результата данной биотрансформации;
- принципиального функционального отличия между тканями *Digitalis Lanata* и культурами клеток этого растения;
- целесообразности использования метода иммобилизации клеток растения *Digitalis Lanata*.

Задача 2.

Биотехнологические методы получения ЛС на основе культур клеток растений имеют широкое распространение, поскольку по сравнению с получением биомасс растительных культур из дикой природы или с плантаций эти методы отличаются высокой рентабельностью, экологичностью, независимостью от географии и климата произрастания того или иного растения, а также обеспечивают высокое качество целевого продукта, стабильность производства и возможность управления процессами (автоматизацию). Все вышеперечисленное указывает на высокую перспективность дальнейшего развития данных методов.

Анализируя данную ситуацию:

- представьте технологии получения лекарственных препаратов растительного происхождения с конкретными примерами, обращая внимание на специфику растительных клеток, фазы роста, питательные среды, условия ферментации и типы биореакторов;
- сопоставьте стабильность процесса по выходу вторичных метаболитов с дифференцировкой клеток и со стадией культивирования (фазы роста клеток);
- предложите метод использования ферментов для превращения дигитоксина в дигоксин (последний менее токсичен и поэтому его применяют в качестве сердечного препарата - карденолида).

Эталоны ответов:

Задача 1.

Известно, что биотрансформация - метод, использующий локализованные в клетках растения ферменты, которые обладают способностью изменять функциональные группы добавляемых извне химических соединений. Этот метод применяют в основном для повышения биологической активности конкретной химической структуры посредством серии специфических химических реакций одним или несколькими последовательно связанными ферментами. В качестве примера можно привести биотрансформацию дигитокси-на в дигоксин клетками *Digitalis Lanata*. Использование в клинической практике дигоксина предпочтительнее вследствие меньшей его токсичности по сравнению с дигитоксином. При этом необходимо отметить, что при экстрагировании БАВ из биомассы плантационно-выращиваемых растений преобладает в основном дигитоксин.

При решении данной проблемы можно использовать недифференцированные культуры клеток (суспензии) *Digitalis Lanata*, которые сами по себе не образуют сердечных гликозидов, но вполне успешно могут осуществлять реакции биотрансформации субстратов, добавляемых в питательную среду.

Биотрансформация дигитоксина в дигоксин происходит за счет реакции 1,2-гидроксилирования, катализируемой ферментом, находящимся в клетках *Digitalis Lanata*. В данном случае целесообразно применять иммобилизацию растительных клеток путем встраивания их в альгинат кальция или в агарозные шарики, или в сетчатые структуры из нейлона, полиуретана и др. Иммобилизация растительных клеток дает преимущество по сравнению с суспензионными культурами:

- многократное использование биомассы;
- четкое отделение биомассы от продуктов метаболизма;
- увеличение продолжительности культивирования на стадии продуцирования;
- получение большего количества вторичных метаболитов.

Задача 2.

Метод биотехнологии получения ЛС на основе культур клеток растений начинается с процесса получения культуры каллусной ткани или каллуса. Каллус - ткань, возникающая при неорганизованной пролиферации клеток растения (дифференцированное деление клеток). Метод реализует способность любой клетки образовывать полноценное растение в соответствии с ее генетическим и физиологическим потенциалом (естественными возможностями). Эта способность называется «тотипотентность». Стабильность по выходу целевого продукта (вторичных метаболитов) обычно связывают с дифференцировкой клеток и со стадией культивирования (конец экспоненциальной стадии с переходом на постоянную фазу роста и деления клеток).

Примером влияния дифференцировки клеток на выход целевого продукта служит дифференцированный корневой каллус *Atropa belladonna*, синтезирующий тропановые алкалоиды (в отличие от недифференцированного). Другой пример: только недифференцированные клетки *Rauwolfia serpentina* синтезируют индолиловые алкалоиды.

Технология получения каллуса требует наличия молодых и здоровых клеток, стерильности, определенной температуры (+24-26 °С) и влажности (65-70%), аэрации, соответствующего оборудования (специальные ферментеры). В питательную среду, помимо микро- и макроэлементов, источников углерода, витаминов, нужно вносить регуляторы роста растений - ауксины (индолилтриуксусная кислота и др.) и цитокинины (6-бензиламинопурин и др.). Также весьма существенную роль для синтеза метаболитов играют предшественники. Так, добавление фенилаланина увеличивает выход диосгенина на 100%.

Накопление вторичных метаболитов зависит от того, на каких средах (жидких или твердых) проводят культивирование.

Суспензионное культивирование осуществляют в аэрлифтных ферментерах без механической мешалки (с турбинным перемешиванием, с внешней циркуляционной петлей). Растительные клетки в отличие от клеток микроорганизмов имеют большие размеры, вакуоль, целлюлозную клеточную оболочку, клеточные агрегаты. Все это требует системы перемешивания восходящими потоками воздуха (встряхиванием без механических

повреждений). Как правило, для этого используют следующие режимы культивирования: периодический (чаще), циклический и непрерывный (нарастание биомассы коррелирует с синтезом вторичных метаболитов). Для повышения выхода продуктов вторичного метаболизма применяют иммобилизацию растительных клеток.

Иногда конечный продукт биосинтеза необходимо частично преобразовать. В этом случае применяют биотрансформацию - метод, использующий ферменты клеток растения, способные менять функциональные группы добавленных извне химических соединений. Примером применения биотрансформации служит превращение дигитоксина в дигоксин в реакции 1, 2-гидроксилирования, катализируемой ферментом, продуцируемым недифференцированными клетками *Digitalis Lanata*.

Раздел 3. Биотехнология аминокислот, витаминов и коферментов.

Тема 3.2 Получение аминокислот, витаминов и коферментов биотехнологическими методами и с помощью иммобилизованных клеток и ферментов. Конструирование штаммов-продуцентов и оптимизация условий ферментации.

Задача 1.

В процессе промышленного производства аскорбиновой кислоты используют многостадийный химический синтез, в который наряду с тонкими химическими реакциями встроена и технологически необходимая биосинтетическая реакция, что является одним из примеров успешного сочетания органического синтеза с биосинтезом.

При проведении технологического этапа биосинтеза на производстве применяют определенные микроорганизмы, осуществляющие биосинтетические реакции. Не менее важными являются оптимизация условий ферментации и контроль за количеством биомассы микроорганизмов в ферментационном аппарате.

Проанализируйте ситуацию с точки зрения:

- химической реакции биотрансформации, определяющей проведение биосинтеза и получение ожидаемого результата при осуществлении биотрансформации;
- выбора микроорганизмов для биоконверсии и оптимального подбора компонентов питательной среды (источников углерода, азота и фосфора);
- возможности увеличения выхода целевого продукта.

Задача 2.

При получении штаммов суперпродуцентов аминокислот, таких, как треонина или лизина, используют микроорганизмы *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Bacillus subtilis*. В одном случае биосинтез аминокислоты идет одновременно с ростом биомассы (путь получения аминокислоты одностадийный), в другом случае сначала идет рост биомассы и только потом синтез аминокислоты (путь двухстадийный).

В данной ситуации получения аминокислот обоснуйте: - преимущества биосинтеза перед органическим синтезом и подбор соответствующих микроорганизмов для получения штаммов-продуцентов, способных к сверхсинтезу нужной аминокислоты, если конечным продуктом будет лизин или треонин:

- выбор пути биосинтеза для лизина или треонина и особенности питательных сред;
- условия ферментации (подготовительная стадия и биосинтез).

Задача 3.

Как известно, производство витамина В₁₂ (кобаламин*) является чисто биотехнологическим способом его получения, когда в качестве продуцента данного витамина используют пропионовые бактерии из рода *Propionibacterium*, выращиваемые на богатой среде в определенных условиях ферментации с обязательным добавлением предшественника витамина В₁₂ - 5, 6-диметилбензимидазола.

В этой ситуации:

- сделайте оптимальный выбор метода ферментации и условий ее проведения;
- докажете необходимость добавления 5,6-диметилбензимидазола в определенное время после начала ферментации и предупредите образование коферментной формы витамина В₁₂;
- предложите методы выделения и очистки данного витамина, учитывая место его накопления.

Задача 4.

Применение иммобилизованных ферментов и белков в медицине открывает новые возможности создания эффективных ЛС.

Продемонстрируйте возможности и достоинства гидролаз при модификации таких широко применяемых антибиотиков, как пенициллины и цефалоспорины на основании:

- уникальных свойств гидролитических ферментов и определенных изменений в структуре данных антибиотиков, связанных с получением более эффективных аналогов;
- сравнения химического пути трансформации с биокаталитической технологией;
- производственных результатов получения этих антибиотиков
- как целевых продуктов.

Задача 5.

Несмотря на то что в основе современной инженерной энзимологии лежит применение ферментов и ферментных систем, технологическое использование ферментов имеет вполне конкретные ограничения: лабильность ферментов, дороговизна и большая трудоемкость при их очистке, однократность их использования,

в ряде случаев наличие коферментов.

Проанализируйте ситуацию с обоснованием:

- путей преодоления этих ограничений;
- сопоставления функции биообъекта с технологической операцией;
- понятия «система, открытая для усложнения».

Задача 6.

Витамины как группа незаменимых органических соединений различной химической природы необходимы любому организму в небольших концентрациях с целью выполнения в нем каталитических и регуляторных функций. С помощью биотехнологии сегодня можно получать в необходимых количествах такие витамины, как В2, В12, р-каротин*, витамин РР, эргостерин, аскорбиновую кислоту.

Проведите сравнительный анализ получения вышеуказанных витаминов с помощью биотехнологии, принимая во внимание:

- биообъекты, которые используют в каждом конкретном случае;
- получение суперпродуцентов рибофлавина и витамина В2,
- преимущества биотехнологического производства витаминов.

Задача 7.

Аминокислоты известны как составные элементы белков. Биологически активными являются только L-стереоизомеры аминокислот. Чистые L-аминокислоты находят свое применение в медицине в качестве или самостоятельных лечебных препаратов (L-метионин), или в составе смесей для парентерального питания, и в фармацевтической промышленности при синтезе различных ЛС. Используют их и как добавки при коррекции питания. Аминокислоты получают различными способами: биологическим, химическим, химико-энзиматическим, микробиологическим. В настоящее время аминокислоты как ЛС завоевали себе определенный и довольно значительный сегмент от общего объема фармацевтической продукции.

С учетом представленной информации проведите сравнительный анализ:

- предложенных методов получения аминокислот на конкретных производствах;
- выбора микроорганизмов-биообъектов для создания штаммов-суперпродуцентов;
- особенностей подбора питательных сред с учетом ферментативной регуляции биосинтеза на клеточном уровне.

Эталоны ответов:

Задача 1.

Синтез аскорбиновой кислоты по А. Грюсснеру и М. Рейхшейну с 1934 г. представляет собой многостадийный и преимущественно химический процесс, в котором имеется лишь одна стадия биотрансформации D-сорбита в L-сорбозу с участием уксуснокислых бактерий как классический пример микробиологического производства. Для получения сорбозы культуру продуцента *Gluconobacter oxydans* выращивают в ферментерах периодического действия, оснащенных мешалками и барботерами для усиления аэрации в течение 20-40 ч. Выход сорбозы достигает 98% от исходного сорбита. Питательные среды содержат кукурузный или дрожжевой экстракт (20% от общего количества). По окончании производственного цикла сорбозу выделяют из культуральной жидкости.

Совершенствование этой стадии в части повышения выхода целевого продукта при переходе от периодического культивирования продуцента *Gluconobacter oxydans* к непрерывному в аппарате колонного типа позволило увеличить скорость образования сорбозы в 1,7 раза.

Также можно привести пример получения 2-кето-β-гулоновой кислоты (промежуточный продукт синтеза витамина С), которая легко превращается в аскорбиновую кислоту. Это метод двух-стадийного микробиологического синтеза, включающий окисление D-глюкозы в 2, 5-дикето-О-глюконовую кислоту с дальнейшей биотрансформацией в 2-кето-β-гулоновую кислоту. Наиболее продуктивными микроорганизмами, осуществляющими эту реакцию, являются представители родов *Acetobacter*, *Erwinia*, *Gluconobacter*, в частности мутантный штамм *Erwinia punctata*, который обеспечивает выход до 94,5% 2, 5-дикето-О-глюконовой кислоты от общего количества исходной глюкозы.

Задача 2.

Современными методами тонкого органического синтеза можно синтезировать D и L-формы аминокислот в любых количествах, но все существующие способы их производства приводят к образованию рацематов. Таким путем можно получать рацематы лизина, глутаминовой кислоты, триптофана и других аминокислот. Вместе с тем химический синтез невозможен без достаточно большого количества агрессивных и токсичных веществ, что требует проведения дополнительных организационных мероприятий и финансовых затрат для их утилизации. Кроме того, подобные соединения небезопасны для персонала. Получение 100% биологически активной L-формы аминокислот методом органического синтеза - процесс очень сложный и экономически оправдан лишь в редких случаях.

Альтернативой химическому синтезу служит микробиологический процесс, при котором специально подобранные селекционные или сконструированные методами геной инженерии штаммы-продуценты способны осуществлять сверхсинтез аминокислот, например L-лизина, L-глутаминовой кислоты, L-триптофана, L-треонина в значительных количествах, что является определяющим фактором при выборе технологии

производства аминокислот в промышленном масштабе. Однако при биосинтетическом получении в фармацевтической промышленности товарных форм L-аминокислот для кормового, пищевого или медицинского применения необходимо также использование тонкого органического синтеза на стадиях выделения, концентрирования и очистки субстанций аминокислот.

Микробиологическое промышленное производство L-аминокислот можно осуществлять по двум технологическим схемам.

Двухступенчатый способ предполагает образование и подготовку предшественника, а также биосинтез ферментного препарата микробного происхождения, который будет трансформировать предшественник в целевую аминокислоту. Это первая ступень. Вторая ступень - собственно процесс трансформации полученного на 1 стадии предшественника в аминокислоту с помощью ферментных систем микроорганизмов. Таким путем получают, в частности, L-лизин.

Одноступенчатый способ синтеза аминокислот с помощью микроорганизмов основан на культивировании строго определенного штамма-продуцента целевой аминокислоты на среде определенного состава при соответствующих параметрах ферментационного процесса.

Промышленный штамм должен обладать способностью к сверхсинтезу нужной аминокислоты. Для этой цели выбирают полиауксотрофные мутанты, т.е. те клетки микроорганизмов, которые, с одной стороны, утратили способность самостоятельно синтезировать необходимые для роста и развития клетки различные аминокислоты, а с другой - приобрели способность к сверхсинтезу целевой аминокислоты.

Микроорганизмы осуществляют контроль биосинтеза каждой аминокислоты по принципу обратной связи как на уровне генов, ответственных за синтез соответствующих ферментов (репрессия), так и на уровне самих ферментов, способных при избытке аминокислоты изменять свою активность (ретроингибирование), что совершенно исключает перепроизводство аминокислоты клеткой в природных условиях. Из этого следует, что целью биотехнолога является нарушение этих систем регуляции с дальнейшим отбором ауксотрофных мутантов на селективных средах с использованием мутагенов (УФ, рентгеновские лучи, нитрозосоединения и др.). Такие мутанты имеют в геноме дефектный ген, детерминирующий фермент, без которого не может осуществляться биосинтез определенной аминокислоты. Важно, что получение ауксотрофных мутантов-продуцентов аминокислоты возможно только для микроорганизмов с разветвленной цепью биосинтеза, т.е. по крайней мере две аминокислоты должны синтезироваться из одного предшественника. У таких ауксотрофных мутантов избыток одной аминокислоты при дефиците другой не приводит к подавлению активности первого фермента. Однако аминокислота, биосинтез которой нарушен, должна быть добавлена в ограниченном количестве (при синтезе лизина добавляется гомосерин или треонин на 1-й стадии). Продуцент лизина - *Corynebacterium glutamicum* (коринебактерии) - имеет единственную р-аспартакиназу (фермент), активность которой регулируется путем согласованного ингибирования по принципу обратной связи. Этот мутантный штамм-продуцент является ауксотрофом по гомосерину и треонину. Для длительной работы ауксотрофных штаммов-продуцентов лизина в питательную среду вносят белковые гидролизаты в режиме дробной подачи (комплекс аминокислот).

Для получения L-треонина используют промышленный мутантный штамм *K. coli* (энтеробактерии), где система регуляции биосинтеза аминокислоты основана на принципе дифференциальной регуляции изоферментами. Этот штамм - тройной ауксотроф. У него изменен 1 фермент цепи биосинтеза (нечувствительный к треонину), отсутствуют механизмы репрессии («хроническое голодание» по изолейцину), при помощи методов генной инженерии треониновые гены размножены на плазидах, что значительно увеличило продуктивность штамма.

При получении аминокислоты методами прямого микробиологического синтеза применяют полупериодическую ферментацию (регулируемую) с хорошей аэрацией (барботер) и перемешиванием (мешалка).

Задача 3.

В настоящее время промышленное производство витамина B12 осуществляют исключительно биотехнологическими методами. Продуцентом витамина B12 являются пропиононовые бактерии из рода *Propionibacterium*. Добавление в среду предшественника витамина B₂ - 5, 6-диметилбензимидазола - резко повышает продуктивность продуцента. Повышению продуктивности также способствует и добавка в питательные среды кукурузного и мясного экстракта, соевой муки, рыбной муки. Выращивание пропиононовых бактерий производят периодическим методом в анаэробных условиях на среде с кукурузным экстрактом, глюкозой, солями кобальта и сульфатом аммония. Образующиеся в процессе жизнедеятельности бактерий кислоты нейтрализуются щелочью. Через 72 ч после начала ферментации вносят предшественник - 5,6-диметилбензи-мидазол. Длительность ферментации составляет около 3 сут. Если не добавить 5,6-диметилбензимидазола, то вместо витамина B₂ синтезируется фактор В (кобинамид), и не обладающий терапевтическим действием псевдовитамин B12, у которого азотистым основанием служит аденин.

Поскольку витамин B12 сохраняется в клетках бактерий, биомассу отделяют сепарированием и извлекают из нее целевой продукт с помощью экстракции подкисленной водой (рН от 4,5 до 5,0) при температуре 85-90 °С в течение часа. Витамин B12 является водорастворимым витамином. Именно поэтому водный раствор стабилизируют NaNO₂, получая коферментную форму витамина, которую очищают на ионообменной смоле. Затем следует кристаллизация витамина из водно-ацетонового раствора, химическая очистка и изготовление лекарственных форм из полученного продукта.

Задача 4.

В отличие от химической трансформации биокатализ обладает уникальной специфичностью и избирательностью действия ферментов, возможностью проведения процесса в «мягких» условиях, высокой скоростью, использованием малых количеств катализаторов, практически полным отсутствием побочных реакций, что является несомненным преимуществом при создании лекарственных препаратов (антибиотики, стероиды, простагландины и т.д.). Гидролитические ферменты (гидролазы) нашли наибольшее применение в практике по следующим причинам:

- гидролитические реакции в водной среде, как правило, полностью термодинамически сдвинуты в сторону образования продуктов;
- кинетика реакций ферментативного гидролиза легко поддается количественному описанию до глубоких степеней превращения;
- гидролазы - наиболее изученные и наиболее легко управляемые ферменты;
- существует возможность оптимизации процессов по двум параметрам - концентрации расщепляемого субстрата и активности фермента;
- гидролазы избирательны по типу катализируемой реакции, проявляют широкую субстратную специфичность;
- гидролазы доступны в необходимых количествах (микроорганизмы содержат значительные количества различных гидролаз).

Возможности гидролаз можно представить при модификации пенициллинов и цефалоспоринов. Получение новых, более эффективных аналогов пенициллинов и цефалоспоринов связано с изменением боковой цепи при сохранении ядра антибиотика - 6-АПК или 7-АЦК как ключевых соединений для синтеза новых пенициллинов и цефалоспоринов. Например, после отщепления боковой цепи биосинтетического пенициллина и последующего ацилирования ее аминогруппы можно сравнительно легко получать его «полусинтетические» аналоги. Отщепление боковой цепи и превращение в 6-АПК с помощью фермента пенициллинамидазы можно провести в одну стадию при обычных условиях и температуре 10-40 °С в водной среде, избегая многостадийности, энергоемкости и больших объемов органических растворителей при химической трансформации, расщепив при этом более устойчивую амидную связь и сохранив более лабильную связь в β-лактамном кольце пенициллина.

Таким образом, переход к биокаталитической технологии существенно упрощает процесс, увеличивает выход целевого продукта и объем производства, стабилизирует процесс, делает его экологичным и снижает себестоимость. При получении новых полусинтетических цефалоспоринов также используют пенициллинамидазу, которая сохраняет целостность лабильного β-лактамного кольца.

Задача 5.

Сравнительно недавно (несколько десятков лет назад) четко определились пути преодоления вышеуказанных трудностей. Эти пути связаны с получением иммобилизованных ферментов из клеток микроорганизмов. Сама иммобилизация представляет собой физическое разделение биообъекта (клетка, фермент) и растворителя, т.е. биообъект закреплен на нерастворимом носителе, а субстрат и продукты метаболизма свободно обмениваются между биообъектом и растворителем. Биообъект в этом случае работает многократно (недели, месяцы). Иными словами, иммобилизация ферментов - это перевод их в нерастворимое состояние с частичным или полным сохранением каталитической активности.

При совершенствовании биотехнологического процесса обычно используют следующие методы иммобилизации ферментов:

- ковалентное присоединение молекул ферментов к водонерастворимому носителю (природные полимеры - целлюлоза, хитин, агароза; синтетические - поливинилхлорид, полиакриламид и др.);
- захват фермента в сетку геля или полимера;
- ковалентная сшивка молекул фермента друг с другом или с инертными белками;
- адсорбция фермента на водонерастворимом носителе (часто на ионитах);
- микрокапсулирование.

В результате иммобилизации ферменты получают преимущества гетерогенных катализаторов: их можно удалять из реакционной смеси и отделять от субстрата и продуктов ферментативной реакции простой фильтрацией. Кроме того, появляется возможность перевода многих периодических ферментативных процессов на непрерывный режим с использованием проточных аппаратов или колонн с иммобилизованными ферментами.

Что касается широко используемой иммобилизации целых клеток, то ее проводят аналогично, предотвращая размножение клеток, увеличивая их сохранность и срок работы в качестве катализатора. Примеры носителей органической природы: желатин, фибрин, альги-нат натрия, целлюлоза, ПААГ. Неорганические: термический песок, активированный уголь, окись алюминия, бентонит. Носитель не должен быть токсичным для биообъекта. Ограничения использования иммобилизации возможны в 2 случаях: если целевой продукт не выходит в среду и если у фермента есть непрочно с ним связанный кофермент, без которого этот фермент не работает.

Каждый из методов иммобилизации имеет свои ограничения, связанные с недостаточной прочностью получаемых связей. Особенно это касается микрокапсулирования (инкапсулирования). Ячейки геля не должны быть слишком маленькими (иначе возникнут трудности контакта фермента с субстратом и недостаточная

аэрация). Однако и слишком большого размера ячейки геля быть не должны. В этом случае связь с гелем образуется слабая, и биообъект может вымываться.

Функции биообъекта связаны с технологической операцией определенным образом. Так, например, очищенный фермент, фермент в клетке с коферментом, фермент в пермеабиллизированной клетке выполняют только отдельную реакцию: одноступенчатую трансформацию. Интактная клетка (клетка-производитель) осуществляет полный биосинтез целевого продукта посредством цепочки реакций.

Система, открытая для усложнения, - это клетка-производитель какого-либо предшественника целевого продукта + первый фермент + второй фермент + третий фермент и т.д., т.е. биосинтез предпродукта и его биотрансформация осуществляются в одном биореакторе. Таким путем можно, в частности, одновременно получать 6-АПК, ампициллин и т.д.

Задача 6.

С помощью биотехнологии производство витаминов стало не только высокорентабельным (не требует дорогостоящего оборудования), но и экологичным (без агрессивных сред) и безвредным

для работающего персонала. Известно, что высокой биологической активностью часто обладают не сами витамины, а их производные - коферменты. Например, для рибофлавина характерно функционирование в двух коэнзимных формах: флавиномононуклеотида и флавинадениндинуклеотида. Активным производителем рибофлавина является культура дрожжеподобного гриба *Eremothecium ashbyii* и *Ashbya gossypii*. Сверхсинтез рибофлавина достигают при использовании мутагенов для нарушения механизма ретроингибирования у производителей. Одновременно для активного биосинтеза целевого продукта в питательную среду вносят соевую муку или кукурузный экстракт, сахарозу, карбонат кальция, хлорид натрия, витамины. Кроме того, методами генной инженерии получен рекомбинантный штамм-производитель (*Bacillus subtilis*) с повышенной устойчивостью к экзогенной контаминации.

Производителем витамина В12* являются пропионовые бактерии, продуктивность которых резко повышается при добавлении в среду предшественника витамина В12* - 5, 6-диметилбензинимидазола - и использовании мутантных штаммов. Если 5,6-диметилбензинимидазол не добавлять, то вместо витамина В12* синтезируется фактор В (кобинамид) и псевдовитамин В12, которые не обладают терапевтическим эффектом.

Производителем кофермента НАД являются пекарские дрожжи. Выход НАД значительно увеличивается при добавлении в среду предшественников (аденина и никотинамида). Кроме того, можно повысить проницаемость мембран, обрабатывая клетки микроорганизмов ПАВ (поверхностно-активными веществами), например цетилсульфатом натрия и др.

При производстве аскорбиновой кислоты используют биотрансформацию D-сорбита в L-сорбозу уксуснокислыми бактериями.

В качестве промышленного источника эргостерина*7 применяют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.

Получение (β-каротина* возможно микробиологическими методами, однако при этом нужно использовать дорогие среды сложного состава, поэтому более рентабельным является химический синтез.

Преимущества использования биотехнологических методов при производстве витаминов:

- возможность селекции высокоактивных штаммов с применением генной инженерии;
- высокий уровень ферментации;
- применение иммобилизации клеток;
- утилизация отходов, снижение себестоимости и экологичность.

Задача 7.

При получении аминокислот применяют различные методы.

- Биологический метод (гидролиз белоксодержащих субстратов) наиболее дешевый. Однако существуют ограничения по стандартизации и по источникам сырья. Также из-за проблемы чистоты препаратов необходима многоступенчатая химическая очистка с частичным разрушением целевых продуктов (триптофан, треонин, серин, цистеин и др.).
- Химический синтез: образуется смесь D и L-изомеров, тогда как биологически активными являются только L-изомеры аминокислот. Такое производство дорого, небезопасно и неэкологично.
- Тем не менее производство аминокислоты (глицина) и метионина данным методом рентабельно (в первом случае из-за отсутствия изомеров, во втором - вследствие равной терапевтической активности изомеров).
- Химико-энзиматический метод проводят в 2 этапа. Сначала химически синтезируют предшественник аминокислоты, например карбоновую кислоту, а затем осуществляют биотрансформацию предшественника ферментами живых клеток. Таким путем можно получать, например, аспарагиновую кислоту на основе фумаровой или фенилаланин на основе коричной кислоты. Однако способ дорогой и сложный.
- Микробиологический метод. Обязательным условием возможности его использования является наличие штаммов-суперпроизводителей аминокислот. В качестве модельных микроорганизмов применяют некоторые штаммы *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*.

Критерии отбора биообъектов для создания промышленных штаммов. Прежде всего получение аутокотрофных мутантов, что предполагает использование только тех микроорганизмов, которые имеют разветвленный путь биосинтеза по крайней мере двух аминокислот, образующихся из одного предшественника.

Их биосинтез контролируется на уровне первого фермента общего участка согласованным ингибированием конечными продуктами (ретроингибирование). Кроме того, в селекции продуцентов аминокислот активно применяют методы генной инженерии. Например, при вставке генов треонина в плазмиды для их клонирования значительно повышается количество ферментов, ответственных за биосинтез соответствующей аминокислоты. Особенностью питательных сред является добавление в ограниченном количестве той аминокислоты, биосинтез которой блокирован в результате мутагенного воздействия.

Таким методом получают, в частности, глутаминовую кислоту, лизин, треонин.

Раздел 4. Антибиотики.

Тема 4.2 Антибиотики как биотехнологические продукты. Продуценты антибиотиков. Методы скрининга продуцентов. Получение антибиотиков на основе плесневых грибов, актиномицетов, бактерий.

Задача 1.

В настоящее время существует международная программа системы поиска и отбора антимикробных агентов, подавляющих размножение патогена только в инфицированном организме, т.е. система, позволяющая клонировать гены, которые не экспрессируются в искусственных условиях (*in vitro*). Данная система подразумевает использование определенных методов, реактивов (наборы для клонирования, рестриктазы), тест-объектов и решает такие задачи, как:

- выделение и очистка ДНК (электрофорез);
- культивирование патогенов, например *Salmonella typhimurium*;
- создание вектора на основе плазмиды, несущей беспромоторные гены хлорамфеникол-ацетилтрансферазы и лактозного оперона;
- заражение лабораторных животных (мыши);
- высеивание патогенов из животных объектов.

Расположите последовательно этапы данной системы скрининга антимикробных агентов, учитывая применение:

- генно-инженерных методов при получении набора различных плазмид;
- набора различных штаммов *E. coli* с разными частями генома сальмонеллы;
- индикаторной среды для отбора нужных колоний.

Прокомментируйте результаты и возможности применения данной системы при поиске антимикробных агентов, используемых в качестве ЛС.

Задача 2.

Одна из инфекционных клиник закупила партии пенициллина и стрептомицина. Через некоторое время в аптеку пришли представители клиники с жалобой на отсутствие терапевтического эффекта почти у всех больных клиники. После проверки в лаборатории было установлено, что препараты не фальсифицированы и соответствуют качеству стандартной продукции.

Проанализируйте данную ситуацию с точки зрения:

- возможных механизмов антибиотикорезистентности у микроорганизмов и генетических аспектов явления «инфекционной резистентности» или «госпитальной инфекции»;
- возможных механизмов индукции β -лактамаз (PBPs-2 и PBPs-3) и их ингибирования;
- разрешения данной ситуации.

Задача 3.

Развитие резистентности сегодня является настолько серьезной проблемой лекарственной терапии, что грозит вернуть человечество к «доантибиотической зре». Особенно опасна в этом смысле плазмидная резистентность. Известно, что плазида как внехромосомный Фактор наследственности способна самостоятельно ассимилироваться в клетке независимо от процесса ее деления. Плазида - носитель генов информации (всего около 30 генов). Плазмиды могут содержать гены резистентности к различным антибиотикам, которые легко передаются из клетки в клетку при конъюгации. Гены β -лактамаз, особенно цефалоспоринов, могут локализоваться также и в бактериальной хромосоме. Резистентность может существовать и за счет генов клетки, делающих мембрану непроницаемой для антибиотиков. В свете обозначенной проблемы представьте:

- схему развития плазмидной резистентности и первоисточник генов резистентности;
- способы преодоления резистентности;
- различие хромосомной и плазмидной локализации структурных генов β -лактамаз;
- роль конъюгативных транспозонов в проявлении резистентности и возникновении госпитальной инфекции.

Задача 4.

Как известно, под названием «антибиотики» объединены вещества, образуемые одними микроорганизмами для подавления роста других микроорганизмов. Однако антибиотики можно рассматривать или классифицировать и по технологии их получения, и по терапевтическому эффекту в отношении конкретных заболеваний. Кроме того, антибиотики в какой-то мере сопоставимы с антисептиками.

Проанализируйте варианты подхода к определению и классификации антибиотиков, подтвердите конкретными примерами; представьте также:

- варианты скрининга антибиотиков;
- методы определения антимикробной активности антибиотиков;
- сравнение с антисептиками (использование, достигаемые цели, механизм действия).

Задача 5.

Актиномицеты являются продуцентами огромного количества антибиотиков. Ряд представителей родов *Streptomyces* и *Micromonospora* образуют антибиотики аминогликозидной структуры. Кроме природных аминогликозидов, в медицинской практике используют также синтетические аминогликозидные антибиотики.

Проанализируйте аминогликозидные антибиотики, исходя из:

- их сравнительной характеристики в соответствии со структурой, биологической активностью и практическим применением;
- отличия актиномицетов от бактерий и грибов;
- механизма действия, выделяя при этом наиболее токсичные структуры.

Задача 6.

Весьма существенную роль для продвижения антибиотика в первую очередь играет возможность проведения сравнительной идентификации антибиотика на начальных этапах исследования в части их функциональной активности как антибактериальных ЛС. В условиях поставленной задачи предложите:

- методы и варианты проведения сравнительной идентификации, оценку антимикробной активности антибиотика;
- способы выделения антибиотика из культуральной жидкости;
- проведение количественной оценки.

Эталоны ответов:

Задача 1.

У патогенных микроорганизмов открыты гены, имеющие значение для инфекционного процесса, но несущественные при росте *in vitro*. В последнем случае эти гены не поддаются идентификации для их дальнейшего использования в качестве мишеней при поиске новых ЛС. Так называемые молчащие *in vitro* гены патогенных микроорганизмов получили название «w-генов» (генов вирулентности). Однако в случае дефицита каких-либо из жизненно необходимых клетке веществ возможно преобразование данных генов из молчащих («несущественных») в «существенные». Подавление их функций антимикробными агентами приводит к подавлению роста (размножения) патогена именно в условиях *in vivo*, т.е. в инфицированном организме. Именно поэтому поиск и идентификация генов вирулентности являются конечной целью исследователей, создающих новые антимикробные лекарственные препараты.

В качестве примера такой работы можно привести метод IVET (*in vivo* expression technology).

Суть метода. Геном патогенной бактерии (*Salmonella typhimurium*) с помощью рестриктаз делят на сотни фрагментов, кратных 1, 2, 3 и т.д.

Каждый отдельный фрагмент генно-инженерными методами соединяют с лишенным промотора геном хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (*cat*). Такой ген без промотора не может реплицироваться при его введении в клетку. Однако он смог бы реплицироваться, если соединенный с ним ген (фрагмент ДНК сальмонеллы) имел бы промотор для своей собственной репликации. Тогда этот промотор вызвал бы репликацию не только своего гена, но и репликацию следующего за ним гена (без промотора). Таким образом, репликация гена хлорамфеникол-ацетилтрансферазы может происходить благодаря использованию или «захвату» чужого промотора. Полученный фрагмент является двояким (*x-cat*, где *x* - фрагмент генома сальмонеллы, а *cat* - ген хлорамфеникол-ацетилтрансферазы).

- К этому двоякому фрагменту присоединяют лактозный оперон, также лишенный промотора (*lac Z*). Данный оперон необходим для системы окисления лактозы. На этом этапе генные инженеры получают фрагмент, состоящий уже из 3 частей: *x-cat-lac Z*.
- Полученный фрагмент (*x-cat-lac Z*) включают в плазмиду. результате всех манипуляций у генного инженера имеется набор плазмид, отличающихся только по фрагменту *x*.
- Эти плазмиды с разными частями генома сальмонеллы вводят в клетку *K. coli*.
- Далее следует внедрение клеток *E. coli* в организм лабораторного животного (мыши) с одновременным введением ему (ей) хлорамфеникола.
- Через сутки из ткани животного на твердую индикаторную среду с лактозой высевают бактериальную культуру, из которой вырастают колонии красного и белого цвета: колонии красного цвета (окисляющие лактозу и меняющие pH) составляют 90%, а белого (бесцветные) 10%.
- Затем колонии анализируют.

Ход рассуждений следующий: если колония на индикаторной среде с лактозой выросла бесцветной, значит, на искусственной питательной среде данный промотор не работал, и ген во фрагментах «*x*» не экспрессировался. Вероятно, он нужен только при развитии инфекционного процесса и принадлежит к генам ш (генам вирулентности). В случае колоний красного цвета экспрессируется ген, кодирующий образование фермента, расщепляющего лактозу, в результате цвет индикатора изменяется, вызывая окрашивание колоний в красный цвет.

Таким путем из клеток *Salmonella typhimurium* было выделено около 100 ш-генов, из которых 50 были

абсолютно новыми (не описанными ранее). Они представляли интерес как потенциальные мишени для отбора антимикробных агентов.

Задача 2.

Причины появления изоферментов с β -лактамазной активностью в том, что микробная клетка защищает себя от антибиотика за счет мутаций в гене, кодирующей последовательности аминокислот в ферменте-мишени, т.е. в «структурном» гене. Происходит расщепление β -лактамного кольца, и антибиотик теряет свою активность. Особенно опасны плазмидные (внехромосомные) мутации. Плазмиды - генетические элементы микробной клетки, представляющие собой кольцевые молекулы ДНК размером в сотни раз меньшим, чем размер хромосомы. Опасность плазмидной резистентности в генетическом плане выражается в том, что плазмиды передаются из клетки в клетку путем конъюгации (аналог полового процесса), т.е. без деления клетки, однако плазида при этом реплицируется. Таким образом, одна клетка может очень быстро передать резистентность огромному количеству клеток. Этому активно способствует и то, что некоторые типы плазмид существуют в клетке в виде нескольких единиц, а иногда и десятков копий (многокопийны). Возник даже термин «инфекционная резистентность» - «заражение резистентностью» одних клеток от других. Особенно часто плазмидная локализация генов резистентности встречается при ферментативной инактивации антибиотиков. Иногда в одной плазмиде оказываются локализованы несколько генов, кодирующих ферменты, воздействующие на антибиотики разных групп. Отсюда возникло понятие полирезистентности микроорганизмов. Такие полирезистентные штаммы возбудителей инфекции представляют серьезную проблему в инфекционной клинике, вызывая так называемую госпитальную инфекцию, когда к тем антибиотикам, которые используют в инфекционной клинике на тот момент, возникает устойчивая резистентность возбудителей различных инфекционных заболеваний, и соответственно антибиотик теряет свою активность.

На лечебных (терапевтических) свойствах β -лактамов отражается степень сродства различных β -лактамов к разным транспептидазам, получившим название «пенициллинсвязывающие белки» (Penicillin binding proteins): PBP-1, PBP-2, PBP-3 и т.д. В этом неодинаковом (различном) средстве заложен сам антибиотический эффект, его продолжительность, переносимость определенными категориями больных.

Так, если в рекомендациях по применению присутствует информация о том, что новый антибиотик связывается с PBP-2, то это означает, что клетка микроорганизма будет активно лизироваться, и освобождающиеся полисахариды в большом количестве начнут поступать в кровь, вызывая у больного кратковременный пирогенный эффект. Такие антибиотики рекомендуют больным с невысоким уровнем иммунитета (например, больным СПИДом). Если есть информация о связывании с PBP-3, то это означает, что в результате действия такого антибиотика бактериальная клетка только перестает делиться, оставаясь живой, и при отмене антибиотика начинает свое деление с большей активностью и опасностью возникновения новой инфекции. Такие антибиотики можно рекомендовать только больным с сильным иммунитетом. Разрешение данной ситуации заключается в том, что информационные материалы по механизму действия антибиотика обязательно должны принимать во внимание лечащие врачи и фармацевты.

Задача 3.

Формирование в бактериальной клетке защитных механизмов и обусловило возникновение «генов резистентности» как в хромосоме, так и в плазмиде. Плазмиды с генами резистентности к антибиотикам получили название R-плазмид (старый термин - R-факторы). Конъюгация и репликация плазмид в большом количестве клеток с учетом их многокопийности делают возможным развитие «инфекционной резистентности», т.е. «заражения резистентностью» одних клеток другими. Причина появления изоферментов с β -лактамазной активностью состоит в том, что микробная клетка защищает себя от антибиотика за счет мутаций в гене, кодирующей последовательности аминокислот в ферменте-мишени, другими словами, в структурном гене этого фермента. Происходит расщепление β -лактамного кольца, и антибиотик теряет свою активность.

Мутировавшие хромосомные гены также могут оказаться в плаزمиде и быть переданы в другие клетки, но в этом случае переноса резистентности не будет, так как свои хромосомные гены, преобладая над чужими (плазмидными), обеспечивают антибиотикочувствительность и не дают развиваться антибиотикорезистентности. Большую роль в процессе антибиотикорезистентности играют транспозоны как генетические элементы ДНК, способные к самостоятельному перемещению не только в пределах одного репликаона, но и вне его. При этом они могут нести на себе детерминанты устойчивости к антибиотикам, например к канамицину, хлорамфениколу, тетрациклину, эритромицину. Экспрессия генов такого транспозона приводит к лекарственной устойчивости. Иногда в одной плазмиде локализуются несколько генов, кодирующих ферменты, воздействующие на антибиотики разных групп. На основании этого факта возникло понятие полирезистентности микроорганизмов.

Полирезистентные штаммы возбудителей инфекций представляют серьезную проблему в инфекционной клинике, вызывая так называемую госпитальную инфекцию, когда возникает устойчивая резистентность со стороны возбудителей различных инфекционных заболеваний к используемым антибиотикам, и антибиотики теряют свою активность.

Задача 4.

Скрининг (поиск и отбор) продуцентов антибиотиков может быть ненаправленным (первичным), когда отбирают наиболее активные микроорганизмы-продуценты по способности продуцировать антибиотики или другие БАВ. Направленный скрининг - поиск и отбор продуцентов антибиотиков определенного химического строения или с определенным механизмом антагонистического действия.

Схема скрининга:

- приготовление стерильных питательных сред;
- приготовление почвенной суспензии;
- посев на агаризованную среду;
- выделение микроорганизмов-продуцентов антибиотиков в виде чистых культур;
- хранение микроорганизмов-продуцентов и оценка их способности продуцировать антибиотики.

Образцы почв с большим разведением высевают на твердые питательные среды в чашках Петри, чтобы получить фактически из одной клетки штамм почвенных микроорганизмов (штамм - это культура, выросшая из одной клетки). Далее определяют физиологические параметры штамма, его антибиотическую активность, которую оценивают по зоне отсутствия роста на твердых питательных средах тех или иных бактерий вокруг посеянного штриховым способом изучаемого штамма, или по зоне отсутствия роста вокруг лунки в агаре, или же вокруг впаянного в агар металлического цилиндра (без дна), заполненного культуральной жидкостью исследуемого штамма. Существует два варианта определения антибиотической активности на основе метода диффузии в агар с последующим сравнением размеров зон угнетения роста тест-организмов, образующихся при испытании растворов стандартного образца и испытуемого препарата:

- трехдозный, когда для проведения анализа готовят по три концентрации растворов стандартного и испытуемого образцов;
- однодозный с использованием стандартной кривой в полулогарифмической сетке. В чашках Петри с тест-организмом вырезают лунки диаметром 8 мм или ставят цилиндрики, в которые вносят пипетками опытные растворы и стандартные образцы в объеме 0,05 мл; чашки термостатируют 18 ч при 37 °С. Расчет активности производят в соответствии с ГФ (издание XI, вып. 2, 1990 г., с. 210).

При сравнении антибиотиков с антисептиками прежде всего необходимо отметить избирательность действия первых на метаболизм (из нескольких тысяч реакций они подавляют одну или несколько). Кроме того, антибиотики высокоактивны и угнетают рост микроорганизмов в концентрации порядка 1 мкг/мл или меньше.

Задача 5.

Особенность актиномицетов заключается в том, что они в эволюционном отношении ближе к бактериям (прокариотам), чем к грибам, хотя являются многоклеточными организмами и имеют сложный цикл развития (5-6 сут). Однако их геном не заключен в ядро и представляет собой кольцевую хромосому, не отделенную от цитоплазмы ядерной мембраной; не содержат они и митохондрий. Клеточная стенка актиномицетов состоит из гетерополимера - пептидогликана.

В молекуле аминогликозидов обязательно присутствуют остаток шестичленного аминоклиптола и остатки Сахаров или аминсахаров. Ряд видов, относящихся к родам *Streptomyces* и *Micromonospora*,

образуют природные антибиотики: стрептомицин, гентамицин, неомицин, канамицин и др. с широким спектром антибактериального действия. Кроме природных, в клинической практике используют также и полусинтетические аминогликозидные антибиотики. Например, антибиотики тетрациклиновой структуры: хлор-, окси- и тетрациклин со структурой из 4 циклов различаются только по «верхней» части, нижняя часть структуры молекулы у них одинакова. Химическая модификация верхней части тетрациклиновой структуры позволила получить полусинтетические тетрациклины - доксициклин и миноциклин (первый с пролонгированным действием, второй - с более высокой антибактериальной активностью).

Молекула антибиотиков макролидной структуры содержит макроциклическое лактонное кольцо, соединенное с сахарами и/или аминсахарами. Природные - это эритромицин (*Streptomyces erythraeus*) и олеандомицин (*Streptomyces antibioticus*). Они эффективны только против грамположительных бактерий (антибиотики узкого спектра действия). Антибиотики сложной анзамициновой структуры (*Streptomyces mediterranei*) с нафталиновым ядром и длинной алифатической цепью, соединенной с ароматической частью эфирной и амидной связью, представлены полусинтетическим антибиотиком рифампицином (применяют при лечении туберкулеза). Представители рода *Streptomyces* (*Streptomyces novaezealandensis*) образуют полиеновые антибиотики (полиеновые макролиды). У них макроциклическое лактонное кольцо содержит ряд сопряженных двойных связей. К этим антибиотикам относятся нистатин (тетраен-диен) и амфотерицин В (гептаен). В их молекуле присутствуют также аминсахара. Это антигрибковые препараты, которые являются достаточно токсичными, и поэтому их используют в основном для наружного применения. Актиномицеты образуют и противоопухолевые антибиотики: блеомицин - гликопептид (*Streptomyces verticillius*). Антрациклины (дауномицин, адриаамицин) имеют структуру, сходную с тетрациклинами, но ни по спектру антибиотического действия, ни по применению в клинической практике они не похожи. Механизм действия аминогликозидов - ингибирование синтеза белка у бактерий посредством связи с малой рибосомной субъединицей. При этом нарушается правильность считывания кодонов иРНК антикодонами тРНК.

Задача 6.

Существуют два варианта определения антимикробной активности по методу диффузии в агар с последующим сравнением размеров зон угнетения роста тест-организмов при испытании растворов стандартного образца и испытуемого препарата.

Трехдозный, когда для проведения анализа готовят по три концентрации растворов стандартного и испытуемого образцов.

Однодозный с использованием стандартной кривой в полулогарифмической сетке. В чашках Петри с тест-организмом вырезают лунки диаметром 8 мм или ставят цилиндрики, в которые вносят пипетками опытные

растворы и стандартные образцы в объеме 0,05 мл. Чашки термостатируют при температуре 37 °С в течение 18 ч. Расчет антимикробной активности при использовании этих вариантов осуществляют в соответствии с Государственной фармакопеей.

Способы выделения антибиотика зависят от его локализации. Это может быть и культуральная жидкость, и мицелий или и то, и другое вместе.

Если антибиотик находится в мицелии, его стремятся перевести в водную фазу, меняя, к примеру, pH культуральной жидкости (например, в случае тетрациклинов).

Кроме того, можно объединить растворенный антибиотик в общем осадке, из которого его затем экстрагировать. Экстракцию применяют при очистке таких антибиотиков, как пенициллин, эритромицин. Один из примеров при экстракционном методе выделения и очистки извлечение пенициллина из бутилацетата, где он находится в виде свободной кислоты. При добавлении ацетата калия образуется калиевая соль пенициллина, кристаллы которого промывают бутанолом и высушивают.

Обработка культуральной жидкости включает различные способы коагуляции, флокуляции, так как она содержит не только антибиотик, но и мицелий продуцента, продукты его лизиса, ряд компонентов питательной среды: высоко- и низкомолекулярные органические вещества и неорганические соли.

Отделение нативного раствора от мицелия и коллоидных частиц осуществляют методами фильтрации и центрифугирования с использованием барабанных вакуум-фильтров, пресс-фильтров, сепараторов. В очистке антибиотиков широко применяют ионообменные смолы (катиониты и аниониты). Особое место занимают сорбционные методы при получении аминокликозидов в высокоочищенном виде (в частности, стрептомицина).

Помимо традиционных методов очистки антибиотиков существует также мембранная технология для разделения сложных смесей. Для количественной оценки используют практически все традиционные физико-химические методы анализа. Это титриметрические, оптические, хроматографические (особенно ВЭЖХ) методы. При обезвоживании препаратов антибиотиков используют либо лиофильную сушку (замороженного стерильного раствора, разлитого во флаконы в вакууме), либо распылительную сушку. Все серии лекарственных форм контролируют в соответствии с Государственной фармакопеей или соответствующими производственными регламентами с учетом требований международных фармакопеей.

Тема 4.5 Полусинтетические антибиотики. Биосинтез и оргсинтез в создании новых антибиотиков. Противоопухолевые антибиотики. Решение ситуационных задач.

Задача 1.

Определите оптимальные параметры ведения процесса биосинтеза противоопухолевого антибиотика рубомицина* на основе анализа табличных данных (табл. 16), охарактеризуйте процесс биосинтеза с точки зрения его результатов и применения данной ферментационной среды, т.е. является ли ее состав оптимальным в данном случае? Если нет, то что необходимо изменить?

Оборудование: аппарат «Chemar 1». Состав среды, %:

- крахмал картофельный - 6,5;
- соевая мука - 1,7;
- глюкоза - 1,5;
- (NH₄)₂SO₄ - 0,4;
- K₂HPO₄ - 0,01;
- CaCO₃ - 0,5;
- pH перед посевом - 7,1.

Таблица. Показатели ведения процесса в аппарате «Chemar 1» с использованием крахмальной среды

№ пробы	Часы роста	Биомасса, %	pH	Углеводы общие	Глюкоза	Азот	PO ₂	Активность, мкг/мл
1	0	-	7,1	6,55	1,56	86,8	65	50
2	11	5	6,9	6,22	1,56	86,8	60	175
3	35	10	6,9	5,98	0	84,0	57	277
4	59	38	6,5	5,36	-	81,2	52	306,6
5	83	32	7,0	4,31	-	53,2	43	297,3
6	107	30	8,2	4,31	-	89,6	43	146

Сделайте обобщающий вывод о наличии оптимальных изменений, позволяющий произвести максимальное количество антибиотика.

Задача 2.

Определите оптимальные параметры ведения процесса биосинтеза противоопухолевого антибиотика рубомицина* на основе анализа табличных данных (табл. 17) и охарактеризуйте этот процесс биосинтеза с точки зрения его результатов и применения данной ферментационной среды, т.е. является ли ее состав оптимальным в данном случае? Если нет, то что необходимо изменить?

Оборудование: аппарат «Chemar 2».

Состав среды, %:

- гороховая мука - 3;

- сахароза - 7;
- NaCl - 0,4;
- KCl - 0,04;
- K₂HPO₄ - 0,08;
- (NH₄)₂SO₄-0,4;
- CaCO₃ - 0,8;
- рН перед посевом - 7,41.

Таблица. Показатели ведения процесса в аппарате «Chemar 2» с использованием сахарозно-гороховой муки

№ пробы	Часы роста	РН	Биомасса, %	Углеводы общие	Глюкоза	Азот	Р0г	Активность, мкг/мл
1	0	7,15	0	5,57	0,88	114,8	65	50,7
2	11	7,07	5	5,54	-	112	30	160,6
3	35	6,7	25	4,0	-	81,2	22	335,8
4	59	6,75	25	3,41	-	28	20	552,8
5	83	6,75	25	2,32	-	8,4	20	685,8
6	107	6,6	25	0,9	-	1,02	25	823

Сделайте обобщающий вывод о наличии оптимальных изменений, позволяющий произвести максимальное количество антибиотика.

Задача 3.

Важнейшая группа антибиотиков, образуемых плесневыми грибами и объединенных под общим названием «(3-лактамы антибиотики)» (пенициллины и цефалоспорины), достаточно широко представлена на фармацевтическом рынке.

Проведите анализ β-лактамов антибиотиков с точки зрения:

- продуцентов, химической структуры и биологической активности;
- биологической роли антибиотиков для продуцентов и механизмов защиты продуцентов от антибиотиков;
- механизма биосинтеза и механизма действия на бактериальную клетку.

Задача 4.

Иногда в клиниках или больницах наблюдается явление внутри-больничной инфекции, когда успешно применяемые антибиотики перестают оказывать терапевтическое действие, вызывая явление антибиотикорезистентности.

В условиях этой проблемы:

- проанализируйте ситуацию, когда гены резистентности присутствуют у почвенных микроорганизмов-продуцентов антибиотиков и могут передаваться патогенным микроорганизмам;
- сравните хромосомную и плазмидную локализацию структурных генов β-лактамаз;
- предложите пути преодоления этой резистентности на примере β-лактамов и цефалоспоринов.

Задача 5.

В настоящее время существует проблема недостаточной эффективности хорошо зарекомендовавших себя ранее ЛС (это и β-лактамы препараты, и цефалоспорины I, II, III поколения) вследствие развития к ним антибиотикорезистентности. что в конечном счете приводит к необходимости постоянного поиска новых ЛС. Антибиотикорезистентность может возникнуть в результате изменения конформации внутриклеточной мишени, изменения проницаемости мембраны бактериальной клетки, ферментативной инактивации антибиотиков, активного (энергозависимого) выброса антибиотиков.

Проведите анализ β-лактамов и аминогликозидных антибиотиков (на конкретных примерах), имеющих широкое применение в клинической практике, с точки зрения:

- механизма возникновения резистентности;
- сравнения хромосомной и плазмидной резистентности и роли конъюгативных транспозонов в этом процессе; возникновения полирезистентности микроорганизмов и госпитальной инфекции.

Задача 6.

Важнейшие группы антибиотиков, образуемых грибами, пенициллины и цефалоспорины, известны также под общим названием «β-лактамы антибиотики». Они образуются двумя родами плесневых грибов, среди которых наиболее широко известны два продуцента (β-лактамов. Структура, от которой зависит их антимикробная активность - это весьма реакционноспособное четырехчленное β-лактамное кольцо (циклический амид). В этом кольце происходит замыкание связи между углеродом карбоксильной группы аминокислоты и азотом аминогруппы при γ-углеродном атоме. На основе природных пенициллинов и цефалоспоринов получены также и их полусинтетические аналоги.

Проведите анализ β-лактамов антибиотиков с позиций:

- механизма образования (биосинтеза) на примере пенициллина;
- химической структуры, биологической активности и механизма действия;
- требований к производству этих антибиотиков согласно правилам GMP.

Задача 7.

В настоящее время доказано, что невозможно полностью избавиться от генов резистентности, однако бороться с антибиотикорезистентностью можно.

Обоснуйте необходимость периодического обновления номенклатуры антибиотических препаратов на основе:

- целенаправленной химической трансформации природных антибиотиков на примере (β -лактамов и аминогликозидных антибиотиков);
- информации о системах активного выброса антибиотиков из клетки;
- данных о MDR, об образовании инактивирующих антибиотиков изоферментов, о фенотипах опухолей и возможности борьбы с резистентностью опухолей.

Задача 8.

У патогенных микроорганизмов открыты гены, существенные для инфекционного процесса, но не существенные при росте в искусственных условиях на искусственных питательных средах (*in vitro*). Эти гены (w' -гены или гены вирулентности) не поддаются идентификации и, таким образом, не могут быть использованы как таргеты (мишени) при поиске новых антибактериальных ЛС.

Докажите существование гена-мишени при поиске новых ЛС, используя понятия:

- «house keeping gens» («гены домашнего хозяйства», «гены, на которых держится дом»);
- «m-gens»;
- «система IVET» как часть международных геномных исследований.

Задача 9.

В основе любого производства фармацевтических препаратов, в том числе и биотехнологического, должна быть заложена рентабельность, стабильность, высокий уровень качества. Вместе с тем ЛС должны быть эффективны и безопасны при применении.

Проанализируйте целесообразность достижения поставленных целей на примере:

- сочетания биосинтеза и органического синтеза при производстве β -лактамов и аминогликозидов;
- производства D-циклосерина, аминокислот, витаминов;
- производства хлорамфеникола (левомицетина*).

Эталоны ответов:

Задача 1.

Продолжительность лаг-фазы от 1 до 10 ч, утилизация субстрата слабая, дыхание снижено, биомасса растет слабо.

Прирост биомассы максимальный на 59 ч роста от начала процесса и характеризуется снижением рН; по азоту - снижение, по углеводам - снижение, низкая интенсивность дыхания.

Начало синтеза антибиотика совпадает со снижением показателей углеводов, азота. Скорость роста биомассы снижается.

Торможение прироста биомассы (после 59 ч от начала процесса) совпадает с интенсификацией биосинтеза антибиотика.

В данном процессе необходимо учитывать:

- истощение компонентов среды с учетом скорости их потребления; в процессе ферментации остались практически неиспользованными азот и углеводы; зависимость биомассы от активности продуцента (удельная активность) минимальная;
- влияние параметров на окончание процесса; истощения среды нет, но есть автолиз, параметры процесса не сбалансированы, наблюдается защелачивание среды и снижение активности биосинтеза антибиотика;
- возможность продления активной фазы процесса для увеличения выхода антибиотика. Для этого необходимо увеличить массообмен клеток и усилить их дыхание, это можно сделать, если увеличить число оборотов мешалки ферментера, усилить барботаж и аэрацию в целом.

Задача 2.

Продолжительность лаг-фазы составляет 1-10 ч, в этот период наблюдают слабую утилизацию субстрата, биомасса растет слабо. Это фаза адаптации.

Прирост биомассы максимальный на 35 ч роста. Трофофаза (фаза роста) продолжается до 35-го часа от начала процесса и характеризуется снижением значения рН, снижением содержания азота, снижением содержания углеводов. В этой фазе происходит активное потребление всех компонентов среды, процесс интенсивный, кривые более крутые.

Начало синтеза антибиотика совпадает со снижением показателей потребления углеводов и азота, скорость роста биомассы замедляется.

Торможение прироста биомассы совпадает с интенсификацией биосинтеза антибиотика. Максимальная скорость биосинтеза совпадает с началом стационарной кривой по биомассе.

В данном процессе можно выделить следующие особенности:

- компоненты среды почти полностью истощены;
- процесс имеет высокую удельную активность биосинтеза антибиотика;

- оптимальное влияние параметров на окончание процесса;
- в целях увеличения выхода антибиотика и повышения рентабельности процесса можно продлить время ферментации, применяя азотно-углеродную подпитку.

Задача 3.

Важнейшая группа антибиотиков, образуемых грибами (пенициллины и цефалоспорины), объединена под общим названием Р-лактамовых антибиотиков. Основной частью химической структуры, определяющей их антимикробную активность, является четырехчленное р-лактамовое кольцо (циклический амид). При образовании р-лактамового кольца замыкается связь между углеродом карбоксильной группы аминокислоты и азотом аминогруппы при р-углеродном атоме.

Плесневые грибы как продуценты β-лактамовых антибиотиков относятся к многочисленным почвенным микроорганизмам-эукариотам, имеющим окруженное мембраной ядро. У них также присутствуют субклеточные структуры - митохондрии с ферментами, катализирующими биоэнергетические процессы. Клеточная стенка состоит из хитина с остатками аминосахаров. Клетки плесневых грибов формируют различные виды мицелия и отличаются от бактериальных клеток более сложной организацией, большими размерами и длительным циклом развития (6-7 сут).

β-Лактамовые антибиотики образуются двумя родами плесневых грибов: *Penicillium* (пенициллины) и *Cephalosporium* (цефалоспорины) или *Acremonium*. Широко известны два продуцента р-лактамов: *Penicillium chrysogenum* и *Acremonium chrysogenum*. Первый образует бензилпенициллин, второй - цефалоспорин О. У пенициллинов с β-лактамовым кольцом сконденсировано пятичленное кольцо, а у цефалоспоринов - шестичленное.

Предназначение антибиотиков в почвенных биоценозах: средства выживания в борьбе за питательные вещества и т.п., антистрессорные средства, эфффекторы образования мицелия или спорообразования.

Механизм действия β-лактамовых антибиотиков на бактериальную клетку заключается в их способности ингибировать синтез пептидо-гликана клеточной стенки на последнем этапе, подавляя активность фермента транспептидазы, который соединяет концы пептидных цепочек. β-Лактамовый антибиотик связывается с активным центром фермента, инактивируя его. В этом случае пептидные цепочки не замыкаются. В результате клетка или лизируется, или переходит в спорообразование.

Механизм биосинтеза. Предшественники β-лактамовых антибиотиков - аминокислоты, которые в результате ферментативных реакций преобразуются в β-лактамовую структуру. Началом формирования р-лактамовой структуры считают синтез LLD-трипептида из трех L-аминокислот: L-аминоадипиновой кислоты, L-цистеина и L-валина. В образовании LLD-трипептида участвуют специфические ферменты, замыкающие пептидные связи, и ферменты, превращающие L-валин в его оптический антипод - D-валин. Затем LLD-трипептид превращается в моноциклический р-лактамовый. Следующий этап - появление серосодержащего пятичленного кольца, сконденсированного с β-лактамовым. Далее ферментативные реакции с образованием бензилпенициллина или цефалоспорина О. В первом случае в реакцию вступает ФУК и образуется бензилпенициллин, освобождается аминокадипиновая кислота и кофермент А. Во втором случае происходит «экспансия», расширение пятичленного кольца в шестичленное, катализируемое ферментом «экспандазой», после чего формируется молекула цефалоспорина Ср

Задача 4.

Первоисточник генов резистентности - почвенные микроорганизмы-продуценты антибиотиков. Эти гены могут передаваться через промежуточных хозяев патогенным микроорганизмам. Появление у них генов резистентности также может быть обусловлено спонтанными мутациями у микроорганизмов. Вместе с тем развитие резистентности может быть связано с генами, кодирующими синтез ферментов деградации собственного антибиотика, которые способны переноситься из микроорганизмов-продуцентов антибиотиков в клетки патогенных и непатогенных бактерий. Таким образом, попадание генов резистентности в патогенные микроорганизмы предопределено существованием в биоценозах самих продуцентов антибиотиков, а формирование в бактериальной клетке защитных механизмов обусловлено появлением генов резистентности как в хромосомах, так и в плазмидах. Плазмидная резистентность особенно опасна в генетическом плане, так как плазмиды передаются из клетки в клетку путем конъюгации, без деления клетки, однако плазмида при этом реплицируется. Кроме того, некоторые типы плазмид многокопийны. Отсюда термин «инфекционная резистентность», т.е. «заражение резистентностью» одних клеток от других.

Причина возникновения изоферментов с β-лактамазной активностью заключается в том, что микробная клетка защищает себя от антибиотика за счет мутаций в гене, кодирующем последовательность аминокислот в ферменте-мишени, т.е. в структурном гене этого фермента. В результате происходит расщепление β-лактамового кольца, и антибиотик теряет свою активность. Кроме того, генетические элементы ДНК (транспозоны), способные к самостоятельному перемещению в пределах реплика (генома) и вне его, несут детерминанты устойчивости к антибиотикам (например, к канамицину, хлорамфениколу, тетрациклину, эритромицину). Особенно часто плазмидная локализация генов резистентности встречается при ферментативной инактивации антибиотиков. Иногда в одной плазмиде оказываются локализованы сразу несколько генов, кодирующих ферменты, воздействующие на антибиотики разных групп. Такое явление носит название «полирезистентность микроорганизмов». Наличие полирезистентных штаммов возбудителей инфекций - серьезная проблема, так как к антибиотикам, которые применяют в инфекционной клинике, возникает устойчивая резистентность со стороны возбудителей («госпитальная инфекция»). В то же время необходимо отметить, что в большинстве случаев

переноса генов резистентности не происходит из-за того, что экспрессируются в основном хромосомные гены клетки-хозяина, которые доминируют над генами резистентности - в этом случае антибиотикочувствительность будет преобладать над антибиотикорезистентностью.

Пути преодоления резистентности (на примере β -лактамов и цефалоспоринов):

- применение полусинтетических антибиотиков (оксациллин, метициллин и др.);
- применение антибиотиков-ингибиторов β -лактамаз (уназин- ампициллин + сульбактам, амоксиклав-амоксициллин + клавулановая кислота);
- β -лактамный антибиотик имипенем (легко проникает через пориновые каналы);
- цефалоспорины, имитирующие переносчики железа;
- цефалоспорины III поколения, устойчивые к β -лактамазам (цефтазидим и др.);
- цефалоспорины IV поколения, не являющиеся индукторами β -лактамаз (цефепим, цефпиром);
- амикацин (канамицин + L- γ -амино- α -оксимасляная кислота);
- организационные мероприятия по смене антибиотиков.

Задача 5.

Первоисточником генов резистентности являются спонтанные мутации у почвенных микроорганизмов-продуцентов антибиотиков. Эти гены могут передаваться через промежуточных хозяев патогенным микроорганизмам. Одновременно к источникам генов резистентности относятся гены, кодирующие синтез ферментов собственного антибиотика: они также способны переноситься из продуцентов в клетки патогенных и непатогенных бактерий. Таким образом, попадание генов резистентности в патогенные микроорганизмы предопределено существованием в биоценозах самих продуцентов антибиотиков.

Формирование в бактериальной клетке защитных механизмов обусловлено наличием генов резистентности как в хромосомах, так и в плазидах. Особенно опасна плазмидная резистентность в генетическом плане, так как плазмиды передаются из клетки в клетку путем конъюгации (без деления клетки), но плазида при этом реплицируется. В то же время некоторые типы плазмид многокопийны. Отсюда возник термин «инфекционная резистентность», т.е. «заражение резистентностью» одних клеток от других.

Также транспозоны (генетические элементы ДНК, способные к самостоятельному перемещению в пределах репликона и вне его) могут нести детерминанты устойчивости к антибиотикам (например, к канамицину, хлорамфениколу, тетрациклину, эритромицину). Особенно часто плазмидная локализация генов резистентности встречается при ферментативной инактивации антибиотиков.

Иногда в одной плазмиде оказываются локализованы несколько генов, кодирующих ферменты, воздействующие на антибиотики разных групп, что обуславливает понятие полирезистентности микроорганизмов. Полирезистентные штаммы возбудителей инфекций вызывают «госпитальную инфекцию», когда к антибиотикам, которые применяют в клиническом учреждении, возникает устойчивая резистентность со стороны возбудителей.

Причина появления изоферментов с β -лактамазной активностью в том, что микробная клетка защищает себя от антибиотика за счет мутаций в гене, кодирующей последовательность аминокислот в ферменте, участвующем в биосинтезе антибиотика, точнее не в самом ферменте, а в структурном гене этого фермента. Под действием β -лактамаз происходит расщепление β -лактамного кольца, и антибиотик теряет свою активность. При этом мутировавшие хромосомные гены могут оказаться в плазидах и далее в других клетках, однако в большинстве случаев переноса резистентности не происходит вследствие того, что в экспрессии генов доминируют хромосомные гены клетки-хозяина (реципиента), и антибиотико-чувствительность в этом случае будет преобладать над антибиотико-резистентностью.

Ферментативная инактивация аминогликозидов - наиболее часто встречающийся механизм резистентности к этим антибиотикам. Ферменты, инактивирующие аминогликозидные антибиотики, относят к классу трансфераз, они катализируют замещение гидроксильных групп у аминогликозидов остатками фосфорной или адениловой кислоты, а аминогруппы аминогликозидов замещают остатками уксусной кислоты (фосфотрансферазы, аденилтрансферазы, ацетилтрансферазы). Достаточно заменить только одну функциональную группу у аминогликозидного антибиотика, и он полностью инактивирован. Вместе с тем эти ферменты у грамотрицательных микроорганизмов имеют внутриклеточную локализацию, в отличие от β -лактамаз грамположительных микроорганизмов, которые являются гидролазами и относятся к внеклеточным ферментам.

Активный выброс антибиотиков из клетки возможно показать на примере тетрациклинов и противоопухолевых препаратов. Система активного выброса локализуется в цитоплазматической мембране клетки и не позволяет антибиотикам достигать своей мишени, делая их неэффективными. Она состоит из «белка-ловушки», «линкерного белка» и «белка помпы».

Задача 6.

Предшественники β -лактамов антибиотиков - аминокислоты, преобразование которых путем ферментативных реакций ведет к формированию β -лактамной структуры. Сначала из трех аминокислот, L-аминоадипиновой кислоты, L-цистеина, L-валина, синтезируется LLD-трипептид. В его образовании участвуют специфические ферменты, замыкающие пептидные связи, и ферменты, превращающие L-валин в его оптический антипод - D-валин. Затем LLD-трипептид превращается в моноциклический β -лактам. Следующий этап - синтез пятичленного серосодержащего кольца, сконденсированного с β -лактамом. Далее идут

ферментативные реакции с образованием бензилпенициллина (продуцент - *Penicillium chrysogenum*) или цефалоспорины Ср (продуцент - *Ascremonium chrysogenum*). В первом случае в реакцию вступает ФУК и образуется бензилпенициллин, освобождается аминокислота и кофермент А. Во втором случае происходит «экспансия», т.е. расширение пятичленного кольца в шестичленное, катализируемое ферментом «экспандазой», и далее формируется молекула цефалоспорины С.

Биологическая активность антибиотиков (бактериостатический, бактерицидный, а иногда и литический эффект на клетки) как избирательных ингибиторов метаболизма бактериальной клетки осуществляется посредством их взаимодействия с внутриклеточной мишенью, что вызывает также каскад вторичных реакций.

β -Лактамные антибиотики (пенициллины, цефалоспорины и другие вещества р-лактамной структуры) относятся к ингибиторам образования клеточной стенки бактерий вследствие избирательного подавления активности тех или иных ферментов, включенных в многоступенчатый синтез основного полимера клеточной стенки - пептидогликана. Во время биосинтеза пептидогликана (чередование остатков мурамовой кислоты и N-ацетилглюкозамина) они подавляют катализируемое ферментами замыкание пептидных цепочек в пептидные мостики, соединяющих остатки мурамовой кислоты. В результате гликановые нити и пептидные мостики гидролизуются, так как нарушается равновесие синтеза пептидогликана и его ферментативного гидролиза. Формирования непрерывной сети пептидогликана не происходит. В животных клетках нет пептидогликана, и поэтому р-лактамы не токсичны для человека и животных. Токсичность и аллергенность никак не связаны с механизмом их антибактериального действия. Для производства антибиотиков Р-лактамной структуры в соответствии с правилами GMP требуется полная изоляция этого производства от производства других лекарственных препаратов. Это объясняется тем, что р-лактамы проявляют аллергенное действие уже в крайне малых количествах и, попадая в другие ЛС, могут вызвать у сенсibilизированных больных серьезные осложнения.

Задача 7.

Известно, что первоисточник генов резистентности - почвенные микроорганизмы-продуценты антибиотиков. Эти гены могут передаваться через промежуточных хозяев патогенным микроорганизмам.

β -Лактамы инактивируются β -лактамазами, которые расщепляют их β -лактамное кольцо. Основной путь борьбы с β -лактамазами - создание молекул ЛС, которые не захватываются активным центром р-лактамаз. Представителями таких ЛС являются полусинтетические антибиотики (оксациллин, метициллин, карбенициллин и т.д.), которые не чувствительны к пенициллазам. Механизм создания полусинтетических пенициллинов:

- отщепление бензильного радикала (остается 6-АПК);
- введение химическим путем других радикалов.

Аналогичная работа возможна с цефалоспоридами при присоединении различных радикалов к 7-аминоцефалоспоровой кислоте.

Другим направлением является использование комбинированных препаратов, содержащих антибиотик вместе с ингибитором Р-лактамаз. Примеры: уназин (ампициллин + сульбактам); амоксиклав (амоксициллин + клавулановая кислота); аугментин (амоксициллин + клавулановая кислота, но в другом соотношении).

Если резистентность обусловлена наличием генов клетки, которые делают мембраны непроницаемыми для антибиотика (сужаются поры или снижается их количество), то в этом случае можно использовать β -лактамные антибиотики имипенем, карбапенем, меропенем, образующие, по сравнению с пенициллином, меньшие по размерам цвиттер-ионы, легко проникающие через пориновые каналы.

Можно также использовать и имитационные структуры переносчика, жизненно необходимого для клетки, проходящего через пориновые каналы. Так, например, был создан цефалоспорин, имитирующий переносчик железа, который, попадая в клетку, угнетал синтез пептидогликана, ингибируя транспептидазу.

Цефалоспорины III поколения (в частности, цефтазидим), хотя и не расщепляются р-лактамазами, но являются индукторами выработки этих р-лактамаз. Цефалоспорины IV поколения (цефепим, цефпиром) уже не являются индукторами β -лактамаз.

Структурная формула амикацина включает фрагмент у-окси-масляной кислоты, который защищает этот высокоактивный антибиотик от инактивации со стороны изоферментов.

Система активного выброса антибиотиков обнаруживает в цито-плазматической мембране новые белки, проникающие в клетку. Эта система белков включает в себя «белок-ловушку», «линкерный белок» и «белок-помпу».

Аналогичная ситуация наблюдается и в отношении противоопухолевых антибиотиков, что предопределяет их низкую терапевтическую эффективность.

Пути повышения эффективности: создание липосомальных лекарственных форм антибиотиков, применение конъюгатов цефалоспоринов с фторхинолонами. Последние рассматривают как «pro-drugs» (предлекарства), механизм их действия связан с подавлением активности транспептидаз пептидогликана и ДНК-гиразы. Так, оливомидин, рубомицин, доксорубин, блеомицин подавляют синтез и ДНК, и РНК одновременно, поэтому очень токсичны.

Задача 8.

Большинство генов, продукты которых необходимы клетке всегда, получили название «house keeping gens», что можно перевести, как «гены, на которых держится дом». Они экспрессируются в любых условиях, так как клетка без них не может существовать. Продукты экспрессии именно этих генов обнаруживают на

питательных средах *in vitro*, поэтому практически все антибиотики, применяемые в клинической практике, являются ингибиторами функций именно этих генов.

Продукты некоторых генов не идентифицируют на питательных средах, и поэтому их дальнейшее использование в качестве таргетов при поиске новых ЛС невозможно. Эти так называемые молчащие *in vitro* гены патогенных микроорганизмов получили название ψ -генов или генов вирулентности. Соотношение между *house keeping* и ψ -генами в геноме у разных патогенных бактерий варьирует, но в среднем более 90% генов относится к 1-й группе (*house keeping*).

ivi-Гены, как правило, играют определяющую роль в развитии инфекционного процесса. Именно поэтому значительный интерес представляют пути выявления и выделения этих генов. Примером такой работы служит предложенный американскими генетиками метод «IVET» (*In Vivo Expression Technology*). Краткая суть метода описана ниже.

- Геном патогенной бактерии (например, *Salmonella typhimurium*) с помощью рестриктаз делят на сотни фрагментов.
- Каждый отдельный фрагмент генно-инженерными методами соединяют с лишенным промотора геном хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (*cat*). Такой ген (без промотора) не может реплицироваться при его введении в клетку. Однако этот ген сможет реплицироваться, если соединенный с ним ген (фрагмент ДНК сальмонеллы) будет иметь промотор для своей репликации. Тогда этот промотор будет вызывать репликацию не только своего гена, но и следующего за ним гена (без промотора). Таким образом, репликация гена хлорамфеникол-ацетилтрансферазы может происходить за счет использования или «захвата» чужого промотора.
- К этому сдвоенному фрагменту (*x-cat*, где *x* - фрагмент генома сальмонеллы, а *cat* - ген хлорамфеникол-ацетилтрансферазы) присоединяется лактозный оперон (*lac Z*) также без промотора.
- Этот оперон нужен системе для окисления лактозы.
- Полученный фрагмент (*x-cat-lac Z*) включается в плазмиду. При этом получается набор плазмид, отличающихся только по фрагменту *x*.
- Полученные плазмиды вводят в клетку *E. coli*.
- Далее в организм лабораторного животного (мыши) вводят клеточную суспензию *E. coli* и хлорамфеникол.
- Через сутки из слизистой оболочки желудка мыши на твердую индикаторную среду с лактозой высевают бактериальную культуру.
- Затем колонии анализируют. 90% полученных колоний имеет красный цвет (при окислении лактозы меняется pH и соответственно цвет среды); 10% - бесцветные или белого цвета.

Если на индикаторной среде с лактозой выросла бесцветная колония, значит, на искусственной питательной среде данный промотор не работал, и ген во фрагментах «*» не экспрессировался. Вероятно, он нужен только при развитии инфекционного процесса и принадлежит к генам /V/ (генам вирулентности). В случае наличия колоний красного цвета экспрессируется ген, кодирующий образование фермента, расщепляющего лактозу, в результате изменяется цвет индикатора, и колонии окрашиваются в красный цвет.

Используя данный метод, авторы выделили из клеток *E. coli* около 100 ψ -генов, из которых 50 были новыми (не описанными ранее) и представляли интерес как потенциальные таргеты для отбора антимикробных агентов.

Задача 9.

Любое фармацевтическое производство по способу получения целевого продукта подразделяется на химическое, биологическое, химико-энзиматическое, микробиологическое (широко применяется различное сочетание этих методов). Так, D-циклосерин целесообразно получать микробиологическим синтезом (продуцентом являющаяся актиномицеты), так как он менее токсичен, чем D-циклосерин, полученный методом органического синтеза. При этом если D-циклосерин активен, то L-циклосерин - нет. Именно поэтому в данном случае приоритет остается за микробиологическим производством, поскольку оно, в отличие от химического синтеза, дает гарантии получения только D-циклосерина, обеспечивая тем самым рентабельность производства, терапевтическую активность и безопасность производимого препарата. Противоположный пример: получение левомицетина* на основе природного продуцента является нецелесообразным, так как активность природного штамма очень низка, а также он весьма капризен по отношению к питательным средам.

Примером выгодного сочетания органического синтеза и биосинтеза является производство аскорбиновой кислоты, в котором этап превращения D-сорбита в L-сорбозу осуществляется уксуснокислыми бактериями *Gluconobacter oxydans*. Или, например, можно привести получение ампициллина и других полусинтетических антибиотиков (β -лактамной структуры (оксициллин, карбенициллин, метициллин и др.) из пенициллина (антибиотик, образуемый плесневыми грибами *Penicillium chrysogenum*). Проведение химического деацилирования бен-зилпенициллина как исходного сырья для получения 6-АПК требует биотрансформации, которая, не разрушая β -лактамного кольца, расщепляет именно ту амидную связь, которая необходима для образования 6-АПК. Дальнейший химический синтез ведет к образованию соответствующего радикала (ацилирование 6-АПК). Здесь же можно привести пример преобразования аминокликозидных антибиотиков (например, канамицина) с целью получения новых ЛС методом мутасинтеза. Сначала генетики-биотехнологи получают штамм «блок-мутант», который имеет «блок-фермент» по аминокликолитолу. Далее аминокликолитол

химически модифицируют и включают в молекулу антибиотика, синтезируемую штаммом «блок-мутантом». Полученные методом мутасинтеза конечные продукты называют мутасинтонами.

Раздел 5. Биотехнология белковых лекарственных веществ.

Тема 5.2 Интерактивное занятие. Рекомбинантные белки. Технология генно-инженерного инсулина, интерферонов, интерлейкинов и гормона роста человека (схемы получения). Решение ситуационных задач.

Задача 1.

При получении генно-инженерного инсулина, основанного на раздельном биосинтезе 2 цепей, в качестве продуцента используют определенные микроорганизмы и модифицированный чужеродный ген (точнее, оперон) с лидерной последовательностью аминокислот (метионином и β -галактозидазой), отделяемой на последней стадии контакта секретируемого белка и клетки. Ферментацию проводят на среде с лактозой (или галактозой) для последующего объединения свободных инсулиновых цепей. Далее осуществляют выделение и очистку полученного инсулина.

На основе общей схемы получения инсулина и требований к его качеству проанализируйте и обоснуйте:

- условия выбора конкретного продуцента инсулина и конструкции вектора, с помощью которого можно ввести в клетку чужеродный ген (ген инсулина);
- необходимость использования лидерной последовательности аминокислот с метионином и β -галактозидазой в синтезе инсулина и роль лактозы (галактозы) в процессе ферментации и получении завершенных инсулиновых цепей и их объединении;
- возможность проявления токсичности генно-инженерного инсулина; с чем это может быть связано, учитывая видоспецифичность данного инсулина, его серийное качество и уровень культуры производства на предприятии?

Прокомментируйте правила безопасности работы с микроорганизмами на генетическом и физическом уровнях.

Эталоны ответов:

Задача 1.

Выбор конкретного продуцента рекомбинантных белков, в частности инсулина, предусматривает его промышленное применение в качестве суперпродуцента. В этом отношении можно предложить использовать *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* и др. микроорганизмы, которые могут секретировать целевой продукт в культуру-растворную жидкость. Преимуществом *Escherichia coli* по сравнению с этими микроорганизмами считают то, что синтезируемые кишечной палочкой чужеродные белки депонируются внутри клеток в виде белковых тел (так называемых *Dense bodies*) и недоступны для действия протеаз, от которых нет защиты у других вышеуказанных продуцентов. Применение *Escherichia coli* в качестве промышленного штамма также целесообразно благодаря наиболее низкому уровню опасности для персонала и окружающей среды, что достигается обеспечением фильтрами всех линий, через которые происходят газовые выбросы из ферментеров, и термической стерилизацией всех стоков, содержащих биоматериал.

Схема получения рекомбинантного инсулина по «Eli Lilly» (США)

- Химический синтез генов, кодирующих образование цепей А и В в определенной последовательности нуклеотидов.
- Конструирование вектора.
- Введение каждого синтетического гена в плазмиду: в одну - ген, синтезирующий цепь А, в другую - ген, синтезирующий цепь В.
- Для интенсивной репликации плазмид в каждую из них вводят также ген, кодирующий образование фермента β -галактозидазы.
- Введение полученных плазмид в клетку *Escherichia coli* с последующим получением двух культур продуцента, одна из которых синтезирует цепь А, а другая - цепь В.
- Культуры помещают в ферментер, в культуральную среду добавляют галактозу, которая индуцирует образование фермента β -галактозидазы. При этом плазмиды активно реплицируются и в результате получается большое количество генов, синтезирующих цепи А и В.
- Клетки лизируют, выделяют цепи А и В, которые обрабатывают бромцианом для отщепления от них β -галактозидазы.
- Затем следует очистка и выделение А и В-цепей.
- Далее окисляют остатки цистеина и соединяют цепи А и В.

Полученный генно-инженерный человеческий инсулин не вызывает аллергических реакций, так как он видоспецифичен, и если в нем находят какие-либо недопустимые примеси в виде эндотоксинов и пирогенов, то это относится только к нарушениям в технологии его изготовления и культуры производства.

Раздел 6. Производство ферментных препаратов.

Тема 6.2 Производство ферментов, используемых в качестве лекарственных препаратов и как биокатализаторов в фармацевтической промышленности. Ферменты трансформации β -лактамных антибиотиков и используемые в генетической инженерии. Имобилизованные ферменты. Стандартизация целевых продуктов.

Задача 1.

Применение иммобилизованных ферментов и белков в медицине открывает новые возможности создания эффективных ЛС.

Продемонстрируйте возможности и достоинства гидролаз при модификации таких широко применяемых антибиотиков, как пенициллины и цефалоспорины на основании:

- уникальных свойств гидролитических ферментов и определенных изменений в структуре данных антибиотиков, связанных с получением более эффективных аналогов;
- сравнения химического пути трансформации с биокаталитической технологией;
- производственных результатов получения этих антибиотиков
- как целевых продуктов.

Задача 2.

Несмотря на то, что в основе современной инженерной энзимологии лежит применение ферментов и ферментных систем, технологическое использование ферментов имеет вполне конкретные ограничения: лабильность ферментов, дороговизна и большая трудоемкость при их очистке, однократность их использования, в ряде случаев наличие коферментов.

Проанализируйте ситуацию с обоснованием:

- путей преодоления этих ограничений;
- сопоставления функции биообъекта с технологической операцией;
- понятия «система, открытая для усложнения».

Эталоны ответов:

Задача 1.

В отличие от химической трансформации биокатализ обладает уникальной специфичностью и избирательностью действия ферментов, возможностью проведения процесса в «мягких» условиях, высокой скоростью, использованием малых количеств катализаторов, практически полным отсутствием побочных реакций, что является несомненным преимуществом при создании лекарственных препаратов (антибиотики, стероиды, простагландины и т.д.). Гидролитические ферменты (гидролазы) нашли наибольшее применение в практике по следующим причинам:

- гидролитические реакции в водной среде, как правило, полностью термодинамически сдвинуты в сторону образования продуктов;
- кинетика реакций ферментативного гидролиза легко поддается количественному описанию до глубоких степеней превращения;
- гидролазы - наиболее изученные и наиболее легко управляемые ферменты;
- существует возможность оптимизации процессов по двум параметрам - концентрации расщепляемого субстрата и активности фермента;
- гидролазы избирательны по типу катализируемой реакции, проявляют широкую субстратную специфичность;
- гидролазы доступны в необходимых количествах (микроорганизмы содержат значительные количества различных гидролаз).

Возможности гидролаз можно представить при модификации пенициллинов и цефалоспоринов. Получение новых, более эффективных аналогов пенициллинов и цефалоспоринов связано с изменением боковой цепи при сохранении ядра антибиотика - 6-АПК или 7-АЦК как ключевых соединений для синтеза новых пенициллинов и цефалоспоринов. Например, после отщепления боковой цепи биосинтетического пенициллина и последующего ацилирования ее аминогруппы можно сравнительно легко получать его «полусинтетические» аналоги. Отщепление боковой цепи и превращение в 6-АПК с помощью фермента пенициллинамидазы можно провести в одну стадию при обычных условиях и температуре 10-40 °С в водной среде, избегая многостадийности, энергоемкости и больших объемов органических растворителей при химической трансформации, расщепив при этом более устойчивую амидную связь и сохранив более лабильную связь в β-лактамом кольце пенициллина.

Таким образом, переход к биокаталитической технологии существенно упрощает процесс, увеличивает выход целевого продукта и объем производства, стабилизирует процесс, делает его экологичным и снижает себестоимость. При получении новых полусинтетических цефалоспоринов также используют пенициллинамидазу, которая сохраняет целостность лабильного β-лактамого кольца.

Задача 2.

Сравнительно недавно (несколько десятков лет назад) четко определились пути преодоления вышеуказанных трудностей. Эти пути связаны с получением иммобилизованных ферментов из клеток микроорганизмов. Сама иммобилизация представляет собой физическое разделение биообъекта (клетка, фермент) и растворителя, т.е. биообъект закреплен на нерастворимом носителе, а субстрат и продукты метаболизма свободно обмениваются между биообъектом и растворителем. Биообъект в этом случае работает многократно (недели, месяцы). Иными словами, иммобилизация ферментов - это перевод их в нерастворимое состояние с частичным или полным сохранением каталитической активности.

При совершенствовании биотехнологического процесса обычно используют следующие методы

иммобилизации ферментов:

- ковалентное присоединение молекул ферментов к водонерастворимому носителю (природные полимеры - целлюлоза, хитин, агароза; синтетические - поливинилхлорид, полиакриламид и др.);
- захват фермента в сетку геля или полимера;
- ковалентная сшивка молекул фермента друг с другом или с инертными белками;
- адсорбция фермента на водонерастворимом носителе (часто на ионитах);
- микрокапсулирование.

В результате иммобилизации ферменты получают преимущества гетерогенных катализаторов: их можно удалять из реакционной смеси и отделять от субстрата и продуктов ферментативной реакции простой фильтрацией. Кроме того, появляется возможность перевода многих периодических ферментативных процессов на непрерывный режим с использованием проточных аппаратов или колонн с иммобилизованными ферментами.

Что касается широко используемой иммобилизации целых клеток, то ее проводят аналогично, предотвращая размножение клеток, увеличивая их сохранность и срок работы в качестве катализатора. Примеры носителей органической природы: желатин, фибрин, альги-нат натрия, целлюлоза, ПААГ. Неорганические: термический песок, активированный уголь, окись алюминия, бентонит. Носитель не должен быть токсичным для биообъекта. Ограничения использования иммобилизации возможны в 2 случаях: если целевой продукт не выходит в среду и если у фермента есть прочно с ним связанный кофермент, без которого этот фермент не работает.

Каждый из методов иммобилизации имеет свои ограничения, связанные с недостаточной прочностью получаемых связей. Особенно это касается микрокапсулирования (инкапсулирования). Ячейки геля не должны быть слишком маленькими (иначе возникнут трудности контакта фермента с субстратом и недостаточная аэрация). Однако и слишком большого размера ячейки геля быть не должны. В этом случае связь с гелем образуется слабая, и биообъект может вымываться.

Функции биообъекта связаны с технологической операцией определенным образом. Так, например, очищенный фермент, фермент в клетке с коферментом, фермент в пермеабелизированной клетке выполняют только отдельную реакцию: одноступенчатую трансформацию. Интактная клетка (клетка-производитель) осуществляет полный биосинтез целевого продукта посредством цепочки реакций.

Система, открытая для усложнения, - это клетка-производитель какого-либо предшественника целевого продукта + первый фермент + второй фермент + третий фермент и т.д., т.е. биосинтез предпродукта и его биотрансформация осуществляются в одном биореакторе. Таким путем можно, в частности, одновременно получать 6-АПК, ампициллин и т.д.

Раздел 7. Иммунобиотехнология

Тема 7.4 Получение вакцин и сывороток. Технологическая схема производства и контроль качества живой вакцины гриппа и гепатита Б.

Задача 1.

Иммунобиотехнология как наука и производство, с одной стороны, предлагает средства для усиления иммунной защиты организма в ответ на различные неблагоприятные факторы окружающей среды - вакцины, сыворотки, рекомбинантные интерфероны, интерлейкины и другие цитокины, с другой стороны, путем широкого применения моноклональных антител решает такие актуальные для фармации задачи, как безопасность и контроль качества лекарственных препаратов.

Выберите иммунобиопрепараты для усиления иммунного ответа:

- пассивного специфического типа воздействия;
- пассивного неспецифического типа воздействия;
- активного типа воздействия.

Прокомментируйте возможности использования моноклональных антител при решении проблемы безопасности ЛС (мониторинг ЛС).

Задача 2.

Иммунобиотехнология вносит весомый вклад в создание ЛС, профилактических и диагностических препаратов. Однако не у всех людей и не всегда иммунная система обеспечивает защиту организма от различных микробных и вирусных инфекций. Она может быть неадекватна внешним условиям, и иногда требуется помощь в усилении иммунного ответа.

При анализе данной ситуации:

- сопоставьте виды и цели иммунизации с классификацией вакцин по способам их получения и применению;
- свяжите атакующие агенты (ксенобиотики) с ответной реакцией организма, используя понятия «антиген», «антитело», «антигенные детерминанты» («эпитопы»), «гаптены»;
- прокомментируйте проявление иммунного ответа и способы его усиления.

Задача 3.

Вакцины и сыворотки, как известно, применяют с целью профилактики или лечения. Вакцинация способствует формированию у реципиента иммунитета к патогенным микроорганизмам и тем самым защищает его от инфекции. В случае введения сыворотки организм получает уже готовые антитела.

Сопоставьте вакцины и сыворотки как профилактические средства:

- по иммунному ответу;
- по способу получения и применению;
- по эффективности их использования.

Задача 4.

Известно, что главным компонентом иммунохимической реакции являются антитела (иммуноглобулины), представляющие собой белки сыворотки крови, синтезируемые в организме человека в качестве проявления защитной реакции (иммунитета) при попадании в него чужеродного вещества (ксенобиотика).

Сопоставьте функции иммуноглобулинов (антител):

- с их классификацией и структурой;
- со схемой взаимодействия антигена с антителом, представлением о структуре антигена;
- с принципами расширения пределов чувствительности и повышения специфичности иммунохимических тестов.

Задача 5.

На сегодняшний день производство иммунодиагностикомов можно рассматривать как самостоятельную область биотехнологической промышленности. Моноклональные антитела диагностического назначения, получаемые с использованием гибридной технологии, представлены широким ассортиментом наборов фармацевтической продукции во всем мире. Иммунодиагностические тест-системы с использованием поликлональных антител созданы практически для всех лекарственных препаратов.

Учитывая большой спектр использования иммунохимического анализа: - выберите наиболее важные области его применения;

- представьте схему получения моноклональных антител;
- приведите пример использования тест-системы иммунохимического анализа в общей схеме экспресс-анализа хорионического гонадотропина.

Эталоны ответов:

Задача 1.

Понятие «антиген» подразумевает определенную химическую структуру, против которой могут быть получены антитела. Антигены внешней среды поступают в организм человека с воздухом, водой, пищей, через слизистые оболочки и кожные покровы. Часть антигенов попадает в организм в виде вакцин и иммуномодулирующих ЛС (агентов). Иммуномодуляторы либо усиливают, либо ослабляют иммунный ответ организма. Иммунный ответ - сложный процесс межклеточного взаимодействия различных типов лимфоидных клеток с участием специфических гормонов, вследствие которого В-клетки активно синтезируют специфические антитела против данного антигена.

Антитела, однородные по структуре и специфичности, называют моноклональными антителами.

Способы усиления иммунного ответа по типу воздействия разделяют на активные и пассивные, а также на специфические и неспецифические. Активную иммунизацию вызывают вакцины на основе рекомбинантных протективных антигенов, живых гибридных носителей, выступающих в качестве иммунобиопрепаратов. В формировании пассивного неспецифического иммунитета участвуют интерфероны, интерлейкины. Поликлональные антитела к инфекционным агентам вызывают пассивный иммунитет и представлены различными сыворотками. Сыворотки - это всегда готовые антитела.

По способу получения вакцины делят на живые вакцины с ослабленной вирулентностью и неживые вакцины (молекулярные анатоксины - дифтерийный, столбнячный, ботулинический).

Живые вакцины могут быть как вирусного происхождения (например, для профилактики оспы, кори, гриппа, краснухи, полиомиелита), так и бактериального происхождения для профилактики сибирской язвы, чумы, туберкулеза и др.

Существуют также комбинированные вакцины (поливакцины), состоящие из нескольких моновакцин, например АКДС (дифтерийная, столбнячная, коклюшная).

Вакцина для профилактики полиомиелита является поливалентным препаратом из трех ослабленных штаммов вируса полиомиелита.

В ответ на введение вакцины в организме человека или животного вырабатываются антитела к патогенному микроорганизму, которые при последующей инфекции приводят к инаktivации патогена, блокируя его пролиферацию, что не позволяет развиваться заболеванию.

Задача 2.

Вакцины на основе рекомбинантных протективных антигенов, живых гибридных носителей как иммунобиопрепараты вызывают активную иммунизацию посредством возникновения в организме человека или животного антител, вызывающих блокировку пролиферации патогенного микроорганизма, что не позволяет развиваться заболеванию. Сюда относятся живые и аттенуированные вакцины, получаемые путем культивирования штамма либо в курином эмбрионе, либо в других культурах животных клеток. Примером дивергентной вакцины (с общим протективным антигеном у непатогенного для человека микроорганизма и с патогенным для человека возбудителем инфекции) служит вакцина против натуральной оспы человека, в

которой использован непатогенный для человека вирус оспы коров. Кроме того, это и БЦЖ-вакцина (с родственными в антигенном отношении микобактериями бычьего типа).

Далее можно отметить рекомбинантные вакцины (выделенный ген вируса вставляют с помощью вектора в дрожжевую клетку или в клетку кишечной палочки), к примеру вакцина против гепатита В.

Кроме того, существуют комбинированные вакцины, в частности АКДС (дифтерийный, столбнячный анатоксины и коклюшные корпускулярные антигены).

Неживые вакцины (инактивированные) включают в себя убитые культуры патогенных бактерий или вирусов (цельноклеточные, цельновирусные вакцины) или комплексы из патогенных микробов с протективными антигенами (субклеточные, субвирионные вакцины).

В молекулярных вакцинах антиген находится в виде фрагментов его молекул, определяющих специфичность антигенности, т.е. в виде эпитопов, детерминант.

Задача 3.

Благодаря сыворотке организм человека защищен пассивным иммунитетом, соответственно, готовыми антителами. В случае введения вакцины организм человека в ответ на полученный антиген сам вырабатывает антитела. Для массового производства сывороток проводят иммунизацию домашних животных, например ослов и лошадей. Очень важно, чтобы сыворотки, полученные таким путем, постоянно контролировали по такому показателю, как титр антител у животных, и в момент взятия крови содержали бы максимальное количество антител.

Технология получения сывороток, в отличие от вакцин, несложна. Вначале выделяют плазму крови, потом удаляют из нее фибрин. Это один способ получения сыворотки.

Можно получать сыворотки из культивируемых животных клеток, однако здесь главной проблемой является обеспечение стабильного роста животных клеток. Очень часто изолированные клетки животных просто не делятся *in vitro*. Именно поэтому для получения эффективного результата нужно, чтобы эти клетки значительно преобладали в культуре, быстро адаптировались к новым условиям и быстро росли при полной стерильности процесса и сред. Вода также должна быть стерильной.

Помимо этого существуют такие проблемы роста животных клеток, как генетическая нестабильность, непостоянство генетических экспрессии, старение.

В качестве материала для культивирования можно использовать почки обезьян, собак, кроликов, куриный эмбрион (14 дней).

Питательные среды должны содержать аминокислоты, белки, липиды, углеводы, витамины, глюкозу, предшественники проста-гландинов, неорганические соли, микроэлементы. Температура культивирования составляет +37 °С.

Консервируют посевной материал клеток (резервный фонд популяции) в жидком азоте при температуре -196 °С в ампулах объемом 1 мл.

Процесс замораживания может иметь негативные последствия: образование кристаллического льда в клетке, обезвоживание, повышение концентрации растворенных веществ, поэтому замораживание животных клеток осуществляют в малых объемах (1 мл) с использованием криопротекторов, а скорость замораживания/размораживания колеблется в строго определенных пределах.

Задача 4.

Основной элемент структуры антител - четырехцепочечная молекула, состоящая из двух пар идентичных полипептидных цепей: легких (L) и тяжелых (H). Все цепи соединены дисульфидными связями. К тяжелым цепям ковалентно присоединены олигосахаридные фрагменты. Различают 5 классов иммуноглобулинов человека: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, полипептидные цепи которых образуют глобулярные домены, состоящие из 110-115 аминокислотных остатков. Именно они и определяют биологические свойства иммуноглобулинов. Вариабельные домены легких и тяжелых цепей образуют активный центр антител соответствующей специфичности. Антитела формируются только к небольшим участкам на поверхности молекулы белка, которые называются антигенными детерминантами и представляют собой выпуклые части молекулы, которые могут входить внутрь активного центра антител. В случае бактериальных клеток такими детерминантами служат короткие цепочки из 3-5 остатков Сахаров, образующих стенку бактерий. Низкомолекулярные соединения, в частности лекарственные вещества, сами по себе не могут вызывать образование антител. Такие соединения называют гаптенами. Однако если они присоединяются к макромолекуле, организм начинает вырабатывать к ним антитела.

На первой стадии иммунохимической реакции происходит «склеивание» антигена и антитела, а вторая идет с образованием комплексов сложного состава, что определяется помутнением раствора либо выпадением осадка. Так, если в пробирку с раствором, содержащим постоянную концентрацию антител и меченого антигена, добавить различные количества немеченого антигена, то концентрация комплекса антиген-антитело с меткой будет обратно пропорциональна концентрации немеченого антигена. Для расширения пределов чувствительности и повышения специфичности иммунохимических тестов в один из компонентов системы вводят маркер, концентрацию которого можно легко определить.

Задача 5.

Самые важные области применения иммунохимического анализа - контроль банков крови, обнаружение возбудителей во внешней среде, диагностика инфекционных заболеваний, диагностика диабета. Иммунодиагностические тест-системы с использованием поликлональных антител созданы практически для

всех лекарственных препаратов, однако наиболее широко распространено использование моноклональных антител, так как они являются практически чистыми реагентами, обладают стабильными характеристиками и доступны в неограниченных количествах.

Схема получения моноклональных антител. Каким-либо синтетическим конъюгированным антигеном иммунизируют мышей. Затем лимфоциты из селезенки мыши сливают с помощью ПЭГ с клетками стабильной миеломной линии. Из полученных гибридных клеток отбирают только те, которые унаследовали от клеток селезенки способность продуцировать антитела к ЛС, а от миеломных (опухолевых) клеток - способность к неограниченному росту. Их культивируют и получают клон клеток, продуцирующих антитела к лекарственному препарату. Этот клон прививают мышам для получения асцитных опухолей, и уже из асцитной жидкости выделяют антитела.

При определении хорионического гонадотропина методом твердофазного ИФА на полистирольные шарики сорбируют моноклональные антитела к хорионическому гонадотропину. К сенсibilизированным шарикам добавляют исследуемую пробу (мочу) и конъюгат, состоящий из маркера и моноклональных антител к другой детерминанте гормона. В результате иммунологической реакции хорионический гонадотропин связывается одной детерминантой с моноклональными антителами, иммобилизованными на поверхности шариков, а другой - с моноклональными антителами конъюгата с маркером (фермент пероксидаза). Затем шарики отмывают от всех несвязавшихся компонентов мочи и определяют активность фермента в составе иммунных комплексов с помощью субстратхромогенной смеси. Степень окраски раствора прямо пропорциональна количеству хорионического гонадотропина в образце мочи.

Критерии оценки:

– «отлично» выставляется студенту, если он правильно и полно отвечает на вопросы, изложенные в задании, свободно владеет речью, показывая связность и последовательность в изложении, оперирует правильными формулировками и терминами, демонстрирует полное понимание материала и способность к обоснованию своего ответа, четко и последовательно выполняет манипуляции, знает цели, показания и противопоказания контролируемых методик, владеет основными правилами деонтологии и врачебной этики;

– «хорошо» выставляется студенту, если он правильно и полно отвечает на вопросы, изложенные в задании, владеет речью, показывая связность и последовательность в изложении, оперирует правильными формулировками и терминами, демонстрирует понимание материала и способность к обоснованию своего ответа, четко и последовательно выполняет манипуляции, но допускает единичные ошибки, которые устраняет при указании на них, владеет основными правилами деонтологии и врачебной этики;

– «удовлетворительно» выставляется студенту, если студент обнаруживает знание и понимание основных положений в вопросах полученного задания, но допускает неточности в формулировке ответа, делает частичные ошибки в изложении, нарушает последовательность, допускает ошибки и неточности, имеет незначительные нарушения правил деонтологии и врачебной этики;

– «неудовлетворительно» выставляется студенту, если студент не знает большую часть учебного материала, допускает ошибки в формулировках и терминах, искажающие смысл заданного вопроса, беспорядочно и непрофессионально излагает учебный материал, не соблюдает последовательность действий в алгоритмах манипуляций, при объяснении этих действий показывает полное незнание цели, показаний и противопоказаний контролируемого метода, не соблюдает правил этики и деонтологии.

Составители:

Заведующий кафедрой фармацевтической технологии, доцент

В.В. Гордеева

Доцент кафедры фармацевтической технологии, к.фарм.н.

И.А. Мурашкина

Ассистент кафедры фармацевтической технологии, к.фарм.н.

И.Б. Васильев