

Т.П. Прищеп, В.С. Чучалин,  
К.Л. Зайков, Л.К. Михалева,  
Л.С. Белова

# ОСНОВЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

---

**ВЫСШЕЕ  
ОБРАЗОВАНИЕ**

---



*Серия «Высшее образование»*

**Т. П. Прищеп  
В. С. Чучалин  
К. Л. Зайков  
Л. К. Михалева  
Л. С. Белова**

# **ОСНОВЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

**Учебное пособие**

Рекомендуется Учебно-методическим объединением  
по медицинскому и фармацевтическому образованию  
вузов России в качестве учебного пособия  
для студентов, обучающихся по специальности  
060108 (040500) — Фармация

**Ростов-на-Дону  
Феникс  
Томск  
Издательство НТЛ  
Сибирский Государственный  
Медицинский Университет  
2006 .**

УДК 615.1:574(075)  
ББК 52.82+28.087я73  
КТК 311  
О-753

**Рецензенты:**

*Турецкова В.Ф.*, профессор, доктор фармацевтических наук, зав. кафедрой фармацевтической технологии Алтайского государственного медицинского университета;

*Бекетов Б.Н.*, профессор, доктор фармацевтических наук, зав. кафедрой фармацевтической технологии Тюменской государственной медицинской академии;

*Сампиев А.М.*, профессор, доктор фармацевтических наук, зав. кафедрой фармации Кубанской государственной медицинской академии

**Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л.,  
Михалева Л.К., Белова Л.С.**

**О-753** Основы фармацевтической биотехнологии: Учебное пособие / Т.П. Прищеп, В.С. Чучалин, К.Л. Зайков, Л.К. Михалева, Л.С. Белова. — Ростов н/Д.: Феникс; Томск: Издательство НТЛ, 2006. — 256 с. — (Высшее образование).

ISBN 5-222-08883-9 (Феникс)

ISBN 5-89503-246-X (Издательство НТЛ)

По определению ученых всего мира XXI век будет веком биотехнологий.

В сфере производства лекарственных средств биотехнология вытесняет традиционные технологии, открывает принципиально новые возможности. Биотехнологическим способом производят генно-инженерные белки (интерфероны, интерлейкины, инсулин, вакцины против гепатита и т.п.), ферменты, диагностические средства (тест-системы на наркотики, лекарственные вещества, гормоны и т.п.), витамины, антибиотики, биодеградируемые пластмассы, биосовместимые материалы.

В учебном пособии приведены принципы создания и технологические схемы производства фармацевтических продуктов. Предназначено для студентов фармацевтических факультетов медицинских вузов.

ISBN 5-222-08883-9 (Феникс)

УДК 615.1:574(075)

ISBN 5-89503-246-X (Издательство НТЛ)

ББК 52.82+28.087я73

© Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л., Михалева Л.К., Белова Л.С., 2006

© Сибирский Государственный Медицинский Университет, 2006

© Оформление: изд-во «Феникс», 2006

© Оформление: Издательство НТЛ, 2006

**Содержание**

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О БИОТЕХНОЛОГИИ .....	8
Глава 2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ .....	14
Глава 3. ДНК, РНК И СИНТЕЗ БЕЛКА .....	20
Глава 4. ТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК, ИЛИ ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ .....	33
Глава 5. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА.....	43
5.1. Состав питательной среды .....	44
5.2. Приготовление посевного материала .....	47
5.3. Культивирование.....	48
5.4. Аппаратурное оформление биотехнологического процесса. Биореакторы.....	54
5.5. Повышение эффективности ферментации.....	61
5.6. Методы контроля биомассы и количества клеток при культивировании. Апоптоз и некроз клеток .....	63
5.7. Выделение продуктов биосинтеза .....	65
5.8. Получение готовой продукции .....	68
Глава 6. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА, ПОЛУЧЕННЫЕ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ .....	76
6.1. Моноклональные антитела как лекарственные средства ....	76
6.2. Тромболитики и антикоагулянты .....	78
6.3. Аминокислоты .....	87
6.4. Синтез L-аскорбиновой кислоты .....	89
6.5. Гормональные препараты.....	93
6.6. Вакцины .....	103
6.7. Цитокины .....	106
Глава 7. Антибиотики .....	117
7.1. Классификация антибиотиков.....	122
7.2. Производство антибиотиков .....	124
7.3. Частная технология антибиотиков .....	128
Глава 8. ФЕРМЕНТЫ. ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ....	148
8.1. Промышленное производство ферментов, получаемых биотехнологическими методами .....	149

8.2. Иммобилизация как путь повышения эффективности и стабильности .....	156
Глава 9. ПРЕПАРАТЫ НОРМОФЛОРЫ .....	170
9.1. Характеристика нормофлоры человека .....	170
9.2. Дисбактериоз. Причины возникновения, профилактика и лечение .....	175
9.3. Производство препаратов нормофлоры .....	177
9.4. Номенклатура препаратов нормофлоры .....	182
Глава 10. БИОПРЕПАРАТЫ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ .....	187
10.1. Культура изолированных клеток, тканей и органов растений .....	187
10.2. Особенности культивирования изолированных клеток и тканей растений .....	188
10.3. Методы культивирования изолированных клеток и тканей .....	190
10.4. Культура растительных клеток как источник лекарственных веществ .....	197
Глава 11. БИОДЕГРАДАЦИЯ ТОКСИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ И УТИЛИЗАЦИЯ БИОМАССЫ .....	203
11.1. Метаболические пути биodeградации ксенобиотиков, созданных методом генной инженерии .....	204
11.2. Утилизация крахмала и сахаров .....	207
11.3. Основные санитарные и экологические требования к производству биопрепаратов .....	210
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ИТОГОВОЙ АТТЕСТАЦИИ .....	213
КРАТКИЙ СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ, используемых в биотехнологии (за основу взят список по Б. Глику, Дж. Пастернаку) .....	228
Ответы на тестовые задания к итоговой аттестации .....	249
Список использованной литературы .....	250

## ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология (БТ) входит в круг интересов представителей многих специальностей, имеющих разное базовое образование. Как научная дисциплина и область практической деятельности БТ сформировалась со времени появления антибиотиков. В 50-е годы XX века были разработаны и освоены в производстве питательные среды, в 60-е – вакцины, в 70-е – сконструированы и внедрены новые виды типовых технологических процессов и оборудования для их реализации. По определению большинства ученых, XXI век будет веком БТ. Этому способствуют бурное развитие молекулярной биологии и генетики, острая потребность в новых технологиях, призванных улучшить здравоохранение, охрану окружающей среды, ликвидировать нехватку продовольствия, минеральных ресурсов.

БТ – это технологические процессы с использованием биотехнологических систем – живых организмов и компонентов живой клетки. Системы могут быть разными – от микробов и бактерий до ферментов и генов. БТ – это производство, основанное на достижениях современной науки: генетической инженерии, физико-химии ферментов, молекулярной диагностики и молекулярной биологии, селекционной генетики, микробиологии, биохимии, химии антибиотиков.

В сфере производства лекарственных средств БТ вытесняет традиционные технологии, открывает принципиально новые возможности. Биотехнологическим способом производят генно-инженерные белки (интерфероны, интерлейкины, инсулин, вакцины против гепатита и т.п.), ферменты, диагностические средства (тест-системы на наркотики, лекарственные вещества, гормоны и т.п.), витамины, антибиотики, биodeградируемые пластмассы, биосовместимые материалы.

Особая роль отводится сельскохозяйственной БТ. Это создание и культивирование трансгенных растений, микробиологический синтез средств защиты растений, производство кормов, в том числе с использованием ферментов. Для России актуальны такие направления, как ресурсная БТ (использование биосистем для извлечения полезных ископаемых) и биотехнологическая (с использованием бактериальных штаммов) утилизация промышленных и бытовых отходов, очистка

сточных вод, обеззараживание воздуха. Клонирование живых организмов может скоро перейти из раздела научных разработок в разряд практической БТ.

БТ является одной из самых наукоемких, перспективных и в экономическом плане высокорентабельных отраслей производства. Большая часть коммерческих разработок в области БТ приходится на США, где действуют более 1500 биотехнологических компаний (во всем мире свыше 3000). В современной биологии и БТ превосходство США очевидно, в области фундаментальных биологических исследований достижения американской науки составляют около 80% общемировых. Значительный вклад в развитие биотехнологии внесли крупнейшие химические и фармацевтические концерны (Monsanto, Du Pont, American Cyanamid, Eli Lilly, Merck, Novartis, Hoffman-La-Roche, Genentech и др.). В других странах, где инвестиционный климат не столь благоприятен и бизнес менее активен, главную роль в создании биотехнологических предприятий играют крупные корпорации и государство. Так, правительство Японии объявило БТ национальным приоритетом. Неуклонно развивается европейская биотехнологическая индустрия (свыше 600 биотехнологических компаний).

В России развитию биологии и генетики долгое время препятствовали на государственном уровне, но несмотря на это к концу 80-х годов прошлого века все-таки был создан значительный научный и технологический потенциал. К середине 90-х годов в связи с внедрением рыночных механизмов в экономику микробиологические и ферментные производства были практически свернуты как нерентабельные, значительная часть научных разработок осталась без внедрения. Негативную роль сыграл также отток научных кадров за рубеж. «По уровню развития БТ мы не входим в число не только развитых, но и развивающихся стран. Ситуация не изменится пока мы не поставим во главу фундаментальную науку. БТ высокотехнологична, поэтому можно смело сказать – нет в стране фундаментальной науки, нет и не будет БТ. Всеми виной отсутствие финансирования» (А.С. Спирин, академик РАН).

Несмотря на известные трудности в стране еще имеются биотехнологические разработки мирового уровня, внедрение которых незамедлительно принесло бы ощутимую пользу всему обществу. Так, средняя отдача нефтяных месторождений в России не превышает 50%. Новая уникальная микробиологическая технология регулирования микрофлоры пластов, разработанная в Институте микробиологии РАН, уже позволила компании «Татнефть» получить дополнительно около полу-

миллиона тонн «черного золота». Извлечение металлов из руды с помощью микробного окисления и последующего электролиза дает возможность не только использовать «бедное» сырье, но и позволяет ограничить выброс в атмосферу вредных серосодержащих газов, образующихся в процессе обжига руды при традиционной технологии. По новой технологии Института микробиологии РАН с 2001 г. в Красноярском крае на золотодобывающем комбинате работают 8 ферментеров.

Закончена работа над новым способом снижения концентрации метана в шахтах с использованием метанотрофных бактерий. Разработаны и производятся флокулянты для фильтрации воды в очистных сооружениях, созданы оригинальные технологии производства ферментов для стиральных порошков (Гос. НИИ генетики РАН).

В России имеются около тридцати молекулярно-биологических лабораторий мирового уровня. Но без государственной поддержки фундаментальных исследований и соответствующих научных школ, без реализации комплексной инновационной программы в области БТ Россия не сможет стать в XXI веке полноправным участником мирового биотехнологического рынка.

Бесусловно, благодаря уникальным возможностям БТ ей отводится важнейшая роль в решении актуальных медицинских проблем и, в частности, в создании лекарственных препаратов.

Цель биотехнологических исследований – максимальное повышение эффективности каждого из этих этапов и поиск микроорганизмов, с помощью которых можно получить целевой продукт.

## Глава 1. ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О БИОТЕХНОЛОГИИ

Современные биотехнологические производства – сложный комплекс взаимосвязанных биофизических, биохимических и физико-химических процессов; в этих технологических процессах производство и биология представляют единое целое.

БТ – это использование культур клеток, бактерий, животных, растений, метаболизм и биологические возможности которых обеспечивают выработку специфических веществ. В фармацевтической промышленности БТ охватывает разработку вакцин, синтез гормонов, ферментов, интерферонов, антибиотиков, аминокислот, витаминов, алкалоидов, полисахаридов и других биологически активных веществ (БАВ).

В историческом смысле БТ возникла, когда дрожжи были впервые использованы при изготовлении пива, а бактерии – для получения йогурта.

С 1961 г. БТ тесно связана с исследованиями в области промышленного производства коммерческих продуктов при участии живых организмов, биологических систем и процессов. С этого времени БТ встала на прочный фундамент микробиологии, биохимии и промышленной инженерии.

Промышленный биотехнологический процесс, в котором для производства коммерческих продуктов используются микроорганизмы, обычно состоит из трех ключевых этапов:

1. Исходная обработка: обработка сырья для использования в качестве источника питательных веществ для микроорганизма-мишени.
2. Ферментация и биотрансформация: рост микроорганизма-мишени в большом (обычно более 100 л) биореакторе (ферментация) с последующим образованием нужного метаболита, например антибиотика, аминокислоты или белка (биотрансформация).
3. Конечная обработка: очистка целевого продукта от компонентов культуральной среды или от клеточной массы (рис. 1).



Рис. 1. Основные этапы биотехнологического процесса

Наиболее трудным для оптимизации был этап биотрансформации. При использовании природных микробных штаммов выход конечного продукта часто оказывался существенно ниже оптимального. Традиционные схемы генетического усовершенствования бактерий включают скрининг, отбор и тестирование огромного количества колоний. Такие работы высокзатратны, занимают много времени и при этом можно рассчитывать только на усовершенствование уже существующих, передаваемых по наследству свойств штамма, а не на расширение его генетических возможностей. И все же к концу 70-х таким образом были усовершенствованы производственные процессы получения целого ряда конечных продуктов.

С развитием технологии рекомбинантных ДНК природа и возможности БТ резко изменились. Стратегия переноса функциональной единицы наследственности (гена) из одного организма в другой была разработана американскими учеными Стенли Козном и Гербертом Бойером в 1973 г. Появилась возможность оптимизировать этап биотранс-

формации – не просто отбирать высокопродуктивные штаммы микроорганизмов и эукариотических клеток, а создавать принципиально новые, используя их в качестве «биологических фабрик» по производству инсулина, интерферонов, интерлейкинов, гормона роста, вирусных антигенов и множества других белков. Технология рекомбинантных ДНК позволяет получать в больших количествах ценные низкомолекулярные вещества и макромолекулы, которые в естественных условиях синтезируются в минимальных количествах. Технология рекомбинантных ДНК – это быстродействующий, эффективный, мощный инструмент, обеспечивающий создание микроорганизмов с заранее заданными генетическими характеристиками. Этот инструмент может работать не только с микроорганизмами, но с растениями и животными.

На стыке технологии рекомбинантных ДНК и БТ возникла динамичная, высококонкурентоспособная молекулярная БТ (МБТ). Биотехнологическая составляющая МБТ – промышленная микробиология и химическая инженерия; молекулярная составляющая – молекулярная биология, молекулярная генетика бактерий, энзимология нуклеиновых кислот.

#### *История развития МБТ (даты, события)*

- 1917 – введен термин БТ;
- 1943 – произведен в промышленном масштабе пенициллин;
- 1944 – показано, что генетический материал представляет собой ДНК;
- 1953 – установлена структура инсулина, расшифрована структура ДНК;
- 1961 – учрежден журнал «Biotechnology and Bioengineering»;
- 1961–1966 – расшифрован генетический код, оказавшийся универсальным для всех организмов;
- 1953–1976 – расшифрована структура ДНК, ее функции в сохранении и передаче организмом наследственной информации, способность ДНК организовываться в гены;
- 1963 – осуществлен синтез биополимеров по установленной структуре;
- 1970 – выделена первая рестрикционная эндонуклеаза;  
– осуществлен синтез ДНК;
- 1972 – синтезирован полноразмерный ген транспортной РНК;
- 1975 – получены моноклональные антитела;

- 1976 – разработаны методы определения нуклеотидной последовательности ДНК;
- 1978 – фирма «Genentech» выпустила человеческий инсулин, полученный с помощью *E. coli*;
- 1981 – синтезированы фрагменты нуклеиновых кислот;
- 1982 – разрешена к применению в Европе первая вакцина для животных, полученная по технологии рекомбинантных ДНК;
- 1983 – гибридные Ti-плазмиды применены для трансформации растений;
- 1990 – официально начаты работы над проектом «геном человека»;
- 1994–1995 – опубликованы подробные генетические и физические карты хромосом человека;
- 1996 – ежегодный объем продаж первого рекомбинантного белка (эритропоэтина) превысил 1 млрд долларов;
- 1997 – клонировано млекопитающее из дифференцированной соматической клетки;
- 2003 – расшифрован геном (набор генов, присущий организму) человека, содержащий приблизительно 30 тысяч генов и три миллиарда «букв» молекул ДНК.

В последние годы родилась новая отрасль генетики – геномика, изучающая не отдельные гены а целые геномы. Достижения молекулярной биологии и геномной инженерии дали человеку возможность читать генетические тексты вначале вирусов, бактерий, дрожжевых грибов, многоклеточных животных. Например, знание геномной структуры патогенных бактерий очень важно при создании рационально сконструированных вакцин, для диагностики и других медицинских целей.

Апрель 2003 года ознаменовался сенсацией в биологии и медицине: Международный консорциум по составлению генетической карты человека (Центр геномного секвенирования: Вашингтонский университет и Сенгеровский центр в Кембридже) опубликовал заявление, что удалось полностью расшифровать геном человека. Титанический труд сотен исследователей из США, Великобритании, Германии, Франции, Японии и Китая занял более 10 лет и обошелся почти в 3 млрд долларов. При этом были разработаны высокоэффективные технологии и инструменты картирования, такие как коллекции клеток, в которых есть небольшие фрагменты каждой из хромосом или искусственные дрожжевые хромосомы, содержащие крупные фрагменты хромосом человека, бактериальные и фаговые векторы, позволяющие размножить (клонировать) фрагменты ДНК человека. Быстро прогрессировала техника

секвенирования (например, многоканальный капиллярный электрофорез ускорил и удешевил расшифровку первичной структуры ДНК). Созданы компьютерные программы, позволяющие находить гены в расшифрованных участках ДНК.

Ранее было объявлено о «черновой» расшифровке генома человека с точностью 99,9%, сейчас эта точность увеличена на порядок. Осталось заполнить, расшифровать в геноме примерно 400 «дырок». В геноме человека прочитано 3 млрд символов, но решающее значение принадлежит пониманию смысла прочитанного. Из 30 тыс. генов, составляющих геном человека, науке известно о предназначении лишь трети их числа. Полная расшифровка генома человека позволит справиться с множеством недугов, таких как наследственные болезни, рак, заболевания сердечно-сосудистой системы, психические и многие другие.

В России существует своя программа «Геном человека», не зависящая от Международного консорциума, гораздо более скромная по финансовым возможностям. Ученые на уровне генома изучают связь различных генов с наиболее распространенными заболеваниями, ДНК-диагностику, диагностику хромосомных нарушений, молекулярный цитогенетический анализ. Геномная медицина «корректирует» традиционные методы лечения заболеваний с учетом индивидуальных генетических данных каждого человека. Генетическую обусловленность наследственных заболеваний определяют около 3 тыс. генов.

Геномные методы идентификации личности, разработанные и практически реализованные в геномике человека, имеют большое значение для общества. Криминалистика получила в свое распоряжение абсолютно достоверный метод доказательства: для геномной дактилоскопии достаточно лишь одной капли крови, одного волоса, кусочка ногтя, следов пота, спермы, слюны, перхоти.

Молекулярная биотехнология (МБТ) пользуется достижениями разных областей науки и применяет их для создания разнообразных коммерческих продуктов (рис. 2).

Знания и методы биохимии, микробиологии, молекулярной биологии, генетики, химической технологии, электроники позволяют использовать потенциал живых клеток в интересах человека. Знания и умения биотехнолога простираются от биохимии и кинетики физиологических процессов в биосистемах (микроорганизм, клетка, вирус) до математического моделирования, экономики, вопросов управления биотехнологическими процессами, объединенными в сложные системы.

Биотехнология получила возможность воспроизводить нужные продукты в неограниченных количествах, используя новые технологии, позволяющие переносить гены в микробные клетки-продуценты или в



Рис. 2. База и продукты биотехнологии (по Б. Глику, Дж. Пастернаку)

организм млекопитающих (трансгенные животные), синтезировать пептиды, создавать искусственные вакцины – это основные биотехнологические процессы, реализующиеся на уровне клетки или с участием отдельных клеточных структур. В промышленном масштабе подобная БТ представляет биоиндустрию.



## Глава 2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ, ИСПОЛЗУЕМЫЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Характер биологической системы (микроорганизмы, клеточные линии насекомых, растений и млекопитающих, многоклеточные организмы) исключительно важен для биотехнологического процесса. Во многих случаях именно генетически модифицированная самовоспроизводящаяся биологическая единица (микроорганизм, вирус, растение или животное) является конечным коммерческим продуктом.

**Прокариоты и эукариоты.** Все живые организмы принято делить на две основные группы: прокариоты и эукариоты. Приблизительно 1,5 млрд лет назад произошел переход от маленьких клеток со сравнительно простой внутренней структурой (так называемых *прокариот*, к которым относятся различные бактерии) к большим по размеру и значительно более сложно устроенным *эукариотическим клеткам*, подобным клеткам высших животных и растений.

*Основные структурные различия про- и эукариот:*

- наличие или отсутствие ядра, содержащего хромосомную ДНК;
- строение и химический состав клеточной стенки;
- наличие или отсутствие субклеточных цитоплазматических оргanelл.

В прокариотической бактериальной клетке хромосомная ДНК находится непосредственно в цитоплазме, клетка окружена ригидной клеточной стенкой. В клетке нет субклеточных цитоплазматических оргanelл (рис. 3). В оптимальных условиях прокариотическая клетка может делиться каждые 20 мин и таким образом давать жизнь более 10 млрд клеток менее чем за сутки.

В эукариотической клетке (рис. 4) имеется ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной мембраной, хромосомная ДНК находится в ядре. В цитоплазме содержатся различные субклеточные оргanelлы: мембраны, окружающие ядро, митохондрии, образующие лабиринт эндоплазматического ретикулума (ЭПР), где синтезируются липиды и мембранные белки. Мембраны формируют стопки уплощенных пузырьков, составляющих *аппарат Гольджи*, который участвует в синтезе и транспорте различных органических молекул. Мембраны окружают *лизосомы* (суб-

клеточные структуры диаметром 0,20–0,5 мкм), содержащие гидролитические ферменты, необходимые для внутриклеточного пищеварения.

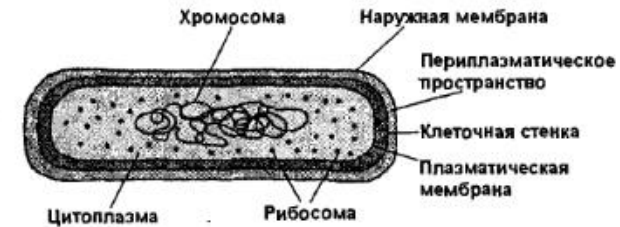


Рис. 3. Схематическое изображение прокариотической бактериальной клетки

Мембраны, таким образом, защищают от действия этих ферментов белки и нуклеиновые кислоты самой клетки. Мембраны также окружают пероксисомы, содержащие окислительные ферменты, производящие и разрушающие опасные высокореакционноспособные перекиси (пероксиды). Обмен между внутриклеточными, окруженными мембранами структурами и внеклеточной средой происходит с помощью эндоцитоза.

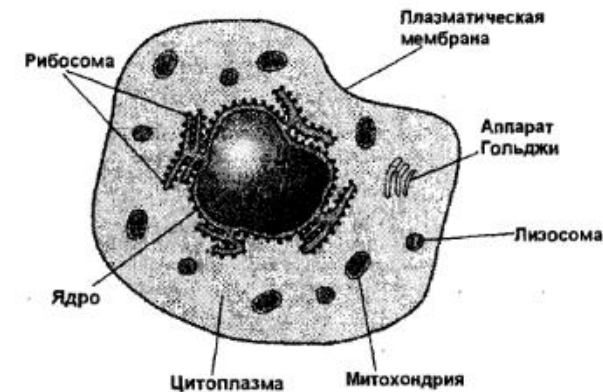


Рис. 4. Схематическое изображение эукариотической животной клетки

Различают две группы бактерий – зубактерии, населяющие почву, воду и другие организмы, и архебактерии, встречающиеся в таких средах обитания, как болота, океанские глубины, очень соленые воды и горячие кислые источники.

Исходя из температурного режима, который предпочитают те или иные микроорганизмы, их подразделяют на *термофилы* (от 45 до 90 °С и выше), *мезофилы* (от 10 до 47 °С) и *психрофилы или психротрофы* (от –5 до 35 °С). Микроорганизмы, активно размножающиеся лишь в определенном диапазоне температур, – полезный инструмент для решения различных биотехнологических задач. Например, термофилы часто служат источником генов, кодирующих термостабильные ферменты, а генетически видоизмененные психротрофы используются при пониженной температуре для биодеградации токсичных отходов, содержащихся в почве и воде.

Среди множества биологических объектов, используемых в МБТ, основными «рабочими лошадками» являются бактерии *Escherichia coli*, одноклеточные дрожжи *Sacharomyces cerevisiae* и различные клеточные линии животного происхождения. Все они играют важную роль в получении белков, кодируемых клонированными генами.

*E. coli* – грамотрицательная непатогенная подвижная палочка длиной менее 1 мкм. Традиционная среда ее обитания – кишечник человека, может также высеваться из почвы и воды. Штаммы *E. coli* культивируются на обогащенных жидких питательных средах, содержащих аминокислоты, витамины, соли, микроэлементы и источник углерода. *E. coli* можно культивировать в аэробных и анаэробных условиях, но для оптимальной продукции рекомбинантных белков *E. coli* и другие микроорганизмы обычно выращивают в аэробных условиях. Рост клеточной массы и продукция белка лимитируются содержанием в питательной среде растворенного кислорода, для этого в ферментерах создают условия аэрации.

Кроме *E. coli* в МБТ используют множество других микроорганизмов, которые подразделяют на две группы:

- микроорганизмы как источники специфических генов (например, ген, кодирующий стабильную ДНК-полимеразу, которая используется в широкоприменяемой полимеразной цепной реакции – ПЦР; этот ген был выделен из термофильных бактерий и клонирован в *E. coli*).
- микроорганизмы, созданные генноинженерными методами для решения определенных задач (например, различные штаммы *Corynebacterium glutamicum*, генетически модифицированные с целью повышения продукции промышленно важных аминокислот).

*Saccharomyces cerevisiae* – непатогенные одноклеточные организмы с диаметром клетки около 5 мкм, во многих отношениях представляют эукариотический аналог *E. coli*. *S. cerevisiae* размножаются почкованием, их способность к превращению сахара в этанол и углекислый газ издавна использовалась для изготовления напитков и хлеба. Клетки дрожжей делятся каждые 1,5–2 ч. *S. cerevisiae* является удобной моделью для исследования других эукариот, в т.ч. человека, так как многие гены, ответственные за регуляцию клеточного деления *S. cerevisiae*, сходны с таковыми у человека. Это способствовало идентификации и характеристике генов человека, отвечающих за развитие новообразований. Генетическая система дрожжей является неперенным участником всех исследований по изучению ДНК человека.

Синтезированный бактериальной клеткой эукариотический белок часто подвергают ферментативной модификации, присоединяя к белковой молекуле низкомолекулярные соединения, что необходимо для правильного функционирования белка. Однако *E. coli* и другие прокариоты не способны осуществлять эту модификацию, поэтому для получения полноценных эукариотических белков используют *S. cerevisiae* и другие виды дрожжей.

В качестве биологических систем в МБТ используют культуру эукариотических клеток. Кусочек ткани определенного организма (насекомого, растения, млекопитающего) обрабатывают протеолитическими ферментами (трипсином), расщепляющими белки межклеточного материала; при работе с растительными клетками используют ферменты, разрушающие клеточную стенку. Высвободившиеся клетки помещают в питательную среду, содержащую аминокислоты, антибиотики, витамины, соли, глюкозу, факторы роста. В этих условиях (деление клеток млекопитающих происходит примерно раз в сутки) на стенке емкости с культурой образуется клеточный монослой. Если после этого не перенести клетки в емкость со свежей питательной средой, рост прекращается. Обычно удается переносить (перевивать, субкультивировать) и поддерживать до 50–100 клеточных генераций исходной (первичной) клеточной культуры, затем клетки начинают терять способность к делению и гибнут.

В МБТ устойчивые линии используют для крупномасштабного производства вакцин и рекомбинантных белков, для размножения вирусов и выявления белков, которые кодируются клонированными последовательностями ДНК.

## Тест-контроль к главам 1–2

## Выберите правильные ответы:

1. Определение «Биотехнология – это использование культур клеток, бактерий, животных, растений, метаболизм и биологические возможности которых обеспечивают получение разнообразных лекарственных форм»:

- А – верно;
- Б – не верно;
- В – требует уточнения.

2. Геномика изучает:

- А – отдельные гены;
- Б – совокупность структурных компонентов ДНК;
- В – совокупность всех генов организма;
- Г – мимические проявления при произношении имени Гена;
- Д – механизмы генетических изменений (мутаций).

3. В биотехнологии понятию «биообъект» соответствуют следующие определения:

- А – организм, на котором испытывают новые БАВ;
- Б – организмы, вызывающие микробную контаминацию технологического оборудования;
- В – фермент, используемый для генно-инженерных процессов;
- Г – организм, продуцирующий БАВ;
- Д – фермент, используемый в лечебных целях.

4. Отличительные особенности эукариотической клетки:

- А – большой размер;
- Б – наличие ядра;
- В – ригидная клеточная стенка;
- Г – отсутствие субклеточных органелл;
- Д – хромосомная ДНК в цитоплазме.

5. Отличительные особенности прокариотической клетки:

- А – малый размер;
- Б – отсутствие ядра;
- В – наличие субклеточных органелл;
- Г – многослойная клеточная стенка;
- Д – хромосомная ДНК в ядре.

6. Оптимальный температурный режим развития микроорганизмов-мезофилов составляет:

- А – 45–90 °С;
- Б – 10–47 °С;
- В – 37 °С;
- Г – от –5 до 35 °С;
- Д – свыше 90 °С.

7. Типичные направления использования микроорганизмов-психрофилов:

- А – источники генов, кодирующих термолabile ферменты;
- Б – источники генов, кодирующих термостабильные ферменты;
- В – утилизация токсических отходов;
- Г – производство спирта этилового;
- Д – производство биогаза.

8. В качестве биологических объектов в биотехнологии используют:

- А – *Pseudomonas aeruginosa*;
- Б – *Staphylococcus aureus*;
- В – *Escherichia coli*;
- Г – *Clostridium tetani*;
- Д – культуру эукариотических клеток.

9. Способностью превращать (сбраживать) сахар в этанол обладают:

- А – *Aspergillus oryzae*;
- Б – *Aspergillus terricola*;
- В – *Escherichia coli*;
- Г – *Bacillus subtilis*;
- Д – *Saccharomyces cerevisiae*.

10. Отличия *Saccharomyces cerevisiae* от других прокариотических продуцентов:

- А – непатогенность;
- Б – аэробный тип развития;
- В – анаэробный тип развития;
- Г – способность продуцировать полноценные эукариотические белки;
- Д – неспособность продуцировать полноценные эукариотические белки.

### Глава 3. ДНК, РНК И СИНТЕЗ БЕЛКА

Простые органические молекулы, такие, как аминокислоты или нуклеотиды, ассоциируют с образованием больших полимеров. Две аминокислоты соединяются пептидной связью, два нуклеотида – фосфодиэфирной. Последовательное повторение этих реакций ведет к образованию линейных полимеров, называемых соответственно полипептидами и полинуклеотидами. Полипептиды или белки и полинуклеотиды в форме ДНК и РНК считаются наиболее важными компонентами. Универсальные «кирпичики», из которых состоят белки, – это всего лишь 20 аминокислот, а молекулы ДНК и РНК построены только из четырех типов полинуклеотидов. Клетка содержит оба типа полинуклеотидов – ДНК и РНК; в ходе эволюции они специализировались и работают сообща, выполняя каждый свою функцию. Структура полинуклеотидов хорошо приспособлена для хранения и передачи информации. Химические различия между двумя типами полинуклеотидов делают их приспособленными для решения разных задач. Например, ДНК – хранилище генетической информации, так как ее молекула более стабильна, чем молекула РНК. Частично это обусловлено тем, что при наличии в РНК двух гидроксильных групп этот полинуклеотид в большей степени подвержен гидролизу.

Следовательно, вся информация о строении и функционировании любого живого организма содержится в закодированном виде в его генетическом материале, основу которого составляет ДНК. ДНК – длинная двухцепочечная полимерная молекула. В этой скрученной двойным жгутом гигантской молекуле «записаны» все признаки организма. Последовательность мономерных единиц (дезоксирибонуклеотидов) в одной ее цепи соответствует (комплементарна) последовательности дезоксирибонуклеотидов в другой. Принцип комплементарности обеспечивает идентичность исходных и новосинтезированных молекул ДНК, образующихся при удвоении (*репликации*).

Механизм комплементарного матричного копирования занимает центральное место в процессах переноса информации в биологических системах. Генетическая информация каждой клетки закодирована в последовательности оснований ее полинуклеотидов, и эта информация

передается из поколения в поколение благодаря комплементарности спаривания оснований.

Индивидуальными генетическими элементами со строго специфичной нуклеотидной последовательностью, кодирующими функциональные белки или РНК, являются *гены*. Гены находятся в ядре клетки, в хромосомах. В некоторых генах всего 800 пар нуклеотидов, в других – около миллиона. У человека 80–90 тыс. генов. Одни гены, называемые структурными, кодируют белки, другие – только молекулы РНК. Информация, содержащаяся в генах, которые кодируют белки, расшифровывается в ходе двух последовательных процессов: синтеза РНК, носящего название *транскрипции* и синтеза белка – *трансляции*. Сначала на определенном участке ДНК, как на матрице, синтезируется мРНК (информационная, матричная РНК) – в клетках животных этот процесс осуществляется в ядре. Затем, перенеся информацию из ядра в цитоплазму, в ходе согласованной работы многокомпонентной системы при участии тРНК (транспортных РНК), мРНК, ферментов и различных белковых факторов осуществляется синтез белковой молекулы. Все эти процессы обеспечивают правильный перевод зашифрованной в ДНК генетической информации с языка нуклеотидов на язык аминокислот. Аминокислотная последовательность белковой молекулы однозначно задает ее структуру и функции. Нуклеотиды как субъединицы ДНК, РНК выступают также в качестве переносчиков энергии.

Структура ДНК (рис. 5) – это линейный полимер. Его мономерные единицы (нуклеотиды) состоят из азотистого основания, пятиуглеродного сахара (пентозы) и фосфатной группы. Фосфатная группа присоединена к 5'-атому углерода моносахаридного остатка, органическое основание – к 1'-атому. Каждому нуклеотиду присвоено название, соответствующее названию входящего в его состав уникального основания. Основания в ДНК двух типов – пуриновые (аденин – А и гуанин – G) и пиримидиновые (цитозин – С, тимин – Т, урацил – U).

Нуклеотиды существуют в двух оптических изомерах – L и D. Все без исключения живые организмы для построения своих нуклеотидов используют только D-формы. Присутствие даже малого количества L-формы нуклеотидов ингибирует или полностью блокирует работу ферментов синтеза ДНК.

В ДНК моносахарид представлен 2'-дезоксирибозой, содержащей одну гидроксильную группу, в РНК – рибозой, имеющей две гидроксильные группы. Нуклеотиды соединены друг с другом фосфодиэфирными связями, при этом фосфатная группа 5'-углеродного атома одного

нуклеотида связана с 3'-ОН группой дезоксирибозы соседнего нуклеотида. На одном конце полинуклеотидной цепи находится 3'-ОН группа (3'-конец), на другом – 5'- фосфатная группа (5'-конец).

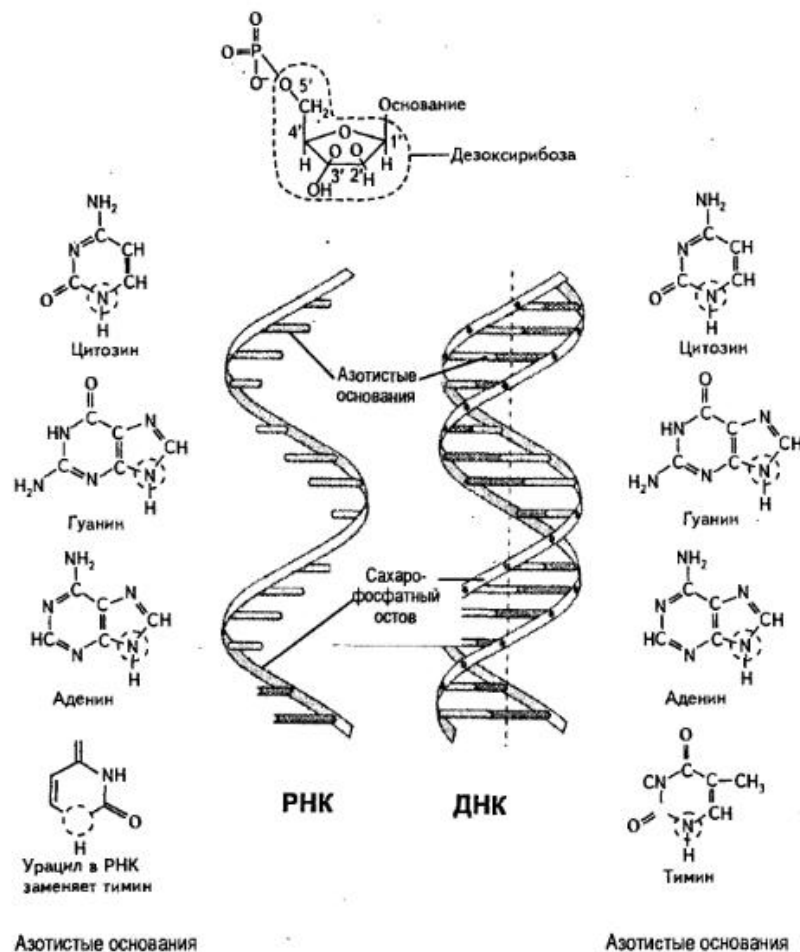


Рис. 5. Модель ДНК, РНК и их структурные формулы азотистых оснований – нуклеотидов. (Штриховая линия выделяет атом азота, через который к основанию присоединяется дезоксирибоза или рибоза)

Нативная ДНК состоит из двух полимерных цепей, образующих спираль. Навитые одна на другую полинуклеотидные цепи удержива-

ются вместе водородными связями, образующимися между комплементарными основаниями противоположных цепей. При этом аденин образует пару только с тимином, гуанин – с цитозином. Пара оснований А-Т стабилизируется двумя водородными связями, пара G-C – тремя. Длина двухцепочечной ДНК обычно измеряется числом пар комплементарных нуклеотидов. Например, ДНК хромосомы 1 человека представляет собой одну двойную спираль длиной 263 миллиона пар нуклеотидов.

Сахарофосфатный состав молекулы, состоящий из фосфатных групп и дезоксирибозных остатков, соединенных 5'-3'-фосфодиэфирными связями, образует «боконины винтовой лестницы», а пары А-Т и G-C – «ее ступеньки». Цепи молекулы ДНК антипаралельны: одна из них имеет направление 3'→5', другая 5'→3'. Нуклеотиды считают парами потому, что в молекуле ДНК две цепочки и их нуклеотиды соединены попарно поперечными связями.

Носитель генетической информации должен удовлетворять двум требованиям – *воспроизводиться (реплицироваться)* с высокой точностью и *детерминировать (кодировать)* синтез белковых молекул. Согласно принципу комплементарности, каждая цепь ДНК может служить матрицей для образования новой комплементарной цепи. Когда клетке необходимо разделить, непосредственно перед этим она копирует молекулу ДНК в своих рибосомах. При этом две нити ДНК расходятся и на каждой из них, как на матрице, собирается дочерняя нить, в точности повторяющая ту, что была соединена с данной нитью в родительской клетке. В итоге появляются две идентичные дочерние хромосомы, которые при делении распределяются по разным клеткам. Так происходит передача наследственных признаков от родителей потомкам у всех клеточных организмов, имеющих ядро. Следовательно, после каждого раунда репликации образуются две дочерние молекулы, каждая из которых имеет такую же нуклеотидную последовательность, как исходная молекула ДНК. Нуклеотидная последовательность структурного гена однозначно задает аминокислотную последовательность кодируемого ею белка. Следовательно, каждая цепь ДНК служит матрицей при синтезе новой комплементарной цепи, а последовательность оснований в синтезируемой (растущей) цепи задается последовательностью комплементарных оснований цепи-матрицы.

Синтез ДНК у про- и эукариот осуществляется при участии множества различных ферментов. Основную роль играет ДНК-полимераза, которая последовательно присоединяет звенья растущей полинуклео-

тидной цепи в соответствии с принципом комплементарности и катализирует образование фосфодиэфирных связей.

Для разделения ДНК разработаны специальные гели на основе агарозы (полисахарид, выделяемый из морских водорослей). Предложена модификация гелеэлектрофореза в агарозном геле, названная *пульс-электрофорез*, позволяющая разделять большие молекулы ДНК.

Определены последовательности нуклеотидов генов многих млекопитающих, включая гены, кодирующие гемоглобин, инсулин, цитохром С. Объём информации о ДНК столь велик (многие миллионы нуклеотидов), что для хранения и анализа имеющихся данных необходимы мощные компьютеры.

Для определения того, какие гены активны в данном типе клеток (идентификация специфических последовательностей), используют метод, именуемый *ДНК-футпринтинг*. Фрагменты ДНК метят  $P^{32}$ , затем расщепляют нуклеазами, разделяют на геле и выявляют на радиоавтографе. Если водный раствор ДНК нагреть до 100 °С и сильно защелочить (рН 13), то комплементарные пары оснований, удерживающие две цепи двойной спирали вместе, разрушаются и ДНК быстро диссоциирует на две цепи. Этот процесс, называемый *денатурацией ДНК*, ранее считался необратимым. Но если комплементарные цепи ДНК выдерживать при температуре 65 °С, они легко спариваются, восстанавливая структуру двойной спирали, – процесс получил название *ренатурации*.

подавляющее большинство генов содержит в закодированном виде информацию о синтезе белков. Полипептидам присуща большая универсальность, они состоят из аминокислот с химически разнообразными боковыми цепочками и способны принимать разные пространственные формы, которые насыщены реакционноспособными участками. Свойства полипептидов делают их идеально подходящими для выполнения разнообразных структурных и функциональных задач. Белки участвуют практически во всех процессах, протекающих в живых системах, они служат катализаторами биохимических реакций, осуществляют транспорт внутри и между клетками, регулируют проницаемость клеточных мембран, из них строятся различные структурные элементы. Белки – не только основной строительный материал живого организма, многие из них – ферменты, управляющие процессами в клетке. Белки участвуют в осуществлении двигательных функций, обеспечивают защиту от инфекций и токсинов, регулируют синтез остальных генных продуктов.

Все аминокислоты имеют сходное химическое строение: к центральному атому углерода присоединен атом водорода, аминогруппа,

карбоксильная группа и боковая цепь. Существует 20 разных боковых групп и соответственно 20 аминокислот: например, в аминокислоте аланин боковой цепью является метильная группа (табл. 1).

Таблица 1

Аминокислоты и их обозначение

1	Аланин	A	11	Лейцин	L
2	Аргинин	R	12	Лизин	K
3	Аспарагин	N	13	Метионин	M
4	Аспарагиновая кислота	D	14	Пролин	P
5	Валин	V	15	Серин	S
6V	Гистидин	H	16	Тирозин	
7	Глицин	G	17	Треонин	T
8	Глутамин	Q	18	Триптофан	W
9	Глутаминовая кислота	ε	19	Фенилаланин	F
10	Изолейцин	I	20	Цистенин	C

Пептидная связь образуется между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой другой. Первая аминокислота белковой молекулы имеет свободную аминогруппу (N-конец), последняя – свободную карбоксильную группу (C-конец).

Длина белковых молекул варьирует от 40 до 1000 аминокислотных остатков; в зависимости от их последовательности и аминокислотного состава молекулы белков принимают разную форму (конфигурацию, конформацию). Многие функционально активные белки состоят из двух и более полипептидных цепей, как идентичных, так и несколько-различающихся. Белки, выполняющие ключевые функции, представляют собой сложные белковые комплексы, состоящие из множества разных полипептидных цепей – субъединиц.

С помощью генетического кода полинуклеотидная последовательность определяет последовательность аминокислот в белке; различные триплеты нуклеотидов кодируют специфические аминокислоты.

Важное «передаточное звено» при переводе генетической информации с языка нуклеотидов на язык аминокислот – РНК (рибонуклеиновые кислоты), которые синтезируются на определенных участках ДНК, как на матрицах, в соответствии с их нуклеотидной последовательностью.

Молекулы РНК несут информацию, они обладают химической индивидуальностью, влияющей на их поведение. Молекула РНК обладает двумя важными свойствами: закодированная в её нуклеотидной после-

довательности информация передаётся в процессе *репликации*, а уникальная пространственная структура определяет характер взаимодействия с другими молекулами и реакцию на внешние условия. Оба этих свойства – *информационное* и *функциональное* – являются необходимыми предпосылками эволюционного процесса. Нуклеотидная последовательность молекулы РНК аналогична наследственной информации, или *генотипу* организма. Пространственная укладка аналогична *фенотипу* – совокупности признаков организма, подверженного действию естественного отбора.

РНК (рис. 5) – линейная полинуклеотидная молекула, отличающаяся от ДНК по двум параметрам:

1. Моносахаридом в РНК является рибоза, содержащая не одну а две гидроксильные группы;
2. Одним из четырех оснований в РНК является урацил, занимающий место тимина.

Существование РНК в виде одной нити обусловлено:

- отсутствием у всех клеточных организмов фермента для катализа реакции образования РНК на матрице РНК; такой фермент есть лишь у некоторых вирусов, гены которых «записаны» в виде двухнитчатой РНК, остальные организмы могут синтезировать молекулы РНК только на ДНК-матрице;
- из-за отсутствия метильной группы у урацила связь между аденином и урацилом малоустойчива и «удержание» второй (комплементарной) нити для РНК является проблемным.

По причине однонитчатости РНК, в отличие от ДНК, не закручивается в спираль, а образует структуры в виде «шпилек», «петель». Спаривание оснований в молекуле РНК происходит таким же образом, как и в ДНК, за исключением того, что вместо пары А–Т, образуется А–У. Комплементарные основания, как и в ДНК, соединены между собой водородными связями.

Существуют три основных типа РНК:

- информационная (мРНК);
- рибосомная (рРНК);
- транспортная (тРНК).

Правильность транскрипции, т.е. ее начало и завершение в нужных *сайтах* (специфических участках), обеспечивают специфические нуклеотидные последовательности в ДНК, а также белковые факторы. Транскрипция на ДНК осуществляется в клеточном ядре. Молекулы мРНК переносят информацию из ядра в цитоплазму, где она использу-

ется при трансляции белков, аминокислотные последовательности которых закодированы в последовательностях нуклеотидов мРНК (т.е., в конечном счете, в ДНК). мРНК связана с *рибосомами*, в которых осуществляется соединение аминокислот с образованием белков. *Рибосомы* – нуклеотидные частицы, в состав которых входит высокополимерная РНК и структурный белок. Биохимическая роль рибосом – синтез белка. Именно на рибосомах происходит соединение отдельных аминокислот в полипептиды, завершающееся образованием белков.

У большинства прокариот транскрипция всех РНК осуществляется с участием одной и той же РНК-полимеразы. У эукариот мРНК, рРНК, тРНК транскрибируются разными РНК-полимеразами.

*С генетической точки зрения ген представляет собой специфическую нуклеотидную последовательность, транскрибируемую в РНК.* Большинство транскрибируемых последовательностей ДНК составляют *структурные гены*, на которых синтезируется мРНК. Конечным продуктом структурного гена является белок. У прокариот структурный ген представляет собой непрерывный участок молекулы ДНК. У эукариот большинство структурных генов состоит из нескольких дискретных (отдельных) кодирующих областей – *экзонов*, разделенных некодирующими областями – *интронами*. По завершении транскрипции эукариотического структурного гена интроны вырезаются ферментами из первичного продукта транскрипции, экзоны сшиваются друг с другом «торец в торец» (*сплайсинг*) с образованием мРНК. Обычно длина экзона составляет от 150 до 200 нуклеотидов, длина интронов варьирует от 40 до 10000 нуклеотидов.

В активно функционирующей клетке примерно 3–5% суммарной РНК приходится на долю мРНК, 90% – на долю рРНК, 4% – на долю тРНК. мРНК может быть представлена десятками различных типов молекул; рРНК – двумя типами. Более крупная рРНК образует с белками *рибонуклеотидный комплекс*, называемый большой рибосомной субъединицей. рРНК меньшего размера – комплекс, называемый малой рибосомальной субъединицей. При синтезе белков субъединицы объединяются с образованием рибосомы. рРНК принадлежит роль главного катализатора в процессе синтеза белка, она составляет более 60% массы рибосомы. В эволюционном аспекте рРНК представляет собой основной компонент рибосомы.

Помимо тысяч рибосом в клетке, активно синтезирующей белки, содержится до 60 различных видов тРНК. тРНК – это линейная одноцепочечная молекула длиной от 75 до 93 нуклеотидов, имеющая несколь-

ко взаимно комплементарных участков, спаривающихся между собой. С помощью специфических ферментов (аминоацил-тРНК-синтетаз) к 3'-концу тРНК присоединяется соответствующая аминокислота. Для каждой из 20-ти аминокислот, из которых состоят все белки, существует, по крайней мере, одна специфическая тРНК. На другом конце молекул тРНК расположена последовательность из трех нуклеотидов, называемая **антикодоном**, она распознает специфический **кодон** в мРНК и определяет, какая аминокислота будет присоединена к растущей полипептидной цепи.

*Трансляция (синтез белка)* осуществляется при участии мРНК, разных тРНК, «нагруженных» соответствующими аминокислотами, рибосом и множества белковых факторов, обеспечивающих инициацию, элонгацию, терминацию синтеза полипептидной цепи.

Нуклеотидная последовательность, в которой закодировано более одного белка, называется **опероном**. Оперон находится под контролем единственного промотора, и при его транскрипции образуется одна длинная молекула мРНК, кодирующая несколько белков.

Синтез мРНК и соответственно синтез белка строго регулируется, так как у клетки недостаточно ресурсов для одновременной транскрипции и трансляции всех структурных генов. Про- и эукариоты постоянно синтезируют только те мРНК, которые необходимы для выполнения основных клеточных функций. Экспрессия остальных структурных генов осуществляется под строгим контролем регуляторных систем, запускающих транскрипцию только в случае возникновения потребности в определенных белках. За включение и выключение транскрипции отвечают дополнительные факторы транскрипции, которые связываются с соответствующими участками ДНК.

При синтезе белковых молекул первичной стадией образования полипептидной цепи белка является процесс активации аминокислот с помощью аденозинтрифосфата. Процесс активации идет при участии ферментов, в результате чего образуются аминокациладенилаты. Затем под действием фермента аминокацил-тРНК-синтетазы (для каждой из 20 аминокислот имеется свой особый фермент) «активированная» аминокислота соединяется с тРНК. Далее комплекс аминокацил-тРНК переносится на рибосомы, где происходит синтез полипептида. Пептидная связь образуется между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой другой. Первая аминокислота белковой молекулы имеет свободную аминогруппу (N-конец), последняя – свободную карбоксильную группу (C-конец).

Сформировавшиеся белки освобождаются из рибосом, а рибосомы после этого могут присоединять новые комплексы аминокацил-тРНК и синтезировать новые белковые молекулы. Рибосомы связаны с мРНК, которая определяет последовательность чередования аминокислот в полипептидных цепочках. Таким образом, целостность и функциональная активность рибосом в клетках – одно из необходимых условий синтеза белковых молекул.



### Тест-контроль к главе 3

#### Выберите правильные ответы:

1. Утверждение «ДНК является хранилищем генетической информации, потому, что ее молекулы в отличие от РНК более стабильны»:

- А – верно;
- Б – не верно;
- В – требует уточнения.

2. Носитель генетической информации должен удовлетворять требованиям:

- А – реплицироваться с высокой точностью;
- Б – не подвергаться химическому гидролизу;
- В – детерминировать синтез белковых молекул;
- Г – выступать в качестве переносчика энергии;
- Д – образовывать замкнутую кольцеобразную структуру.

3. Для разделения молекул ДНК используют:

- А – высаливание;
- Б – обратный осмос;
- В – пульс-электрофорез;
- Г – гелеэлектрофорез;
- Д – электродиализ.

4. Отличие молекулы РНК от молекулы ДНК:

- А – моносахаридом является дезоксирибоза;
- Б – моносахаридом является рибоза;
- В – азотистое основание – тимин;
- Г – азотистое основание – урацил;
- Д – азотистое основание – гуанин.

5. Синтез молекулы ДНК осуществляется:

- А – ДНК-лигазой;
- Б – ДНК-полимеразой;
- В – из L-формы нуклеотидов;
- Г – из D-формы нуклеотидов;
- Д – из смеси D- и L-форм нуклеотидов.

6. Сплайсинг:

- А – вырезание из предшественника мРНК экзонов и ковалентное соединение интронов с образованием зрелых молекул мРНК;
- Б – вырезание из предшественника мРНК интронов и ковалентное соединение экзонов с образованием зрелых молекул мРНК;
- В – синтез зрелых молекул тРНК из путем сшивки отдельных нуклеотидов «торец в торец»;
- Г – вырезание из предшественника мРНК интронов и их ковалентное соединение с образованием зрелых молекул мРНК;
- Д – последовательное ковалентное соединение экзонов и интронов с образованием зрелых молекул мРНК.

7. Кодон:

- А – три соседних нуклеотида мРНК, кодирующих определенную аминокислоту;
- Б – три соседних нуклеотида тРНК, комплементарный нуклеотидам специфического кодона в молекуле мРНК;
- В – три соседних нуклеотида тРНК, кодирующих определенную аминокислоту;
- Г – три соседних нуклеотида тРНК, кодирующих определенную последовательность аминокислот;
- Д – три соседних нуклеотида мРНК, кодирующих определенную аминокислоту.

8. Уникальная пространственная структура молекулы РНК определяет:

- А – процесс репликации;
- Б – генотип;
- В – фенотип;
- Г – характер взаимодействия с другими молекулами и внешними условиями;
- Д – локализацию молекулы РНК.

9. Процессы транскрипции идут:

- А – постоянно с одинаковой скоростью;
- Б – под контролем регуляторных систем;
- В – периодически по мере накопления энергии;
- Г – сопряжено с процессами формирования молекул ДНК;
- Д – со скоростью, пропорциональной формированию структурных генов.

## 10. Оперон:

- А – участок ДНК, содержащий несколько структурных генов;
- Б – участок ДНК, содержащий один структурный ген;
- В – нуклеотидная последовательность, кодирующая один белок;
- Г – нуклеотидная последовательность, кодирующая более одного белка;
- Д – длинная молекула мРНК, кодирующая несколько белков.

#### Глава 4. ТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК, ИЛИ ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Технология рекомбинантных ДНК (также молекулярное клонирование, или генная инженерия) – это совокупность экспериментальных процедур, позволяющих осуществлять перенос генетического материала (ДНК) из одного организма в другой. В настоящее время можно вырезать отдельные участки ДНК, получать нуклеотиды на ДНК-синтезаторах (приборах для автоматического химического синтеза ДНК) практически в неограниченном количестве, определять последовательность нуклеотидов (разделяя, секвенируя их) сотнями в сутки, изменять выделенный ген, вводить его вновь в геном культивируемых клеток или эмбриона животного, где этот измененный ген начинает функционировать. Эксперименты с рекомбинантными ДНК используют крупномасштабно в промышленном производстве БАВ. Эксперименты по клонированию включают следующие этапы:

1. Рестриктазное расщепление из организма-донора нужных генов нативной ДНК (клонлируемая ДНК, встраиваемая ДНК, ДНК-мишень, чужеродная ДНК).
2. Быстрая расшифровка всех нуклеотидов в очищенном фрагменте ДНК, позволяющая определить точные границы гена и аминокислотную последовательность, кодируемую геном.
3. Обработка рестрикционными эндонуклеазами вектора для клонирования, который может реплицироваться в клетке-хозяине.
4. Сшивание ДНК-лигазой двух фрагментов ДНК с образованием новой рекомбинантной молекулы – конструкция «клонлирующий вектор – встроенная ДНК».
5. Введение этой конструкции в клетку хозяина (реципиента), где она реплицируется и передается потомкам. Этот процесс называется трансформацией. После трансформации бактериальная клетка воспроизводит фрагмент клонируемой ДНК миллионами идентичных клеток.
6. Идентификация и отбор клеток, несущих рекомбинантную ДНК (трансформированные клетки).
7. Получение специфичного белкового продукта, синтезированного клетками-хозяевами (рис. 6).

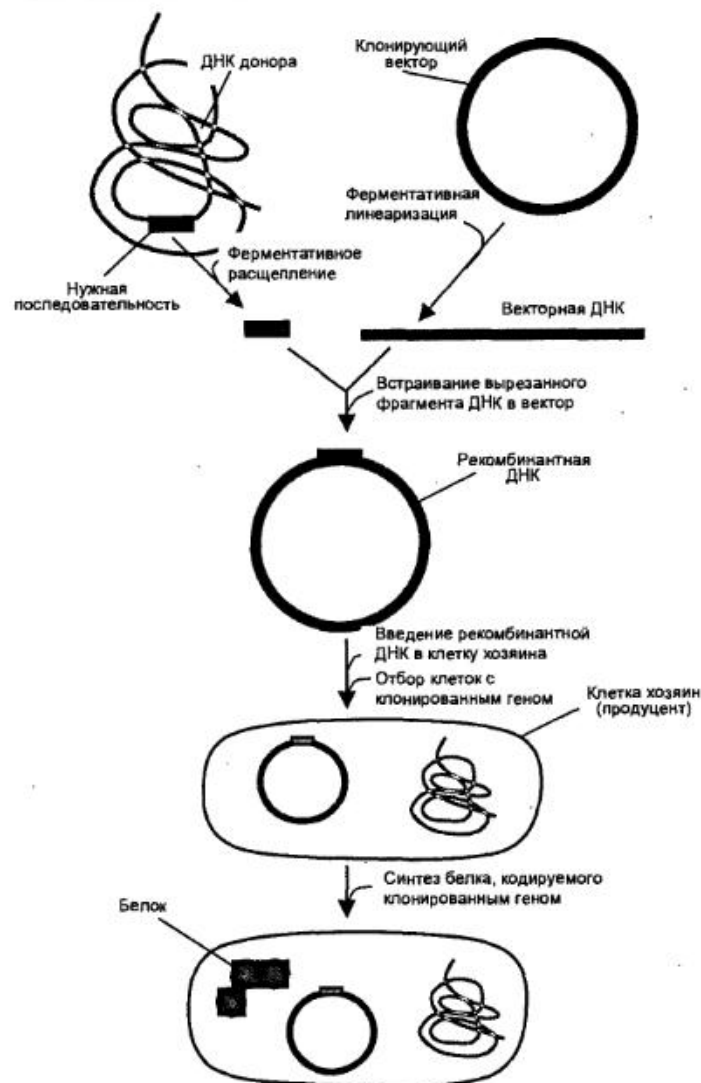


Рис. 6. Клонирование рекомбинантной ДНК: Донорную ДНК расщепляют рестрицирующей эндонуклеазой и встраивают в клонирующий вектор. Полученную конструкцию вводят в популяцию клеток-хозяев, идентифицируют те клетки, которые содержат рекомбинантную ДНК и культивируют их (по Б. Глику, Дж. Пастернаку)

Конструирование рекомбинантных молекул осуществляется с помощью ряда ферментов – обязательного и незаменимого инструмента практически всех этапов этого сложного процесса, прежде всего *ферментов рестрикции* (рестрицирующих эндонуклеаз, рестриктаз). Рестриктазы являются составной частью системы рестрикции – модификации прокариотических клеток. Эта система связана с защитой клеток от проникновения чужеродной ДНК. Система модификации осуществляет метилирование собственной ДНК в сайтах ее узнавания немедленно после репликации; чужеродную ДНК, проникающую в клетку, бактерии гидролизуют с помощью рестриктаз.

Различают три основных класса рестриктаз. Рестриктазы класса I разрывают молекулы ДНК в произвольных точках, рестриктазы I и III классов обладают метилирующей и эндонуклеазной активностью. Ферменты II класса, которые и используются в генной инженерии, состоят из двух отдельных белков: рестрикционной эндонуклеазы и модифицирующей метилазы.

В настоящее время используется свыше 400 различных рестриктаз. Эти ферменты синтезируют самые разнообразные микроорганизмы. Для их культивирования необходимы оптимальные условия (температура, состав и pH среды, концентрация кислорода и т.д.). С целью повышения продуктивности и стандартизации процесса получения этих ферментов клонируют гены рестрицирующих эндонуклеаз в *E. coli*.

Рестриктазы узнают и расщепляют специфические нуклеотидные последовательности в двухцепочечной молекуле ДНК. При молекулярном клонировании важно, чтобы расщепление донорной и векторной ДНК происходило в строго определенных участках (сайтах). Каждый фермент рестрицирующих эндонуклеаз «опознает» в ДНК специфическую последовательность из 4–6 нуклеотидов. Многие рестрицирующие эндонуклеазы вносят разрывы в две цепи ДНК со смещением на несколько нуклеотидов, располагаясь наискось друг от друга. В результате образуются одноцепочечные комплементарные концы с «хвостами» из 4-х нуклеотидов в каждом («липкие» концы). Кроме рестриктаз, расщепляющих нуклеотидную цепь с образованием липких концов, существуют рестриктазы, вносящие разрывы в цепи строго друг против друга с образованием ДНК с «тупыми концами».

Одних ферментов рестрикции при молекулярном клонировании недостаточно, так как водородные связи между теми четырьмя основаниями, которые образуют липкие концы, не столь прочны, чтобы удерживать два объединившихся фрагмента ДНК. Для устранения разрыва в

сахарофосфатном остове молекулы служит фермент *ДНК-лигаза*, катализирующий образование фосфодиэфирных связей между концами полинуклеотидных цепей, которые удерживаются вместе при спаривании липких концов. ДНК-лигаза сшивает и тупые концы.

Таким образом, одна часть рекомбинантной молекулы ДНК несет нужный ген, который предполагается клонировать, другая – содержит информацию, необходимую для репликации в клетке рекомбинантной ДНК. Кроме того, при ДНК-рестрикции образуются разнообразные фрагменты и после их лигирования (соединения фосфодиэфирной связью) с векторной ДНК появляется множество различных комбинаций фрагментов, например, объединяющих между собой фрагменты донорной ДНК и векторные ДНК. Для уменьшения количества последних рестрицированную векторную ДНК обрабатывают щелочной фосфатазой.

Для введения рекомбинантной ДНК применяют два основных вектора:

- 1) Плазмиды.
- 2) Бактериофаги.

*Плазмиды* представляют собой внехромосомный генетический элемент в виде кольцевых молекул ДНК, содержащих 1–3% генома бактериальной клетки. Плазмиды есть у всех бактерий. Одни из них содержат информацию, обеспечивающую их собственный перенос из одной клетки в другую (F-плазмиды), другие – несут гены устойчивости к антибиотикам (R-плазмиды) или специфические наборы генов, ответственных за утилизацию метаболитов (плазмиды деградации). Каждая плазида содержит *сайт начала репликации*, без которого репликация плазмиды в клетке-хозяине невозможна. Если две или более плазмиды не могут сосуществовать в одной и той же клетке – они принадлежат к одной группе несовместимости. Плазмиды, относящиеся к разным группам несовместимости, беспрепятственно существуют в одной клетке независимо от числа копий. У некоторых микроорганизмов в одной клетке обнаружено до 10 разных плазмид, каждая из которых выполняла свои функции и относилась к своей группе несовместимости. Репликация плазмид идет независимо от репликации хромосом. Количество копий определяется регуляторной системой клетки.

Таким образом, плазмиды обладают свойствами, позволяющими использовать их в качестве вектора для переноса клонируемой ДНК. Бактериальный клон, содержащий такую плазмиду, можно сравнить с фабрикой по производству этого фрагмента.

Плазмидные векторы, как правило, создают методом генной инженерии, так как природные (немодифицированные) плазмиды лишены ряда обязательных для «высококачественного вектора» свойств:

- небольшого размера, так как эффективность переноса экзогенной ДНК в *E. coli* снижается при длине плазмиды более 15 тысяч пар нуклеотидов;
- наличия сайта рестрикции, в который осуществлена вставка;
- наличия одного или более селективных генетических *маркеров для идентификации* реципиентных клеток, несущих рекомбинантную ДНК.

Вводят плазмиды в соматические клетки с помощью *химических реагентов*, повышающих проницаемость клеточной оболочки. В частности, чтобы обеспечить проникновение в клетки плазмидной ДНК, их обрабатывают ледяным раствором кальция хлорида, затем выдерживают при 42 °С в течение 1,5 мин. Эта обработка приводит к локальному разрушению клеточной стенки. Максимальная частота трансформации –  $10^{-3}$ , т.е. на каждую тысячу клеток приходится одна трансформированная. Частота трансформации не бывает 100%-й, затем используют схемы отбора, позволяющие идентифицировать трансформированные клетки.

В качестве маркеров плазида может содержать гены, определяющие устойчивость бактерии к антибиотикам. Вставка чужеродного (донорного) гена в маркерный ген приводит к инактивации последнего. Это позволяет отличать трансформированные клетки, получившие векторную плазмиду (утратившие устойчивость к антибиотику), от клеток, получивших рекомбинантную молекулу (сохранивших устойчивость к одному, но утративших устойчивость к другому антибиотику). Этот прием называется *инактивацией маркера вставки*.

Для отбора трансформированных клеток, содержащих рекомбинантную ДНК (гибридную плазмиду), проводят тестирование на резистентность к определенным антибиотикам. Например, клетки, несущие гибридную плазмиду, устойчивы к ампициллину, но чувствительны к тетрациклину (в маркерный ген которого и внедрена донорная ДНК).

Процесс деления геномной ДНК на клонируемые элементы и введения этих элементов в клетки-хозяева называется созданием геномной библиотеки (банка клонов, банка генов).

Все системы клонирования должны отвечать двум основным требованиям:

- 1) Наличие нескольких сайтов для клонирования;
- 2) Возможности достаточно простой идентификации клеток с рекомбинантными ДНК.

Для всех рутинных процедур молекулярного клонирования широко используется *E. coli* в качестве клетки-хозяина. Клетки, способные поглощать чужеродную ДНК, называются *компетентными*; компетентность *E. coli* повышают, используя специальные условия культивирования. Для получения больших количеств чужеродных белков с помощью рекомбинантных штаммов *E. coli* была сконструирована плазида, содержащая сильный *промотор*, *селективный маркерный ген* и короткий участок с несколькими уникальными сайтами для рестрицирующих ферментов – *полилинкер*.

Эффективными методами трансформации *E. coli* плазидами является *электропорация* (воздействие на клеточные мембраны электрическим током для увеличения их проницаемости). Для введения клонированных генов в соматические клетки также применяют *микроинъекции и микроукальвания* или слияние с клеткой нагруженных ДНК мембранных *везикул (липосом)*.

Использование *бактериофагов* в качестве носителей генетической информации основано на том, что рекомбинантный ген встраивается в геном вируса и в последующем реплицируется с генами вируса при размножении в инфицированной клетке-хозяина. С этой целью применяют бактериофаг  $\lambda$ -вирус с двухцепочечной ДНК, которая после проникновения в клетку смыкается в кольцо. Бактериофаг М-13 – вирус нитевидной формы с кольцевой замкнутой ДНК, которая в клетке превращается в двухцепочечную и реплицируется в клетках-потомках. В поисках эукариотических систем экспрессии, для получения биологически активных белков, созданы *бакмиды* – экспрессирующие векторы на основе бакуловирусов для *E. coli* и клеток насекомых. Выход рекомбинантных бакуловирусов в такой системе повысился до 99%. Клетки насекомого, инфицированные бакуловирусами, синтезировали гетерологичный белок. Векторы на основе фага удобны для создания клонеток (банка генов), но не для тонких манипуляций с фрагментом ДНК. Для детального изучения и преобразования фрагменты ДНК переклонировывают в плазмиды.

Кроме указанных векторов в генной инженерии применяют *космиды* – плазмиды, несущие *cos*-участок (комплементарные липкие концы) ДНК фага  $\lambda$ . Наличие *cos*-участка позволяет производить упаковку ДНК в головку фага *in vitro*, что обеспечивает возможность их введения в

клетку путем инфекции, а не трансформации. *Фазмиды* – гибриды между фагами и плазидами – способны развиваться как фаг и как плазида. Уступая космидам по клонирующей емкости, фазмиды дают возможность отказаться от переклонирования генов из фаговых в плазмидные векторы.

Таким образом, для получения любого белкового продукта необходимо обеспечить правильную транскрипцию кодирующего его гена и трансляцию соответствующей мРНК. Для инициации транскрипции (синтеза РНК) в нужном сайте необходим промотор, для ее остановки – *терминирующий кодон*.

Для синтеза разнообразных белков, кодируемых клонированными генами, интенсивно используют обычные дрожжи *S. cerevisiae*; генетика этих одноклеточных организмов хорошо изучена. Рекомбинантные белки, синтезированные в системах экспрессии *S. cerevisiae*, применяют в качестве вакцин и лекарственных препаратов

Придавать новые свойства существующим белкам, создавать уникальные ферменты возможно, производя специфические изменения с помощью плазмид или ПЦР. Клонированные гены позволяют получать белки, содержащие нужные аминокислоты в заданных сайтах. Внесение специфических изменений в кодирующие последовательности ДНК, приводящие к определенным изменениям в аминокислотных последовательностях, называется *направленным мутагенезом*.

## Тест-контроль к главе 4

## Выберите правильные ответы:

1. Утверждение, что генетическая рекомбинация заключается в обмене генами между двумя хромосомами:

- А – верно;
- Б – ошибочно;
- В – требует уточнения.

2. Процесс изготовления генно-инженерных препаратов включает:

- А – копирование гена человека, ответственного за синтез необходимого продукта;
- Б – модификацию генетического аппарата больного для увеличения биосинтеза необходимых продуктов;
- В – внедрение микробной клетки с рекомбинантной ДНК в организм человека;
- Г – культивирование и выделение микробных клеток с рекомбинантными ДНК;
- Д – внедрение микробной клетки с рекомбинантной ДНК в организм животного;
- Е – внедрение человеческого гена в плазмиду микробной клетки.

3. Функциональная активность рестрицирующих эндонуклеаз:

- А – метилирование нуклеотидов;
- Б – гидроксилирование нуклеотидов;
- В – расщепление ДНК;
- Г – сшивка нуклеотидов;
- Д – репликация нуклеотидов.

4. Функциональная активность ДНК-лигаз:

- А – лизирование (растворение, гидролиз) ДНК;
- Б – образование фосфодиэфирных связей между концами полинуклеотидных цепей;
- В – метилирование нуклеотидов;
- Г – нейтрализация ДНК;
- Д – расщепление ДНК.

5. Защита клеток от проникновения чужеродной ДНК заключается в:

- А – регулировании проницаемости клеточной мембраны;
- Б – укрупнении чужеродной ДНК;
- В – гидролизе (расщеплении) чужеродной ДНК;
- Г – метилировании чужеродной ДНК;
- Д – нейтрализации чужеродной ДНК.

6. Для введения рекомбинантной ДНК в производстве препаратов методом генной инженерии используют:

- А – хромосомы;
- Б – плазмиды;
- В – рибосомы;
- Г – бактериофаги;
- Д – лизосомы;
- Е – ядра клеток.

7. Плазида представляет собой:

- А – определенный штамм кишечной палочки, используемый для биотехнологических целей;
- Б – кольцеобразную молекулу ДНК;
- В – участок цепи РНК, несущий информацию о структуре гена;
- Г – внехромосомный элемент генетической информации;
- Д – вирус, размножающийся в цитоплазме микробной клетки;
- Е – хромосому, используемую в качестве вектора для введения ДНК в клетки бактерий.

8. Требования к векторам ДНК:

- А – малый размер;
- Б – большой размер;
- В – видоспецифичность;
- Г – наличие селективных генетических маркеров для идентификации реципиентных клеток, несущих рекомбинантную ДНК;
- Д – наличие сайта рестрикции, в который осуществлена вставка.

9. Отбор трансформированных клеток, содержащих рекомбинантную ДНК (гибридную плазмиду) проводят:

- А – тестированием на резистентность к различной температуре;

Б – тестированием на резистентность к определенным антибиотикам;

В – по способности окрашиваться гематоксилином;

Г – по морфологическим признакам;

Д – по скорости роста и размножения.

10. Способы введения клонированных генов в соматические клетки:

А – микроинъекции;

Б – с помощью химических реагентов, изменяющих проницаемость мембран;

В – с помощью липосом, «теней» эритроцитов;

Г – экстракорпоральной обработкой хромосом бактериальной клетки;

Д – инфекцией клетки рекомбинантными вирусами.

## Глава 5. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Основу промышленного производства продуктов биосинтеза составляет единая биотехнологическая система (БТС), которая включает основные компоненты, взаимодействующие между собой в определенном режиме посредством соответствующей аппаратуры (рис. 7).



Рис. 7. Основные компоненты БТС

Основные технологические стадии биотехнологического процесса включают:

1. Приготовление и стерилизацию питательных сред;
2. Приготовление посевного материала;
3. Культивирование;
4. Обработку культуральной жидкости;
5. Выделение и очистку биопрепарата;
6. Получение готовой продукции.

К определяющим факторам биотехнологического процесса относят:

- вид используемого биотехнологического процесса;
- субстрат с его биохимическими и биофизическими характеристиками;
- аппаратурное оформление, включая систему контроля управления;
- технологический режим;
- соответствие требованиям GMP.

Для получения коммерческих препаратов с помощью рекомбинантных микроорганизмов необходимо сотрудничество специалистов двух областей – молекулярных биологов и биотехнологов. *Задача молекулярных биологов* – идентификация, изучение свойств, модификация нужных генов, создание эффективных систем их экспрессии в клетках микроорганизмов, используемых для промышленного синтеза соответствующего продукта. *Задача биотехнологов* – обеспечить условия оптимального роста рекомбинантного микроорганизма с целью получения целевого продукта с наибольшим выходом.

### 5.1. Состав питательной среды

Состав питательной среды должен быть оптимальным, так как это определяет размножение, рост микроорганизмов и синтез различных БАВ. Питательные среды могут быть сложными, включающими до 50 компонентов и более, и достаточно простыми, содержащими не более 5 компонентов.

*Назначение питательных сред:*

- поддержание оптимальных для роста клеток физико-химических условий (рН, еН, рО<sub>2</sub>, рСО<sub>2</sub>, и т.д.);
- обеспечение клеток питательными веществами для синтеза биомассы и других продуктов жизнедеятельности.

Понятие «среда для культивирования» включает не только определенный качественный и количественный состав компонентов или отдельных элементов, необходимых для конструктивного и энергетического обмена организма (источники азота, углерода, фосфора, ряда микроэлементов, витамины, ростовые вещества), но и физико-химические и физиологические факторы (кислотность, окислительно-восстановительный потенциал, температура, аэрация и др.). Все эти факторы играют существенную роль в развитии микроорганизмов и в проявлении ими отдельных физиологических и биохимических функций. Обычно изменение одного из этих факторов среды влечет изменение других. Значительного повышения выхода нужного продукта, образуемого микроорганизмами, достигают, используя методы математического расчета соотношения компонентов субстрата и их свойства.

*Питательные среды принято делить на две группы:*

- 1) среды, требующие внесения 5–20% природных сывороток (из крови человека или эмбриональных экстрактов крупного рогатого скота);
- 2) синтетические химические среды определённого состава.

### Качественная характеристика компонентов питательной среды

Основу питательных сред составляют смеси аминокислот, пуринов, пиримидинов, участвующих в синтезе белков и нуклеиновых кислот.

**Сыворотки** (эмбриональная сыворотка крови, лошадиная сыворотка или очищенный экстракт куриных эмбрионов), их высокомолекулярные фракции (α-, β-глобулины) предохраняют клетки от повреждения и стимулируют синтез ДНК. Синтез последних индуцируют и ростовые факторы (митогены) – вещества пептидной природы. В качестве источника углерода и энергии используется **глюкоза** или ее комбинации с аспарагиновой или молочной кислотами. Для развития микроорганизмов необходимы **витамины жиро- и водорастворимые**. Жизнедеятельность микроорганизмов невозможна без наличия в цитоплазме клеток и окружающей среде неорганических соединений, содержащих такие элементы, как фосфор, калий, кальций, магний, сера, железо, марганец, цинк, медь, молибден и др. **Микро- и макроэлементы** входят в состав ферментов, участвуют в поддержании необходимого осмотического давления и значения рН, буферной ёмкости (фосфатно-бикарбонатные буферы) или регулируют гидрофильность цитоплазмы клетки.

**Фосфор** входит в состав важнейших соединений клетки – нуклеопротеидов, нуклеиновых кислот, полифосфатов, фосфолипидов.

Соединения **серы** участвуют в энергетических процессах клетки, входят в состав многих физиологически активных соединений (белок и простетические группы (-SH) некоторых ферментов и коэнзима А). Без серы невозможен полноценный синтез белка, нарушаются процессы обмена. Обычно источником серы служат неорганические сульфаты, поэтому для включения серы в состав белков или витаминов сульфат должен быть восстановлен с помощью ферментов (сульфитредуктазы, сульфурилазы, пирофосфатазы). Наиболее важным серосодержащим компонентом клетки является аминокислота цистеин.

**Калий** в организме выполняет, прежде всего, каталитическую роль, выступая в качестве активатора некоторых ферментов (амилазы, инвертазы), способствуя увеличению гидратации цитоплазмы клетки.

Ионы **кальция** регулируют активную кислотность (рН среды), выступают в качестве реагента, связывающего остатки фосфорной кислоты.

Основная функция **магния** – активация ферментов, необходимых для нормального обмена веществ и роста микроорганизмов.



**Микроэлементы** (железо, медь, цинк, марганец, молибден, кобальт и др.) входят в состав ферментов, участвующих в процессах метаболизма и внутриклеточного обмена. Каталитическая активность микроэлементов возрастает во много раз, когда ионы металлов соединяются с молекулами органических веществ и образуют органоминеральные комплексы (хелаты). Железо входит в состав ферментов-активаторов кислорода – системы цитохромов. Медь в сочетании со специфическими белками образует ряд ферментных систем (полифенолксидазы, аскарбинооксидазы, нитратредуктазы, альдегидоксидазы и др.) Цинк участвует в построении фосфатаз, эналаз, полипептидаз, регулирующих углеводный, азотистый, фосфатный обмены ряда организмов, в окислительно-восстановительных процессах. Составной частью многих ферментных систем (карбоксилаз, протеиназ, фосфорилаз) является марганец, так фосфорилазы участвуют в переносе фосфорной кислоты от аденозинтрифосфата. Определенное влияние на различные стороны метаболизма микроорганизмов и особенно антибиотиков оказывает кобальт.

Среда содержит также небольшие концентрации антибиотиков для поддержания асептических условий.

Перечисленные компоненты достаточно дороги, поэтому при крупномасштабном производстве прежде всего углеводы заменяют более доступными по стоимости продуктами крахмалопаточного производства (мелассой, гидролом, кукурузным экстрактом, соевой мукой, свекловичным жомом).

Незаменимым элементом питательных сред является вода, которая составляет единую систему с элементами клетки. Вода-растворитель способствует проникновению в клетку необходимых веществ и выводу из нее продуктов обмена. В клетках вода находится и в виде соединений с углеводами, белками и другими веществами, тесно взаимодействуя с макромолекулами клетки. Гидратирование и дегидратирование органических молекул – важнейший этап в превращении химических компонентов цитоплазмы. Вода участвует в реакциях гидролиза и конденсации, поддерживает объёмную структуру клетки при наличии гидростатического давления.

Для питательных сред используют специально подготовленную воду. *Очистка воды* проходит 4 стадии:

- 1) удаление механических загрязнений на префилт্রে (пористое стекло, электрокоагуляция);
- 2) очистка от органических загрязнений (активированный уголь);

3) деионизация с использованием ионообменных смол (катиониты, аниониты);

4) стерилизация на мембранных фильтрах с размером пор от 0,22 до 0,45 мкм.

Для стерилизации питательных сред используют термическую стерилизацию (пар под давлением) и стерилизующую фильтрацию. Цель стерилизации питательных сред – разрушение бактериальных спор. Многие компоненты питательных сред (витамины, гормоны и другие БАВ) крайне чувствительны к длительному температурному воздействию, поэтому установлены специальные режимы периодической и непрерывной термической стерилизации питательных сред. Стерилизующая фильтрация предполагает использование мембранных фильтрующих элементов.

## 5.2. Подготовка посевного материала

Штаммы микроорганизмов для производства биологических препаратов поступают в ампулах, где они законсервированы в виде чистых культур. Каждая культура имеет паспорт с описанием питательных сред, морфологических, физиологических и других характеристик, условий для их поддержания, выращивания и срока хранения. Режим хранения культур предполагает охлаждение, замораживание или обезвоживание; во всех случаях должен быть резко сокращён или полностью прекращён клеточный обмен веществ. Культуры штаммов хранят:

- на косом агаре при температуре минус 1–5 °С;
- замороженными при температуре ниже –20 °С (недопустимо повторное оттаивание и замораживание);
- лиофилизированными в ампулах, хранящимися в течение нескольких лет.

Большинство культур клеток млекопитающих, в том числе и клеток человека, удается сохранить неопределенно долгое время замороженными в специальной среде при температуре –180 °С.

Через определённое время, специфическое для каждого вида микроорганизмов и вида хранения, культуру пересеивают.

Перед началом технологического процесса культуру размножают в стерильных условиях при оптимальном составе питательной среды и режиме выращивания, длительность стадии выращивания – 24 ч.

### 5.3. Культивирование

Стадия культивирования микроорганизмов является наиболее сложной и ответственной.

Рост и культивирование биомассы требуют следующих условий:

- жизнеспособности посевного материала;
- наличия источника энергии (тепла);
- достаточного количества соответствующей питательной среды;
- необходимых физико-химических условий для жизнедеятельности.

С начала 1950-х гг. вирус полиомиелита для производства вакцины выращивали в культуре клеток млекопитающих, в том числе фибробластов эмбриона человека. С тех пор фибробласты эмбриона стали незаменимы для выделения и выращивания ряда других вирусов, при производстве высокоспецифичных белков (антител, интерферонов), в исследованиях рака и противовирусной химиотерапии.

Культуры, приготовленные непосредственно из тканей организма (эмбриональных или тканей новорожденных), называют *первичными культурами*. В большинстве случаев клетки первичной культуры переносят из культуральной чашки и используют для получения большого количества *вторичных культур*, которые можно последовательно переливать в течение недель или месяцев. Разные типы клеток нуждаются в различных питательных веществах, а также в одном или нескольких белковых факторах роста.

Клеточные линии можно использовать для получения *клонов*, которые происходят из одной клетки-предшественника.

Биотехнология использует методы поверхностного и глубинного культивирования микроорганизмов.

При *поверхностном культивировании* (в монослое) суспензию клеток получают обработкой измельченной ткани эмбриона трипсином. Клетки в такой суспензии, оседая на плотной поверхности сосуда с культуральной средой, становятся плоскими и делятся, образуя монослой на поверхности сосуда. Обычно при этом способе культивирования пользуются цилиндрическими бутылками, которые медленно вращаются вдоль своей длинной оси. Рост клеток и выход биомассы можно увеличить, добавив к суспензии носитель – микроскопические гранулы из инертного синтетического полимера, на которых клетки закрепляются и пролиферируют. Суспензионные культуры можно получать в сосудах объемом до 1000 л при перемешивании.

Преобладающим является *глубинный метод* культивирования, предполагающий возможность использования всего объема питательной среды.

На рост и развитие микроорганизмов влияют внутри- и внеклеточные факторы. К внутриклеточным факторам относятся: структура клетки, механизмы метаболизма и генетические характеристики. Внеклеточные (внешние) факторы, т.е. условия внешней среды клетки, являются основными регуляторными факторами биотехнологии.

Промышленное культивирование и очистка целевого продукта – процессы многоступенчатые. Общая схема ферментации представлена на рис. 8.

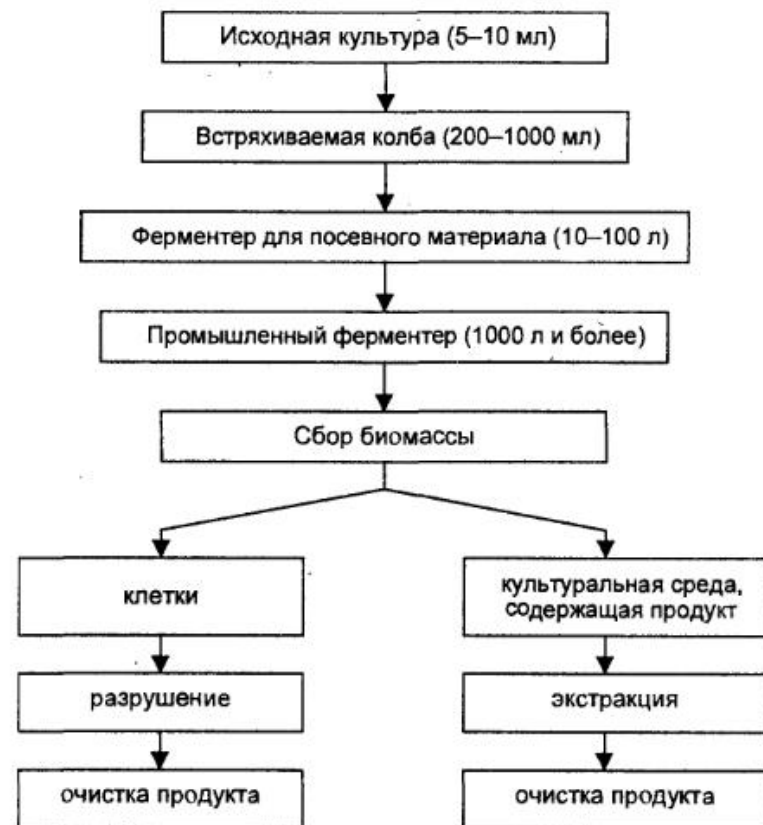


Рис. 8. Общая схема процесса промышленной ферментации

Процесс начинается с приготовления и стерилизации культуральной среды и оборудования. Вначале выращивают исходную культуру (5–10 мл), затем инкубируют ее во встряхиваемой колбе (200–1000 мл), далее переносят в ферментер для посевного материала (10–100 л) и, наконец, в промышленный ферментер (1000–100000 л). По завершении ферментации выделяемый продукт находится в клетках или в культуральной среде, но не в обеих фракциях одновременно, поэтому дальнейшие манипуляции проводят с одной из этих фракций.

Микроорганизмы можно выращивать:

- в ферментере периодического действия;
- в ферментере периодического действия с добавлением субстрата;
- в непрерывной культуре.

В первом случае микроорганизмы выращивают в стерильных условиях без добавления в ходе ферментации свежей культуральной среды. При периодической ферментации состав культуральной среды, концентрация микроорганизмов (биомассы), количество белкового продукта или метаболита зависят от фазы роста, клеточного метаболизма и наличия питательных веществ.

Различают шесть основных фаз роста (рис. 9):

- лаг-фаза (1);
- фаза ускорения (2);
- экспоненциальная или логарифмическая фаза (3);
- фаза замедления (4);
- стационарная фаза (5);
- фаза отмирания (6).

Как правило, после инокуляции стерильной культуральной среды мгновенного увеличения числа клеток не наблюдается. В течение определенного периода времени, называемого *лаг-фазой*, клетки адаптируются к новым условиям (другим рН или концентрации питательных веществ). Продолжительность лаг-фазы зависит от времени, в течение которого клетки посевного материала находились в стационарной фазе, и от того, насколько различалась среда, в которой росла культура, от новой, свежей культуральной среды. Если посевным материалом служит культура, находящаяся в *экспоненциальной фазе*, выраженная лаг-фаза может отсутствовать и рост клеток начнется немедленно после инокуляции. Между лаг- и экспоненциальной фазами есть короткий период – *фаза ускорения*, когда скорость роста клеток увеличивается до достижения постоянной величины. В период экспоненциальной фазы

клетки претерпевают несколько делений. Когда субстрат присутствует в избытке, достигается максимальная скорость роста культуры в экспоненциальной фазе, из-за большого числа клеток в конце экспоненциальной фазы субстрат расходуется очень быстро, наступает *фаза замедления*, которая может быть кратковременной. В результате истощения лимитирующего субстрата или накопления продуктов метаболизма, замедляющих рост, увеличение числа клеток постепенно прекращается

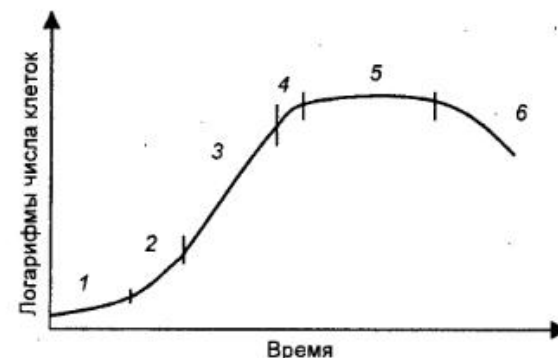


Рис. 9. Кривая роста бактериальной культуры при периодической ферментации

и культура переходит в *стационарную фазу*. В это время биомасса остается постоянной, метаболизм претерпевает кардинальные изменения, синтезируются соединения (вторичные метаболиты), представляющие коммерческий интерес, например антибиотики. Продолжительность стационарной фазы зависит от конкретного микроорганизма и условий роста. В *фазе отмирания* метаболизм прекращается, так как энергетические запасы клеток оказываются исчерпанными. При промышленном синтезе, еще до наступления фазы отмирания, ферментацию останавливают.

*Периодическая культура с добавлением субстрата* предполагает периодическое внесение в ферментер увеличивающегося количества питательных веществ. При этом культуральную среду не удаляют до окончания процесса. Периодическое добавление субстрата приводит к удлинению экспоненциальной и стационарной фаз, к увеличению биомассы и количества метаболитов, синтезируемых во время стационарной фазы. Для обеспечения непрерывного синтеза рекомбинантного белка и его стабильности необходим тщательный контроль процесса и

добавление субстрата (источника углерода, азота, витаминов, микроэлементов и др. БАВ) тотчас, как в этом возникает необходимость.

В зависимости от генотипа микроорганизма и природы рекомбинантного белка периодическая ферментация с добавлением субстрата может повысить выход готового продукта на 25–1000% по сравнению с простой периодической ферментацией.

Периодическая ферментация с добавлением субстрата используется также для культивирования клеток млекопитающих и насекомых; эти культуры широко применяют для получения белковых продуктов, имеющих медицинское значение, кроме того, без периодического добавления субстрата, клетки млекопитающих неэффективно синтезируют чужеродные белки. Для периодической ферментации характерны небольшие различия во времени сбора клеток, который проводят, начиная с середины экспоненциальной фазы, и заканчивают ее поздним этапом.

Однако в стационарной фазе микроорганизмы часто синтезируют протеолитические ферменты – *протеиназы*, разрушающие производимые белки; если цель ферментации – получение белковых продуктов, нужно остановить процесс до перехода его в стационарную фазу. Определяя время добавления следующей порции субстрата, используют показатели, коррелирующие с его расходом: количество синтезированных органических кислот, значение pH или количество образовавшегося CO<sub>2</sub>. Конечный продукт собирают по завершении процесса.

При непрерывной ферментации свежая культуральная среда поступает в ферментер непрерывно, параллельно отводится такой же объем клеточной суспензии. Таким образом, убыль числа клеток (удаление продукта) уравнивается их увеличением в результате деления. При этом жестко контролируют скорость притока культуральной среды и постоянный объем культуры в биореакторе.

Следует заметить, что в промышленных целях непрерывная ферментация применяется реже, хотя стоимость получения определенного количества биомассы в ферментере непрерывного действия существенно ниже, чем в биореакторе, работающем в периодическом режиме. Это удешевление обусловлено следующим:

- при непрерывной ферментации нужны не столь громоздкие биореакторы и оборудование для сбора клеток, их разрушения, последующей очистки белкового продукта или метаболита, синтезированного микроорганизмами;

- биореактор периодического действия время от времени разгружают, готовя к повторному использованию (ремонт, чистка, стерилизация биореактора – основная причина снижения эффективности процесса); для ферментера, работающего в непрерывном режиме, простой существенно меньше;
- при непрерывной ферментации синтез целевого продукта происходит более согласованно, так как физиологический статус большинства клеток одинаков.

Непрерывную ферментацию используют для промышленного получения белков одноклеточных микроорганизмов и антибиотиков, однако и этот способ выращивания микроорганизмов связан с определенными затруднениями:

- продолжительность ферментации в непрерывном режиме составляет иногда 500–1000 ч, в течение которого некоторые клетки могут потерять рекомбинантные плазмиды (известно, что клетки, не несущие плазмид, расходуют меньше энергии, делятся быстрее, поэтому со временем выход целевого продукта может снижаться из-за уменьшения числа клеток, способных его синтезировать);
- в промышленных установках затруднительно в течение длительного времени поддерживать стерильные условия; непрерывные процессы требуют наличия стерильного резервного оборудования, что значительно увеличивает основные затраты.

**Культуры с высокой плотностью.** При максимальной конечной плотности культуры получается и максимальное количество целевого продукта. В ферментерах периодического действия с добавлением субстрата концентрация рекомбинантных клеток *E.coli* достигает 50 г сухого вещества на 1 л питательной среды (в некоторых случаях более 100 г/л). Один из способов повышения плотности культуры – оптимизация культуральной среды.

Следует иметь в виду, что некоторые питательные вещества (в том числе источники углерода, азота) при высоких концентрациях замедляют рост клеток. Так, глюкоза подавляет рост при концентрации более 50 г/л, аммиак – при концентрации свыше 3 г/л; железо, магний, фосфор, цинк соответственно – более 1,15 г/л, 8,7 г/л, 10 г/л, 0,038 г/л.

Таким образом, простое увеличение содержания питательных веществ в культуральной среде при периодической ферментации не дает желаемого результата.

Для избежания недостатка кислорода в культурах с высокой плотностью повышают количество поступающего диспергированного воздуха и скорость перемешивания. Возможна подача в культуру чистого кислорода, а не воздуха (содержащего только 20% кислорода) или выращивание клеток под определенным давлением для увеличения растворимости кислорода.

Высокой плотностью роста культуры удается достичь в периодическом режиме с добавлением субстрата. Режим подачи питательных веществ может быть: непрерывным, ступенчатым, экспоненциальным. При непрерывном режиме в культуральную среду в течение всей ферментации вносят одинаковые количества питательных веществ. При ступенчатом режиме питательные вещества добавляют во все большее количество по мере увеличения концентрации клеток. При экспоненциальном режиме питательные вещества добавляют в количестве, обеспечивающем постоянную скорость роста клеток.

Периодическую подачу питательных веществ автоматизируют, основываясь на результатах измерения концентрации лимитирующего субстрата культуральной среды (например глюкозы) в процессе ферментации.

При крупномасштабной ферментации следует учитывать еще один аспект. Важно не допустить случайного попадания рекомбинантных микроорганизмов в окружающую среду; для этого используют надежные системы, предотвращающие утечку живых рекомбинантных организмов или ограничивающие их распространение при произошедшей утечке.

Перед окончательным удалением из установки, все рекомбинантные микроорганизмы должны быть инактивированы в соответствии с определенными инструкциями. Использованную культуральную среду тщательно проверяют на наличие в ней жизнеспособных микроорганизмов, чтобы исключить их попадания в окружающую среду.

#### 5.4. Аппаратурное оформление биотехнологического процесса.

##### Биореакторы

Промышленное производство биопрепаратов представляет собой сложный комплекс взаимосвязанных физических, химических, биофизических, биохимических, физико-химических процессов и предполагает использование большого количества разнотипного оборудования, которое связано между собой материальными, энергетическими потоками, образующими технологические линии.

Основным аппаратным элементом биотехнологического процесса является **биореактор – ферментер** (рис. 10). Биореакторы предназначены для культивирования микроорганизмов, накопления биомассы, син-

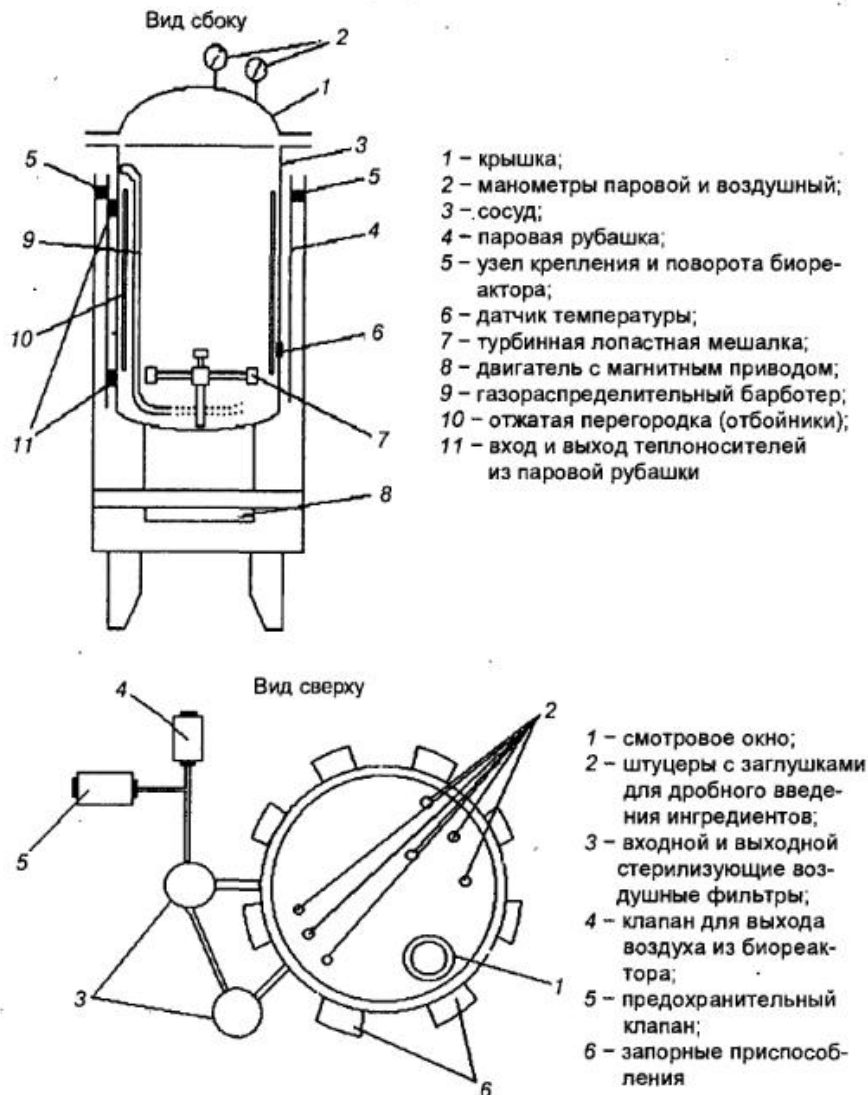


Рис. 10. Схема биореактора (по А.Я. Самуйленко, Е.А. Рубану)

теза целевого продукта. Биореакторы изготавливают из высоколигированных марок стали, иногда из титана. Внутренняя поверхность биореактора должна быть отполирована.

Типовые ферментеры представляют собой вертикальные ёмкости различной вместимости (малые – от 1 до 10 л, многотоннажные – более 1000 л) с минимальным числом штуцеров и передающих устройств. В биореакторах должны быть обеспечены оптимальные гидродинамические и массообменные условия.

Ферментеры снабжены паровой рубашкой, мешалками, барботерами, стерилизующими воздушными фильтрами, отбойниками, обеспечивающими необходимые температурный, газовый режим, гидродинамическую обстановку в биореакторе (т.е. процессы массо- и теплообмена). В биореакторах имеются пробоотборники для отбора проб культуральной жидкости в процессе биосинтеза. Могут быть и другие конструктивные особенности, учитывающие специфику биотехнологического процесса. Работа отдельных узлов контролируется измерительными приборами, фиксирующими как параметры технологического процесса, так и отдельные физико-химические показатели культивирования (температуру стерилизации и культивирования, скорость вращения мешалки, давление, расход воздуха или газов на аэрацию, пенообразование, рН,  $eH$ ,  $pO_2$ ,  $pCO_2$  среды).

Тип биореактора, чистота обработки внутренних стенок аппарата и отдельных его узлов, ёмкость, коэффициент заполнения, поверхность теплоотдачи, способ отвода тепла, тип перемешивающих, аэрирующих устройств, арматура и запорные приспособления, способ пеногашения, – далеко не полный перечень отдельных элементов, которые, в отдельности и во взаимосвязи, влияют на процесс культивирования микроорганизмов и клеток.

Биореакторы подразделяют на три основные группы (рис. 11):

- 1) **реакторы с механическим перемешиванием;**
- 2) **барботажные колонны,** через которые для перемешивания содержимого пропускают воздух;
- 3) **эрлифтные реакторы** с внутренней или внешней циркуляцией; перемешивание и циркуляция культуральной среды в них обеспечивается потоком воздуха, за счет которого между верхним и нижним слоями культуральной среды возникает градиент плотности.

*Биореакторы первого типа* используют чаще всего, так как они позволяют легко изменять технологические условия и эффективно доставлять к растущим клеткам воздух, определяющий характер развития микроорганизмов и их биосинтетическую активность. В таких реакторах воздух подают в культуральную среду под давлением через разбрызгиватель – кольцо с множеством маленьких отверстий. При этом

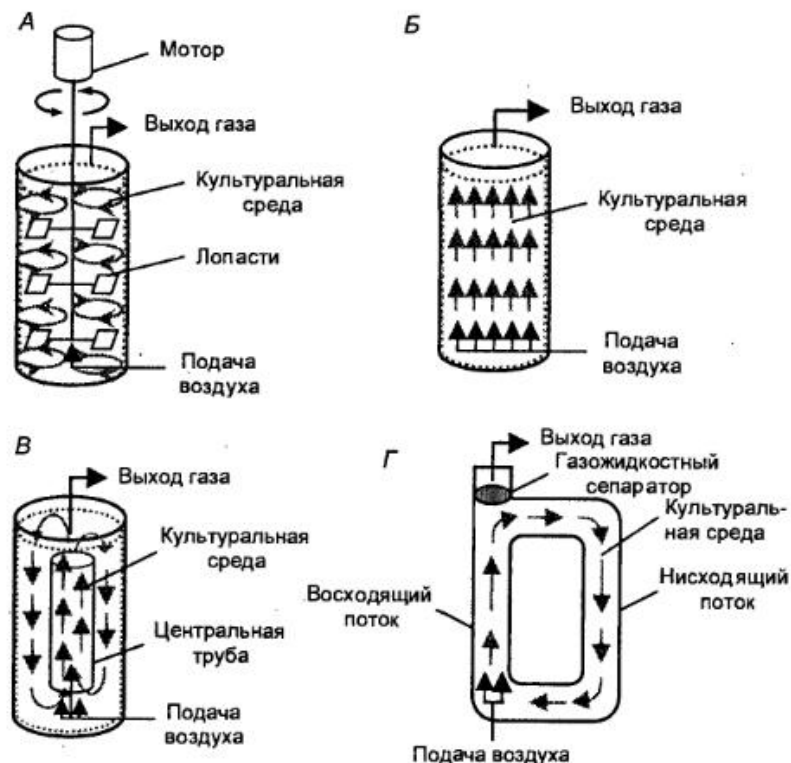


Рис. 11. Упрощенные схемы биореакторов различных типов (по Б. Глику, Дж. Пастернаку): А – реактор с механическим перемешиванием; Б – барботажная колонна; В – эрлифтный реактор с внутренней циркуляцией; Г – эрлифтный реактор с внешней циркуляцией. Стрелки – направление потока культуральной среды

образуются мелкие пузырьки воздуха и за счет механического перемешивания обеспечивается их равномерное распределение. Для этой же

цели используют мешалки – одну или несколько. Мешалки, разбивая крупные пузырьки воздуха, разносят их по всему реактору и увеличивают время пребывания в культуральной среде. Эффективность распределения воздуха зависит от типа мешалки, числа оборотов, физико-химических свойств среды.

При интенсивном перемешивании культуральной среды происходит ее вспенивание, поэтому рабочий объем биореактора не превышает 70% общего объема. Свободное пространство над поверхностью раствора используется как буферное, где накапливается пена, и таким образом предотвращается потеря культуральной жидкости. В пенящейся жидкости условия аэрации лучше, чем в плотных растворах (при условии непрерывного перемешивания и циркуляции слоя пены, т.е. при исключении нахождения микроорганизмов вне культуральной жидкости). Вместе с тем вспенивание может привести к переувлажнению фильтров в отверстиях, через которые воздух выходит из биореактора, уменьшению потока воздуха и к попаданию в ферментер посторонних микроорганизмов.

*Конструктивные особенности барботажных колонн и эрлифтных биореакторов* дают этим типам ферментеров некоторые преимущества перед реакторами с механическим перемешиванием. Барботажные колонны более экономичны, так как перемешивание в них происходит восходящими потоками воздуха равномерно по всему объему. Отсутствие механической мешалки исключает один из путей проникновения в биореактор посторонних микроорганизмов. В барботажных биореакторах не возникает сильных гидродинамических возмущений (сдвиг слоев жидкости культуральной среды относительно друг друга).

Уменьшение сдвиговых факторов важно по следующим причинам:

- клетки рекомбинантных микроорганизмов менее прочны, чем нетрансформированные;
- клетка отвечает на внешние воздействия уменьшением количества синтезируемых белков, в том числе рекомбинантных;
- под влиянием сдвиговых эффектов могут изменяться физические и химические свойства клеток, что затрудняет дальнейшую работу с ними (ухудшаются условия выделения, очистка рекомбинантных белков).

В барботажных колоннах воздух подают под высоким давлением в нижнюю часть биореактора; по мере подъема мелкие пузырьки воздуха объединяются, что влечет неравномерное его распределение. Кроме

того, подача воздуха под высоким давлением приводит к еильному пенообразованию.

В *эрлифтных биореакторах* воздух подают в нижнюю часть вертикального канала. Поднимаясь, воздух увлекает за собой жидкость к верхней части канала, где расположен газожидкостный сепаратор (здесь частично выходит воздух). Более плотная деаэрированная жидкость опускается по другому вертикальному каналу ко дну реактора и процесс повторяется. Таким образом, в эрлифтном биореакторе культуральная среда вместе с клетками непрерывно циркулирует в биореакторе.

Эрлифтные биореакторы выпускаются в двух конструктивных вариантах. В первом – реактор представляет емкость с центральной трубой, которая обеспечивает циркуляцию жидкости (реакторы с внутренней циркуляцией). У эрлифтного биореактора второго типа культуральная среда проходит через отдельные независимые каналы (реактор с внешней системой циркуляции).

Эрлифтные биореакторы более эффективны, чем барботажные колонны, особенно в суспензиях микроорганизмов с большей плотностью или вязкостью. Перемешивание в эрлифтных ферментерах более интенсивно и вероятность слипания пузырьков минимальна.

*Для стерилизации биореактора* применяют пар под давлением. Внутри биореактора не должно быть «мертвых зон», недоступных для пара во время стерилизации. Стерилизации подлежат все клапаны, датчики, входные и выходные отверстия.

Стерильность обеспечивается и герметизацией биотехнологического оборудования, работающего в асептических условиях. Стерильная передача жидкости осуществляется через штуцеры парового затвора. Технологическая обвязка биореактора исключает контаминацию культуральной жидкости посторонней микрофлорой и возможности попадания продуктов биосинтеза в окружающую среду. Основные агенты, контаминирующие клеточные культуры – бактерии, дрожжи, грибы, простейшие, микоплазмы, вирусы. Источники контаминации – воздух, пыль, питательные среды, рабочие растворы, оборудование, рабочий персонал.

*Очистка воздуха от микроорганизмов* и аэрозольных частиц осуществляется через фильтры предварительной очистки (комбинированные глубинные фильтры – бумага, картон, тканевые материалы), которые устанавливают на всасывающей линии перед компрессором (воздух очищается от частиц размером более 5 мкм) и фильтры тонкой очистки

(ткань ФП, удаляющая частицы размером до 0,3 мкм, металлокерамические и мембранные фильтры).

Металлокерамические фильтры изготовлены из калиброванных металлических порошков (бронзы, никеля, нержавеющей стали, титана) способами спекания, прессования, прокатки; размер пор варьирует от 2 до 100 мкм. Металлокерамические фильтры стерилизуют при температуре 150 °С 50 мин. Они стойки к действию сильных кислот, щелочей, окислителей, спиртов, могут использоваться при температуре от -250 °С до +200 °С.

Преимущество металлокерамических фильтрующих элементов – простота регенерации, большой срок работы (5–10 лет). В отличие от волокнистых, нетканых и фторопластовых фильтров, зернистые металлокерамические материалы имеют неизменную структуру, химически инертны, поддаются любым методам стерилизации, отличаются высокой механической прочностью, просты в изготовлении.

Мембранные фильтры патронного и кассетного типа несмотря на менее значительный срок службы (1 год) обладают высокой эффективностью, быстрой съёмностью, надёжны в работе. Отмечена способность рядом фильтрующих материалов, заряженных отрицательно, задерживать живые клетки, бактерии, вирусы, эритроциты, лимфоциты и тромбоциты. Частицы, размер которых меньше величины пор фильтрующего материала, остаются на фильтре, если дзета-потенциал (электрический потенциал) частиц и стенок пор фильтра имеет противоположные заряды. Это явление наблюдается при использовании в качестве фильтрующих элементов мембран с соответствующими электростатическими свойствами. Выбор фильтрующего материала зависит от объекта фильтрации и дзета-потенциала суспендированных частиц.

Отработанный воздух, отводимый из лабораторных и производственных помещений, контролируется на чистоту (отсутствие микроорганизмов).

Для обслуживания установок глубинного культивирования применяют *автоматизированную модульную систему*, включающую:

- очистку и стерилизацию воздуха и пара с использованием металлокерамических и титановых фильтрующих элементов;
- модули технологической обвязки, содержащие автономную систему термостатирования, запорную и регулируемую арматуру, индивидуальные входные и выходные фильтры, электропнеумообразователи и другие регулирующие устройства;

- блок автоматического контроля и управления, содержащий программное устройство, преобразователи сигналов от измерительных электродов, газоанализаторы для измерения O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, pH, температуры, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>;
- системы цифровой и диаграммной индикации текущих параметров культивирования.

Установки глубинного культивирования снабжены блоками дистанционного измерения давления в биореакторе и его рубашке, блоками дистанционного контроля интенсивности аэрации воздухом или газовой смесью (кислорода и азота, кислорода и углекислого газа, воздуха и углекислого газа, азота и углекислого газа).

Блок автоматического управления позволяет контролировать и поддерживать на заданном уровне программную стерилизацию биореактора и арматуры, скорость вращения мешалки и дистанционный контроль открытия или закрытия вентилей и регулирующих клапанов.

Ряд стран специализируется на выпуске широкого ассортимента оборудования для культивирования различного назначения (фирма NBS – США; Полиферм, Биотек – Швеция; Марубиши – Япония; LH – Ферментейшн – Великобритания; Браун – Германия; БИОР-0,1, БИОР-0,2 – Россия, институт биологического приборостроения с опытным заводом АН РФ).

### 5.5. Повышение эффективности ферментации

Независимо от типа биореактора процесс ферментации строго контролируют по:

- концентрации растворенного кислорода;
- pH;
- температуре;
- интенсивности перемешивания биомассы.

Существенные изменения любого из этих параметров резко снижают скорость роста клеток и стабильность белкового продукта. Для оптимального роста *E. coli* и других микроорганизмов, используемых при экспрессии рекомбинантных белков, нужна хорошо аэрируемая культуральная среда. Кислород плохо растворим в воде (0,0084 г/л при 25 °С), поэтому он должен подаваться в среду непрерывно. В процессе ферментации специальный датчик контролирует содержание растворенного кислорода в среде, равномерность его распределения по всему объему, тщательность перемешивания культуры, что, вместе взятое, обеспечи-



вает эффективность диспергирования пузырьков. Пространство, где взаимодействуют микроорганизмы и питательная среда, принято называть *микросредой*. Если микросреда данной культуры одинакова в каждой точке, такую культуру считают гомогенной. Гомогенность достигается эффективным перемешиванием всех компонентов среды и микроорганизмов по всему рабочему объему. Гомогенность невозможна без аэрации, которая осуществляется барботерами различных конструкций, например, в виде кольцевого желоба с отверстиями, перфорированной трубы или форсунки.

Оптимальный рост большинства микроорганизмов идет при pH от 5,5 до 8,5; однако клеточные метаболиты, выделяющиеся в культуральную среду, могут изменять pH. Изменение pH среды заметно сказывается на активности ферментов микроорганизмов, состоянии промежуточных продуктов, их диссоциации, растворимости и т.п., что значительно влияет на выход конечного продукта. Тщательно контролируя pH, при необходимости в ферментер добавляют кислоту или основание, хорошо перемешанные с питательной средой и равномерно распределенные по всему объему.

Успех ферментации зависит от температуры. Если она ниже оптимальной (37 °C), рост микроорганизмов замедлен, интенсивность их метаболизма снижена. При повышении температуры до 38 °C, возможна преждевременная индукция синтеза белка или индукция белков теплового шока, что активирует клеточные протеиназы и снижает выход белкового продукта. Для отвода тепла используют охлаждающую рубашку. Тщательное перемешивание культуральной среды – один из наиболее распространенных процессов в БТ. Перемешивание необходимо для:

- равномерной доставки питательных веществ к клеткам;
- предотвращения накопления токсических побочных продуктов метаболизма в каком-нибудь небольшом участке биореактора.

Механическое перемешивание и аэрация снабжают растущую культуру кислородом, азотом, отводят продукты газообмена и физиологическое тепло, выделяемое микроорганизмами в процессе биосинтеза, способствуют гомогенизации суспензии, увеличивают скорость процессов масса- и теплообмена.

Конструкция мешалки играет важную роль в работе биореактора. Мешалки делят на быстро- и тихоходные. Быстроходные аппараты с большой и средней циркуляционной производительностью используют в препаратах с отражательными перегородками (отбойниками). Отсут-

ствие перегородок приводит к завихрению жидкости, снижению скорости у стенки аппарата и образованию воронки.

Мешалки быстроходные – турбинные, пропеллерные, лопастные, дисковые. Тихоходные – якорные, рамные, ленточные, вибрационные, скребковые; последние для перемешивания средне- и высоковязких сред. Для глубинного культивирования чаще всего используют турбинную мешалку с прямыми лопастями, расположенными радиально.

Перемешивание культуральной среды влияет на другие параметры:

- скорость переноса кислорода из пузырьков газа в жидкую среду, из среды – в клетки;
- эффективность теплопередачи;
- точность измерения концентрации метаболитов культуральной жидкости;
- эффективность диспергирования добавляемых реагентов (кислот, оснований, питательных сред и т.д.).

Следует соблюдать баланс между необходимостью тщательного перемешивания среды и целостностью клеток, так как при чрезмерном перемешивании в среде могут возникнуть гидромеханические эффекты, губительные для бактериальных клеток.

Непрерывный мониторинг всех параметров, дает возможность изменять условия в ходе ферментации. Как правило, оптимальные условия изменяются при каждом десятикратном увеличении объема биореактора.

### 5.6. Методы контроля биомассы и количества клеток при культивировании. Апоптоз и некроз клеток

Под определением *биомасса* подразумевается общая концентрация микроорганизмов или клеток на твердой или жидкой питательной среде при культивировании. Наиболее чувствительный метод контроля биомассы – подсчет клеток с определением линейных размеров или числа жизнеспособных клеток (метод окрашивания) *при помощи микроскопа*. Количество клеток в биомассе можно контролировать и *по объему осадения* в центрифужных стаканчиках. Также используют *косвенные методы* определения биомассы по интенсивности дыхания (изменению концентрации CO<sub>2</sub> инфракрасным газоанализатором) или содержанию белка (самый чувствительный метод – бромсульфалеиновая проба, основанная на связывании бромсульфалеина основными группами белка). Количество микроорганизмов и клеток можно определять физико-

химическими методами: кондуктометрически (по удельной электропроводимости), спектрофотометрически, колориметрически, нефелометрически.

Гибель клеток ведёт к выделению клеточных фрагментов, загрязняющих фильтры и пробы, высвобождению внутриклеточных ферментов.

Гибель клеток идёт по двум механизмам: *апоптоз и некроз*.

Погибать могут, казалось бы, вполне жизнеспособные клетки, т.е. те, которые еще не успели исчерпать свои жизненные ресурсы. Зачастую активную роль в своей гибели играет сама клетка – с помощью содержащихся в ней механизмов, которые лишь запускаются теми или иными факторами внеклеточной или внутриклеточной среды; в результате возникло представление об *апоптозе или программированной клеточной гибели*. Апоптоз определяют, как программируемую клеточную смерть, понимая под этим такую гибель клетки, в развитии которой активную роль играют специальные и генетически запрограммированные внутриклеточные механизмы.

Исходный смысл слова «апоптоз» весьма поэтичен, по-гречески он означает опадание листьев.

Круг обстоятельств, когда в клетке включается программа апоптоза, весьма широк, их можно представить двумя группами:

- «неудовлетворительное» состояние самой клетки, что вызывает апоптоз изнутри;
- «негативная» сигнализация снаружи, передающаяся через специальные рецепторы клетки («апоптоз по команде»).

О «неудовлетворительном» состоянии самой клетки может свидетельствовать серьезное повреждение хромосом и внутриклеточных мембран. В этом смысле апоптоз выполняет функцию уничтожения дефектных клеток. Важнейший инструмент апоптоза – цитоплазматические протеазы, ядерные эндонуклеазы, последние разрушают ДНК не до нуклеотидов, а лишь до более или менее крупных фрагментов. К прочим «орудиям» апоптоза относится совокупность сильных окислителей – избыточное накопление не только оксида азота, но и других реакционноактивных веществ – супероксидного и гидроксидного радикалов, пероксинитрита, нитритов, нитратов и т.д. Известно, что в нормальной клетке существуют механизмы защиты от радикалов и окислителей. Это ферменты антиоксидантной системы: супероксиддисмутаза (превращает супероксид в перекись водорода), каталаза и пероксидаза, элиминирующие из среды пероксид водорода.

Повреждения клеток могут быть вызваны изменением температуры, нарушением питания. Если же повреждения клетки чрезмерны, процесс ее гибели становится неуправляемым – это уже некроз.

Таким образом, в зависимости от интенсивности и характера повреждающих воздействий гибель клетки может пойти либо по апоптотическому, либо по некротическому пути.

## 5.7. Выделение продуктов биосинтеза

Общая схема этой стадии технологического процесса представлена на рис. 12. Если продукт локализован внутри клеток, их разрушают, удаляют клеточные осколки и выделяют продукты из осветленной среды; секретиремый продукт выделяют непосредственно из среды.

Для отделения биомассы клеток или культуральной жидкости используют сепараторы, осадительные центрифуги, фильтр-прессы, вакуум-барабанные фильтры, ротационно-вакуумные фильтры, отстойники. Выбор оборудования зависит от масштаба культивирования, типа клеток, свойств культуральной жидкости.



Рис. 12. Выделение продуктов биосинтеза

Для выделения клеток из больших объемов культуральной среды (в промышленных масштабах) используют высокоскоростное центрифугирование.

гирование с помощью соответствующих центрифуг полунепрерывного действия. Суспензию клеток непрерывно подают в барабан центрифуги, клетки концентрируются в нем, осветленная жидкость удаляется. Когда барабан заполняется осажденными клетками, центрифугу останавливают и клетки собирают. Неудобство этого способа – необходимость остановки процесса, вероятность утечки микроорганизмов в окружающую среду, невозможность полного удаления клеток из среды.

Альтернативный метод выделения клеток из культуральной среды – фильтрация через мембрану. Но процесс фильтрации быстро замедляется за счет накопления клеток на поверхности фильтра. Увеличение давления фильтруемой среды дает временный эффект, так как клетки забивают поры, образуя менее проницаемый слой.

**Разрушение (дезинтеграция) клеток.** Для этой цели применяют разнообразные химические, биологические, физические методы. Все процедуры должны быть одновременно достаточно жесткими, чтобы разрушить клеточную стенку, и достаточно мягкими для исключения денатурации белка (изменения структуры конечного продукта).

Клеточные стенки микроорганизмов состоят из разных полимеров, поэтому универсального метода их разрушения не существует.

У *грамположительных микроорганизмов* клеточная стенка состоит из толстого пептидогликанового слоя N-ацетилглюкозамина и остатков N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных пептидными мостиками.

У *грамотрицательных бактерий* клеточная стенка тоньше и покрыта снаружи слоем липидов.

*Стенка дрожжевых клеток* состоит из плотного слоя частично фосфорилированных маннатов и  $\beta$ -глюканов.

*Низшие грибы* имеют многослойные клеточные стенки, состоящие из  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюканов, гликопротеидов и хитина.

Состав и прочность клеточной стенки зависят от условий культивирования, скорости роста клеток, фазы, на которой они собираются, условий хранения сконцентрированных клеток и от того, экспрессировал ли выделенный микроорганизм клонированный ген.

**Химический метод разрушения** клеточных стенок – обработка щелочью. Если белковый продукт не разрушается при pH от 10,5 до 12,5, то можно без труда лизировать большие количества бактериальных клеток. Например, рекомбинантный гормон роста человека очень просто выделить из клеток *E. coli* обработкой натрия гидрокарбонатом при pH 11. После обработки щелочью не остается практически ни одной

жизнеспособной клетки, что автоматически решает проблему утечки рекомбинантных микроорганизмов.

Основной *биохимический метод разрушения* клеток микроорганизмов – лизис с помощью ферментов. Так, лизоцим яичного белка легко гидролизует клеточные стенки грамположительных бактерий. Для разрушения клеток грамотрицательных бактерий используют лизоцим и ЭДГА. Клеточные стенки дрожжей и плесневых грибов гидролизуют одним или несколькими ферментами: фосфоманназой,  $\beta$ -1,3- и  $\beta$ -1,6-глюканазой, хитиназой – или комплексным дрожжелитическим препаратом. Ферментативная обработка высокоспецифична, а лизис происходит в мягких условиях.

Клетки можно *разрушать физическими методами*: немеханическими (осмотическим шоком или быстрым многократным замораживанием-оттаиванием), механическими (обработкой УЗ, соударением, гоменизацией под давлением). Механическое разрушение высокоэффективно, особенно УЗ-излучателями, генерирующими высокочастотные звуковые волны. УЗ-дезинтеграторы состоят из транзисторного генератора УЗ-волн, пьезоэлектрического или магнитострикционного преобразователя, набора рабочих камер (аппарат на основе УЗ-диспергатора УЗДН-1, Россия).

При большом количестве клеток используют *баллистическую дезинтеграцию*, ее проводят в высокоскоростных шаровых мельницах, куда помещают концентрированную суспензию клеток. Камера мельницы заполнена инертным абразивным материалом (стеклянными, полимерными шариками диаметром 1 мм). Содержимое быстро перемешивают лопасти, насаженные на ось. Большинство клеток разрушаются под действием сдвиговых напряжений, возникающих в результате быстрого движения шариков относительно друг друга, поверхности лопастей и камеры. Условия оптимального разрушения клеток подбирают, варьируя числом и формой лопастей, скоростью перемешивания, числом и размером шариков, геометрией камеры, температурой, концентрацией клеток (аппараты фирмы «Willi A. Bachhotem», Швейцария, «Gifford Wood Co», США).

**Соударение** – клеточную суспензию большой вязкости направляют под давлением на неподвижную поверхность, в месте соприкосновения выделяется большое количество энергии, разрушающей клетки. Активность клеточных белков при разрушении клеток методом соударения уменьшается незначительно.

**Экструзионные методы** (продавливание суспензии клеток через капиллярные отверстия) предназначены для обработки жидких или замороженных суспензий клеток. Диаметр отверстий рабочих матриц составляет от нескольких миллиметров до десятых его долей. В гидроэкструдерах давление достигает 2000–4000 кг/см<sup>2</sup>, в твердофазовых экструдерах – 10000–50000 кг/см<sup>2</sup>. После экструзии давление резко сбрасывают, что вызывает лизис клеток. Экструзионные дезинтеграторы производят фирмы «Manton Gaulin» (США), LKB (Швеция).

**Дальнейшая обработка.** После разрушения клеток их осколки удаляют низкоскоростным центрифугированием или микрофильтрацией через мембрану.

Белковый продукт выделяют из лизата методом высаливания – осаждением высококонцентрированными растворами нейтральных солей, чаще всего натрия- или аммония сульфатом. Седиментация белка может быть достигнута органическими растворителями (этанолом, ацетоном).

### 5.8. Получение готовой продукции

Получение готовой продукции связано с сушкой и консервированием биопрепаратов. Объект сушки – живые микроорганизмы, клетки, ферменты, гормоны и др. БАВ. Биопрепараты кроме биологически активной составляющей содержат органические соединения и значительное количество воды. Вода в продуктах биосинтеза может быть в свободном или связанном состояниях; значительная часть воды удерживается в субстрате физико-механическими и адсорбционными связями (вандерваальсовы силы). Физико-механически связанная вода находится в порах и капиллярах материала.

Для высаливания биопрепаратов применяют методы, не приводящие к потере биологической активности, где доминирует сублимационная сушка (установки типа «Иней» Института биологического приборостроения, г. Пушкино (Россия), «Юзефруа» (Франция), «Heto – Helton» (Дания).

Использование распылительных сушилок ограничено по причине сравнительно жестких условий сушки.

Термолабильные и неустойчивые по ряду показателей биопрепараты при высаливании в суспензиях (не содержащих защитных сред) подвержены существенным структурным и морфологическим измене-

ниям. Это может сопровождаться утратой жизнеспособности и разрушением клеточных структур.

**Среды высушивания (защитные среды) – криопротекторы.** Денатурирующее влияние замораживания сдерживается инактивацией (изменением свойств) защитных агентов:

- высокомолекулярных компонентов (ПВП м.м. от 2600 до 6400 – декстран, желатин, пептон);
- низкомолекулярных и буферных компонентов (глутамат, трис-буфер).

Защитная среда предохраняет биопрепараты от необратимых изменений в процессе замораживания, высушивания и при последующем хранении. Защитные среды, как правило, состоят из нескольких компонентов. Так, для консервирования клеточных культур используют криозащитные свойства глицерина и DMSO, их добавляют к питательной среде в концентрации 5–10%. При температуре минус 180–196 °С жизнеспособность законсервированной культуры может сохраняться неограниченно долго.

**Розлив, укупорку, этикетировку, упаковку готовой продукции** проводят в отдельных аппаратах (при малотоннажном производстве); это компактные установки для ампул, ёмкостей для инфузий; машины для укладки, упаковки.

Технологические линии (крупномасштабное промышленное производство) включают:

- УЗ-моечные машины;
- стерилизационные сушильные туннели (с ламинарными потоками горячего воздуха);
- машины для наполнения и запайки ампул;
- машины наполнения и запайки ёмкостей для растворов внутривенного введения (электронно-турбинный розлив в соответствии с GMP);
- машины для наполнения и запайки порошкообразных препаратов;
- машины для наполнения и укупорки флаконов с навинчивающимся колпачком и специальной насадкой;
- наполнительные и укупорочные машины для инъекций;
- машины для нанесения кода (маркировка цветным кольцом);
- машины для контроля на герметичность;

- этикетировочные машины;
- машины для капсулирования порошков;
- машины для сборки, наполнения, запайки шприц-тюбиков.

Отдельные установки и технологические линии выпускают фирмы Америки, Швейцарии, Франции, Германии, Финляндии; установки этих фирм отвечают требованиям GMP.

### Тест-контроль к главе 5

#### Выберите правильные ответы:

#### 1. Назначение питательных сред:

- А – защита клеток от воздействия факторов внешней среды;
- Б – поддержание оптимальных для роста клеток физико-химических условий;
- В – обеспечение клеток питательными веществами для синтеза биомассы;
- Г – обеспечение клеток питательными веществами для синтеза необходимых продуктов жизнедеятельности;
- Д – все вышеперечисленное верно.

#### 2. Источники серы в питательных средах:

- А – сероводород;
- Б – сульфаты;
- В – цистеин;
- Г – кристаллическая сера;
- Д – серная кислота.

#### 3. Обеспечение и сохранение стерильности питательных сред обеспечивают:

- А – стерилизацией исходных компонентов среды;
- Б – термической стерилизацией среды;
- В – стерилизующей фильтрацией;
- Г – добавлением антибиотиков;
- Д – все вышеперечисленное верно.

#### 4. Режим хранения культур-продуцентов предполагает:

- А – замораживание при температуре ниже  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- Б – замораживание при температуре ниже  $-2\text{...}-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- В – лиофильное высушивание;
- Г – консервирование;
- Д – термостатирование при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 5. Описание морфологических, физиологических характеристик питательных сред, условий выращивания и срока хранения культуры изложены в:

- А – ГФ XII издания;
- Б – паспорте на штамм культуры;
- В – справочной и научной литературе;
- Г – нормативном документе на продуцируемый препарат;
- Д – упаковке.

6. Признаки поверхностного способа культивирования:

- А – твердая питательная среда;
- Б – монослой суспензий клеток;
- В – фиксирование клеток на поверхности реактора;
- Г – использование микроскопических гранул-носителей;
- Д – все вышелечисленное верно.

7. Продолжительность лаг-фазы культивирования определяется:

- А – временем прогрева питательной среды;
- Б – продолжительностью стационарной фазы;
- В – отличиями среды хранения и среды культивирования;
- Г – фазой роста исходной культуры;
- Д – скоростью перемешивания питательной среды.

8. Фаза культивирования, характеризующаяся максимальным накоплением вторичных метаболитов (антибиотиков):

- А – лаг-фаза;
- Б – фаза ускорения;
- В – экспоненциальная или логарифмическая фаза;
- Г – фаза замедления;
- Д – стационарная фаза;
- Е – фаза отмирания.

9. Время добавления порций субстрата при периодическом культивировании определяется по:

- А – рН;
- Б – количеству синтезированных продуктов (кислот);
- В – объему реактора;
- Г – скорости перемешивания питательной среды;
- Д – плотности питательной среды.

10. Культуры с высокой плотностью получают:

- А – добавлением больших количеств питательных веществ;
- Б – оптимизацией состава культуральной среды;
- В – культивированием при избыточном давлении воздуха (кислорода);
- Г – культивированием при пониженном давлении воздуха;
- Д – снижением температуры культивирования.

11. Отличительные признаки эрлифного реактора:

- А – механическое перемешивание культуральной жидкости;
- Б – перемешивание среды барботированием;
- В – циркуляция среды за счет потока воздуха;
- Г – циркуляция среды за счет электромагнитных волн;
- Д – циркуляция среды за счет тепловой конвекции.

12. По эффективности биореакторы располагаются в следующем порядке:

- А – с механическим перемешиванием – барботажные – эрлифтные;
- Б – барботажные – эрлифтные – с механическим перемешиванием;
- В – эрлифтные – барботажные – с механическим перемешиванием;
- Г – барботажные – с механическим перемешиванием – эрлифтные;
- Д – с механическим перемешиванием – эрлифтные – барботажные.

13. Стерилизация биореактора осуществляется:

- А – дезинфицирующими растворами;
- Б – ультрафиолетовым облучением;
- В – влажным паром под давлением;
- Г – сухим воздухом под давлением;
- Д – стерильным раствором питательной среды.

14. Процесс ферментации контролируют по:

- А – концентрации минеральных веществ;
- Б – концентрации растворенного кислорода;
- В – рН;
- Г – температуре;
- Д – интенсивности перемешивания биомассы.

15. Контроль биомассы осуществляют по:  
 А – числу клеток и их линейных размеров;  
 Б – числу жизнеспособных клеток (методом окрашивания);  
 В – интенсивности дыхания (накоплению  $\text{CO}_2$ );  
 Г – содержанию белка;  
 Д – кондуктометрически.
16. Характерные признаки апоптоза клетки:  
 А – генетическая детерминанта, участие специальных внутриклеточных механизмов;  
 Б – непрограммируемая гибель клеток;  
 В – программируемый характер гибели клетки;  
 Г – процесс гибели неуправляем;  
 Д – процесс гибели обратим.
17. Для выделения клеток из культуральной среды используют:  
 А – флотацию;  
 Б – седиментацию;  
 В – сепарацию;  
 Г – центрифугирование;  
 Д – фильтрование.
18. Химический метод разрушения клеток используют при:  
 А – устойчивости получаемого продукта к щелочной среде;  
 Б – нестабильности получаемого продукта в щелочной среде;  
 В – термической устойчивости получаемого продукта;  
 Г – термолабильности получаемого продукта;  
 Д – любых условиях.
19. Баллистическая дезинтеграция клеток основана на:  
 А – бомбардировке клеточной массы тяжелыми ядрами;  
 Б – сдвиговых напряжениях поверхности инертных шариков, лопастей и реактора;  
 В – ударном воздействии клеток о неподвижную поверхность;  
 Г – обработке УЗ;  
 Д – воздействии высокого давления.

20. Состав клеточной стенки грамположительных бактерий:  
 А – частично фосфорилированные маннаты и  $\beta$ -глюканы;  
 Б –  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюканы, гликопротеиды и хитин;  
 В – пептидогликановый слой N-ацетилглюкозамина и остатков N-ацетилмуравовой кислоты, соединенных пептидными мостиками;  
 Г – фосфолипиды;  
 Д – целлюлоза.
21. Назначение защитных сред:  
 А – защита от изменений в процессе замораживания;  
 Б – защита от изменений в процессе высушивания и при последующем хранении;  
 В – повышение устойчивости к антибиотическим веществам;  
 Г – дополнительный источник питательных веществ;  
 Д – защита от влияния продуктов метаболизма.
22. Функцию защитных сред способны выполнять:  
 А – высококонцентрированные минеральные соли;  
 Б – ВМС (ПВП, декстран, желатин, пептон);  
 В – ПАВ (твин-80, спены);  
 Г – аэросил;  
 Д – низкомолекулярные и буферные компоненты (глутамат, трис-буфер).

## Глава 6. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА, ПОЛУЧЕННЫЕ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

В настоящее время с помощью рекомбинантных ДНК клонировано более 400 генов (в основном в виде кДНК) различных белков человека, которые являются или могут стать ЛС. По подсчетам специалистов ВОЗ, ежегодный объем мирового рынка ЛП на основе белков человека составляет около 150 млрд долларов и постоянно растет.

Развитие технологии рекомбинантных ДНК, разработка способов получения моноклональных антител, установление структуры и функции иммуноглобулинов привело к использованию специфических антител для лечения различных заболеваний. Работа с генами антител облегчается тем, что отдельные молекулы антитела выполняют разные функции. Привлекательность применения в качестве терапевтических средств специфических антител объясняется тем, что их можно использовать для нейтрализации токсинов, борьбы с бактериями, вирусами, для лечения онкологических заболеваний. Антитело можно уподобить самонаводящейся ракете, которая или нейтрализует «нарушителя» – чужеродного агента, или, если она оснащена «боеголовкой», разрушает специфическую клетку-мишень.

### 6.1. Моноклональные антитела как лекарственные средства

Молекула антитела (иммуноглобулина) состоит из двух «легких» (L) и двух «тяжелых» (H) белковых цепей, которые соединены водородными связями и дисульфидными мостиками, расположенными в строго определенных местах. N-концевые участки L- и H-цепей образуют антигенсвязывающий сайт, отдельные области (домены) молекулы антитела выполняют разные функции. Антигенсвязывающие сайты состоят из трех участков, определяющих комплементарность антител к антигену (CDR) и образующих переменные области ( $V_H$  и  $V_L$ ) на N-концах H- и L-цепей. Кроме переменных ( $V_H$  и  $V_L$ ) каждая L-цепь содержит одну константную область или домен ( $C_L$ ), каждая H-цепь – три константных области или домена ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ). При обработке антитела протеолитическим ферментом – папаином – образуются три фрагмента: два идентичных (Fab), каждый из которых содержит ин-

тактную L-цепь, связанную дисульфидным мостиком с  $V_H$  и  $C_{H1}$  – доменами H-цепи, и один Fc, состоящий из двух соединенной дисульфидной связью с  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$  – доменов H-цепи.

Fab-фрагмент, точнее его N-концевая часть, называемая Fv-фрагментом, обладает антигенсвязывающей активностью, присущей интактной молекуле антитела.

После связывания антигена с интактным антителом запускаются реакции иммунного ответа:

1. Активируется система комплемента; компоненты этой системы разрушают клеточные мембраны, активируют фагоциты и генерируют сигналы, мобилизующие другие компоненты системы иммунного ответа.
2. В результате связывания Fc-участка антитела с Fc-рецептором эффекторной клетки, запускается реакция опосредованной антителами клеточной цитотоксичности. Активированная эффекторная клетка высвобождает вещества, лизирующие чужеродную клетку, с которой связан Fab-участок молекулы антитела.
3. После связывания Fab-участка с растворимым антигеном, Fc-участок антитела может присоединиться к рецепторам фагоцитов, которые захватывают и разрушают комплекс антиген – антитело.

Для облегчения доставки лекарственного вещества (ЛВ) к месту его действия используют несколько приемов:

- Заклюают в липосомы, липидная оболочка которых имеет высокое сродство к клеткам нужных органов.
- Встраивают гены специфических токсинов в инфильтрующие опухоль лимфоциты, которые высвобождают эти токсины непосредственно в опухоли.
- Присоединяют молекулы ЛВ к моноклональным антителам или их Fv-фрагментам, специфичным по отношению к белкам, находящимся на поверхности строго определенных клеток, например опухолевых (рис. 13, А).
- Используют ЛВ в неактивной форме, переводя их в активное состояние при помощи ферментов. Чтобы такое превращение происходило только вблизи клетки-мишени, фермент присоединяют к моноклональному антителу, специфичному к поверхностному антигену этой клетки (рис. 13, Б).



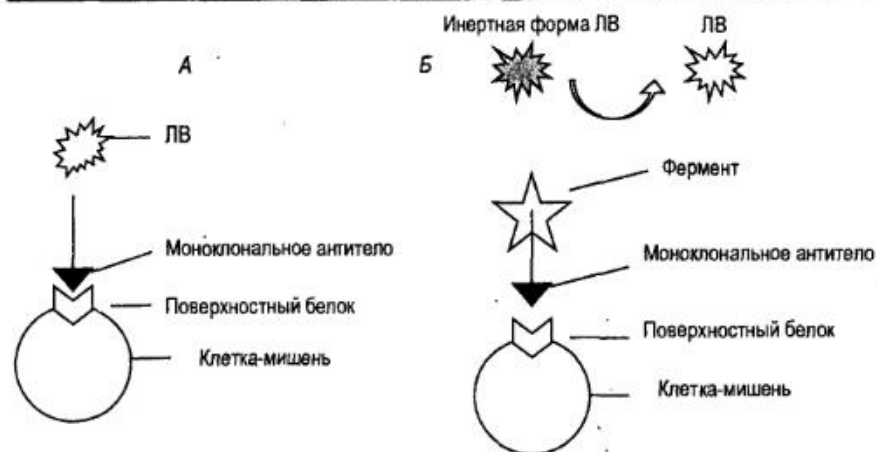


Рис. 13. Схематическое изображение системы целевой доставки ЛВ, основанной на использовании моноклональных антител (по Б. Глику, Дж. Пастернаку): А – молекула ЛВ присоединена к моноклональному антителу; Б – к моноклональному антителу присоединен фермент, превращающий инертную форму ЛВ в активную только в непосредственной близости от клетки-мишени

В обоих случаях моноклональное антитело связывается с одним специфическим белком на поверхности клетки-мишени.

## 6.2. Тромболитики и антикоагулянты

Система свертывания крови состоит из тромбоцитов и содержащихся в них пластинчатых факторов (аденозиндифосфата), тканевого тромбопластина, серотонина, антиплазмина, фибронектина, тромбоспондина и др.), плазменных белков, синтезирующихся в клетках печени (протромбина, проконвертина, антигемофильных глобулинов, тромботропина, фибриногена и др.).

Антисвертывающая система представлена плазмином (фибринолизин) – протеолитическим ферментом, находящимся в крови в неактивном состоянии (плазминоген), белками плазмы крови (протенами С, S, антитромбином III, тормозящими процесс образования фибрина, а также веществами, продуцируемыми (простациклин, тромбомодулин и др.) или фиксированными на эндотелиальных клетках (гепарин). При нарушении равновесия между этими двумя системами может возникать

или повышенная кровоточивость, или тромбообразование, или сочетание того и другого.

Наиболее частой причиной смерти являются тромбоэмболия мозговых или сердечных артерий. Известно, что тромб состоит из молекул фибрина, фактора свертывающей системы крови, образующего сеть в ответ на повреждение сосудистой стенки. В норме молекулы фибрина в образовавшемся тромбе расщепляются ферментом, способствующим растворению фибрина *in vivo*, – сериновой протеиназой плазмينا, который образуется из плазминогена под действием активатора (рис. 14).

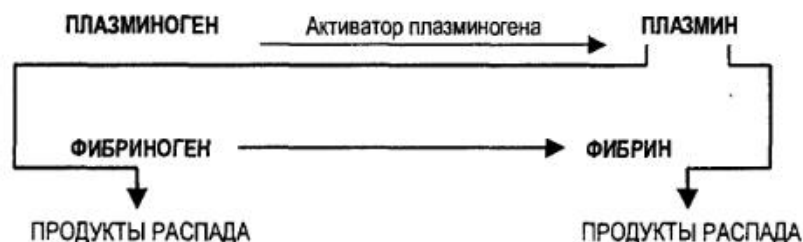


Рис. 14. Активация плазминогена с превращением его в плазмин и разрушение плазмином двух субстратов (фибриногена и фибрина) в крови

Нередко эта биологическая система работает недостаточно эффективно, что приводит к закупорке артерий. В таких ситуациях для повышения уровня плазмينا в крови было предложено использовать активатор плазминогена (АПг) в качестве терапевтического средства. Однако плазмин способен разрушать и предшественник фибрина – фибриноген (рис. 15), и если уровень фибриногена в результате терапии с использо-

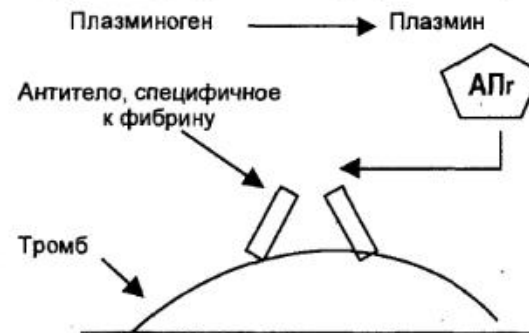


Рис. 15. Структура иммунотерапевтического тромболитического агента

ванием АПг значительно снизится, могут произойти обширные внутрение кровотечения.

К моноклональному антителу, специфичному к фибрину, присоединен АПг. Этот комплекс связывается с фибрином, находящимся в тромбе, АПг вызывает накопление плазмينا вблизи тромба, и плазмин лизирует тромб.

Тромболитическая терапия, осуществляемая *активаторами плазминогена тканевого типа (ТАПг)*, широко используется при лечении острого инфаркта миокарда, закупорки мозговых и коронарных артерий, эмболии легких.

Плазминоген человека представляет собой одноцепочечный гликопротеин м.м. 90000; его содержание в плазме составляет примерно 2 мкмоль/л. Плазминоген обладает способностью превращаться в плазмин с помощью природных активаторов плазминогена, находящихся в небольшом количестве в органах и тканях, либо с помощью бактериальной стрептокиназы. Одно из основных свойств АПг – способность участвовать в процессе фибринолиза. Эти ферменты, представляющие собой естественные тромболитические агенты, имеют огромное значение в борьбе с коронарными и церебральными тромбозами и тромбозами сосудов легких.

Активирование плазминогена стрептокиназой заключается в образовании на начальной стадии комплекса плазминоген – стрептокиназа, обладающего способностью активировать молекулу плазминогена; этот комплекс затем с помощью ферментативного механизма обеспечивает превращение плазминогена в плазмин.

Плазмин (фибринолизин) является эндопептидазой широкого спектра действия. Как плазминоген, так и плазмин содержат по пять дисульфидных мостиков, за счет которых формируются специфические домены. Препарат является протеолитическим ферментом, образующимся при активации трипсином содержащегося в крови человека плазминогена. Он вызывает только наружный лизис тромба (преимущественно в венах), так как быстро нейтрализуется антиплазмином, в избытке циркулирующим в крови.

Плазмин обладает свойствами активатора, переводящего эндогенный плазминоген в плазмин. Продукты деградации фибрина, образующиеся при его разрушении, препятствуют полимеризации мономеров фибрина и образованию тромбопластина.

Однако плазмин может вызвать активацию свертывающей системы крови и повысить антифибринолитические свойства крови. Поэтому его вводят с гепарином.

Генерируемый активатором плазминогена плазмин кроме растворения тромбов способен стимулировать деление клеток, видоизменять клеточные поверхности, активировать специфические протеазы, превращать проинсулин и проадренкортикотропин в инсулин и АКТГ соответственно.

С учетом м.м., энзиматических и серологических свойств, способности связывать фибрин плазмы крови АПг принято делить на активаторы тканевого и урокиназного типов.

**Активаторы плазминогена тканевого типа.** Содержание ТАПг широко варьирует в различных органах тканей: препарат, полученный из ткани матки человека, характеризуется м.м. 69000 и состоит из двух полипептидных цепей с м.м. 31000 и 38000; фермент, экстрагированный из клеток сосудов трупа человека, имеет м.м. 60000 и состоит из двух близких по размеру полипептидов. Природный ТАПг может существовать как в виде протеолитически деградируемой двухцепочечной, так и одноцепочечной формы.

Получают природный ТАПг методом культивирования клеток. Основной источник получения препарата – линия клеток меланомы человека; такой фермент – мТАПг характеризуется м.м. 72000 и, в зависимости от условий культивирования и очистки, может быть получен в одно- и двухцепочечной форме. Для очистки ТАПг, полученного из культуры клеток меланомы, применяют аффинную хроматографию с использованием пяти аффинных сорбентов: конканавалина А, л-аминобензамидина, имидинодиуксусной кислоты, борной кислоты, лизина – все марки 5PW.

Метод получения рекомбинантного ТАПг (рТАПг) разработан в 80-х гг. XX в. Ген ТАПг расположен у человека в хромосоме 8. Технологи клонирования и экспрессии рТАПг в клетках *E. coli*, *S. cerevisiae* и клетках животных позволили получать ТАПг в промышленных масштабах, провести широкое клиническое изучение и выйти на мировой рынок тромболитиков.

Сравнительное изучение мТАПг и рТАПг в отношении тромболитиза при инфаркте миокарда и других типов тромбозов показало полную идентичность их биологических тромболитических свойств. Лидерами в области разработки рТАПг (альтеплазы) являются фирмы «Genentech»

и «Boehringer Ingelheim», выпускающие альтеплазу под торговыми названиями activase и actilyse.

**Активаторы пламиногена урокиназного типа. Урокиназа** – активатор пламиногена, содержащийся в моче человека, состоит из двух полипептидных цепей (А и В), соединенных между собой дисульфидным мостиком, встречается в высоко- и низкомолекулярной формах (м.м. соответственно 55000 и 34000).

Препарат получают из культуры клеток эмбриона почки человека. Урокиназа активирует пламиноген, превращая его в пламин. Фибринолитический эффект наступает быстрее, чем от стрептокиназы. Препарат способен активировать фибринолиз внутри тромба (эндотромболиз) и на его поверхности (экзотромболизис). По клинико-фармакологической характеристике урокиназа близка к стрептокиназе. Урокиназа не обладает выраженными антигенными свойствами, поэтому при ее использовании меньшая опасность возникновения аллергических реакций и ее назначают повторно.

Одноцепочечная форма урокиназы получила название проурокиназы. Проурокиназа является проферментом урокиназы, содержится в различных органах и тканях, включая плазму крови. Проурокиназа – одноцепочечный гликопротеин, состоящий из 411 аминокислот. Гидролиз одной из пептидных связей пламиноном способствует ее трансформации в урокиназу.

Большое значение имеет получение активаторов пламиногена урокиназного типа методом генной инженерии. Ген урокиназы/проурокиназы локализуется у человека в хромосоме 10; продукт экспрессии гена урокиназы, клонированного в *E. coli*, содержит одну или две цепи в зависимости от присутствия ингибиторов протеаз в процессе очистки фермента. Оценка биологических и фибринолитических свойств рекомбинантной урокиназы (р-урокиназы), рекомбинантной проурокиназы (р-проурокиназы) и природной урокиназы, выделенной из мочи, показала, что рекомбинантные урокиназа и проурокиназа обладают лучшей тромбоселективностью и вызывают меньшее число побочных явлений, чем урокиназа.

**Стрептокиназа** – тромболитик прямого действия, является активатором пламиногена, относится к тромболитикам I поколения. В очищенном виде стрептокиназа представляет собой пористую массу белого цвета без запаха, легко растворимую в воде, м.м. 40000–50000.

Препарат получают из β-гемолитического стрептококка группы С. Это не прямой фибринолитик. Стрептокиназа стимулирует перевод цир-

кулирующего в крови проактиватора в активатор, трансформирующий пламиноген в пламин. Препарат способен проникать внутрь тромба и активировать в нем фибринолиз, чем выгодно отличается от пламина. Продукты распада тромба, циркулирующие в крови, вызывают гипокоагуляцию, блокируют агрегацию эритроцитов и тромбоцитов, снижают вязкость крови.

Среди тромболитических препаратов стрептокиназа занимает прочную позицию, что обусловлено доступностью получения ее из микробного сырья и относительно невысокой реактогенностью (антитела к стрептокиназе исчезают в течение 6 месяцев; иммунологическая реактогенность этого белка обычно проявляется лишь у лиц с отягощенным анамнезом, например, перенесших стрептококковую инфекцию).

На мировом рынке медикаментов лидируют препараты стрептокиназы из микробного сырья: **кабиказа** (фирма «Kabi Vitrum»), **стрептаза** (фирма «Hoechst»), **стрептокиназа** (фирма «Smith Kline»).

Фирма «Phillips Petroleum» (США) запатентовала метод экспрессии стрептокиназы в *S. cerevisiae*. Экспрессируемый в дрожжах белок по м.м. и активности идентичен стрептокиназе, полученной из *Streptococcus equisimilis*. Метод рекомбинантных ДНК позволил получить высокий выход искомого продукта – 1г/1л среды.

Методом рекомбинантных ДНК получен вектор, несущий ген стрептокиназы, адаптированный для трансформации в бактериальный геном (патент США).

Зapatентован метод (Германия) ферментационного получения стрептокиназы; генноинженерным способом получена плазида, содержащая ген стрептокиназы. Экспрессия стрептокиназы получена трансформацией этой плазмиды в клетки *Streptococcus*. После ферментации таких клеток из культуральной жидкости выделена и очищена стрептокиназа м.м. 42000.

**Стрептодеказа** – пролонгированный препарат стрептокиназы, относящийся к группе иммобилизованных ферментов, нанесенных на водорастворимую матрицу полисахаридной природы. Однократное введение средней терапевтической дозы обеспечивает повышение фибринолитической активности крови в течение 48–72 ч.

Рекомбинантный тканевой активатор пламиногена (**актилизе**) является гликопротеином (полным аналогом эндогенного вещества, вырабатываемого эндотелием), который после системного введения находится в плазме в неактивной форме до момента связывания с фибрином. После активации препарата он способствует переходу пламиногена в

плазмин и ведет к растворению фибринового сгустка, повышая фибринолиз только в ткани тромба.

**Ацилированный комплекс стрептокиназы и плазминогена** (торговое название *эминаза*) – тромболитик 2-го поколения, разработан и запатентован английской фирмой «Beecham». Ацильная группа, входящая в состав комплекса, защищает тромболитик от инактивации природным ингибитором L<sub>2</sub>-антиплазмином. По мере поступления *emipase* в кровяное русло начинается быстрое гидролитическое отщепление ацильной группы, высвобождение активированного комплекса происходит с постоянной скоростью. Комплекс действует почти исключительно на фибрин кровяного сгустка, не затрагивая фибриноген. Наиболее грозное побочное действие тромболитиков – возникновение внезапных кровотечений – проявляется при применении *emipase* весьма редко. Успех международных клинических испытаний *emipase* обеспечил признание этого тромболитического средства на мировом рынке.

В качестве тромболитиков предложены химерные (гибридные) молекулы, содержащие домены ТАПг и урокиназы; эти гибридные молекулы характеризуются таким же родством к фибрину и способностью к лизису тромбов, как и рТАПг. Химерные молекулы получают методом слияния концевой кДНК, кодирующей концевой аминокислотный фрагмент ТАПг, ответственный за специфичность в отношении фибрина, с кДНК, кодирующей концевой карбоксисодержащий фрагмент проурокиназы, ответственный за ферментативные свойства молекулы. Это соединение обладает специфичностью к фибрину, характерной для обеих молекул; лечебная доза этого препарата может быть в 4 раза меньшей, чем доза ТАПг и урокиназы, вводимых отдельно; прямым следствием снижения дозы является уменьшение вероятности возникновения побочного действия.

Сконструированы химерные молекулы, содержащие фрагменты ТАПг, урокиназы и проурокиназы, клонированные в животных клетках (фирма «Ciba-Geigy», Швейцария).

Разработаны генно-инженерные системы доставки тромболитиков (США). Описано строение моноклонального антитела, способного доставить тромболитический белок к месту образования тромба. Гены, ответственные за образование β-цепи ТАПг, были внедрены в гибридомы, продуцирующие антитела, которые экспрессировали белок, способный избирательно доставляться к месту скопления фибрина, кроме того, такой активированный белок способен активировать плазминоген (фирма «Genentech»).

**Антикоагулянты.** *Гепарин* и его производные принадлежат к числу наиболее безопасных препаратов. Гепарин относится к гуморальным факторам регуляции жидкого состояния крови и обладает высокой связывающей способностью практически ко всем факторам системы коагуляции. Гепарин нейтрализует действие сериновых протеиназ и фибринозных систем за счет образования комплекса антитромбин III-гепарин (АТ-III-гепарин). Препараты гепарина гетерогенны и содержат фракции с высоким и низким средством связывания с АТ-III (АТ-III является ингибитором активаторов плазминогена).

В медицинской практике используются препараты низкомолекулярного или фракционного гепарина – *логипарин*, *фраксипарин*, *далтепарин*, *кливарин*. Их относят к гепаринам II поколения. Получают низкомолекулярные гепарины методом ферментативной деполимеризации высокомолекулярного гепарина с помощью бактериальной гепариназы. Гепарин повышает активность фибринолитической системы за счет образования комплекса с антиплазмином. Гепарин накапливается на поверхности эндотелиальных клеток и клеток крови, создавая на их мембранах концентрацию в 100 раз большую, чем в плазме крови. Этим он придает поверхности эндотелия и тромбоцитов отрицательный заряд, препятствуя их адгезии и агрегации, а также высвобождению из них агрегирующих факторов.

Низкомолекулярные гепарины не влияют на коагуляцию, т.е. они не изменяют время свертывания крови, но их терапевтический эффект больше, чем у высокомолекулярных форм. Это свидетельство того, что основное в действии гепарина – ограничение агрегации и адгезии тромбоцитов. Подтверждением данного механизма является и отсутствие корреляции между клинической эффективностью гепарина и увеличением времени свертывания крови.

Антикоагулянт *фрагмин* (фирма «Kabi Vitrum», Швеция) получают из стандартного гепарина, извлекая из него составную часть, обладающую наибольшей антикоагулянтной активностью. *Fragmin* имеет достаточно длительный период полураспада, что позволяет применять его в виде однократной подкожной инъекции. Кроме антикоагулянтного и тромболитического действий отмечено его благоприятное влияние на снижение уровня триглицеридов в крови. ВОЗ рекомендовала использовать *фрагмин* в качестве международного стандарта при оценке лечебного эффекта и безопасности антикоагулянтов нового поколения.

Методом органического синтеза (фирмы «Organon», Нидерланды и «Choу», Франция) получен гепариноид – аналог гепарина; активное начало этого препарата оставляют сульфатированные олигосахариды.

*Гирудин* – антикоагулянт прямого быстрого действия, это белок, вырабатываемый слюнными железами медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*), которая в течение ряда лет использовалась для предотвращения тромбозов мелких сосудов. Гирудин является сильным и специфичным ингибитором тромбина и относится к группе противосвертывающих препаратов прямого быстрого действия, препятствующих образованию и отложению нитей фибрина. Он инактивирует связанный с фибрином тромбин в тромбах. Существует несколько близкородственных вариантов гирудина (HV<sub>1</sub>, HV<sub>2</sub>, HV<sub>3</sub>). Наиболее изучен HV<sub>1</sub>, представляющий белок с м.м. около 7000, состоящий из 65 аминокислотных остатков. Гирудин ингибирует только тромбин и неактивен в отношении трипсина и плазмина. Введение гирудина не влияет на работу сердца, органов дыхания, иммунной системы.

В настоящее время гирудин получают с использованием технологии рекомбинантных ДНК. Ген гирудина экспрессирован в *S. cerevisiae* (фирмы «Francgene», «Sanofi», Франция); для очистки препарата использована ВЭЖХ.

Фирмой «Ciba Geigy» разработан метод экспрессии частично десульфатированного варианта гирудина (десульфатогирудина) в *S. cerevisiae*. Рекомбинантный гирудин с одной отсутствующей сульфогруппой по антикоагулянтной активности превосходит гепарин.

*Белки С и S* являются важными факторами антикоагулянтной системы. Белок С был впервые описан в 1960 г. как аутопротромбин II-а и лишь в 1976 г. выделен в чистом виде. Белок С-гликопротеин м.м. 62000 состоит из двух субъединиц, связанных дисульфидным мостиком, содержит около 10 аминокислотных остатков  $\gamma$ -карбоксиглутаминовой кислоты.

*Белок С* является витамин-К-зависимым ингибитором свертывающей системы. Имеются данные, что снижение уровня белка С в крови связано с риском возникновения тромбозов, причем дефицит этого белка бывает наследственным и приобретенным; так, при недостатке белка С может развиваться тромбоз. Дефицит белка С наблюдается при заболеваниях печени (возможно, синтез белка С происходит в этом органе).

*Белок S* является кофактором белка С и образует с последним активированный комплекс на поверхности фосфолипидных мембран тром-

боцитов, эндотелиальных и других клеток; в результате каталитическая способность белка С возрастает. Белок S также является витамин-К-зависимым и имеет высокое сродство к отрицательно заряженным фосфолипидам. Белок S – гликопротеин с м.м. 69000.

Разработана технология получения рекомбинантного белка С (фирма «Eli Lilly») в культуре клеток почек, трансформированной аденовирусом. Очищенный белок на 90% представлен двухпептидным компонентом и на 10% однопептидным, по активности не уступает белку С, находящемуся в плазме крови человека. Генноинженерный препарат белка С предложен для лечения последствий ортопедической и абдоминальной хирургии, легочной эмболии.

Два рекомбинантных гибрида белка С (антикоагулянтной и фибринолитической активности) (фирма «Hoechst Japan»), не уступающие белку С из крови человека, предупреждают острый инфаркт миокарда и послеоперационные тромбозы.

В 1982 г. выделен и охарактеризован еще один кофактор активации белка С – тромбомодулин, локализованный в мембране эндотелиальных клеток и являющийся кальций-зависимым ингибитором коагуляции и агглютинации тромбоцитов. Тромбомодулин – неразветвленный гликопротеин с м.м. 68000–77000, содержит 117 аминокислотных остатков. Выделен структурный ген тромбомодулина, ген клонирован с последующей экспрессией в клетках почек обезьяны (фирма «Asahi Chemical», Япония).

### 6.3. Аминокислоты

Аминокислоты широко применяют в медицине для терапии послеоперационных больных, при лечении заболеваний ЦНС, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, печени (серотонин, аспарагин, валин, гистидин, глицин, глутамин и глутаминовая кислота, изолейцин, лейцин, метионин, пролин, тирозин, триптофан, фенилаланин, цистеин); в пищевой промышленности в качестве усилителей вкуса и аромата, антиоксидантов и пищевых добавок (аланин, аспарагиновая кислота, глицин, глутаминовая кислота, лизин, цистеин); в сельском хозяйстве – в качестве кормовых добавок (лизин, треонин); в химической промышленности – как исходные вещества при синтезе полимеров и производстве косметических средств.

Ежегодно в мире производится более 800000 т аминокислот стоимостью более 5 млрд долларов; при этом больше половины общего объема

производства приходится на долю L-глутаминовой кислоты, которую используют для получения широко известного усилителя вкуса и аромата – натрия глутамата.

В промышленном масштабе аминокислоты получают, в основном, экстракцией из белковых гидролизатов или очисткой продуктов метаболизма двух неспорულიрующих грамположительных почвенных бактерий – *Corynebacterium* или *Brevi bacterium* spp. Обычно для повышения продуктивности этих микроорганизмов используют мутагенез с последующим отбором штаммов – сверхпродуцентов определенных аминокислот, но такой способ получения штаммов требует много времени и эффективность его невелика. Альтернативные подходы – выделение и изменение специфических генов, кодирующих ключевые ферменты определенных биохимических реакций. Например, генноинженерный способ получения аминокислоты *триптофана*, синтезируемой *S. glutamicum*, одного из видов *Corynebacterium*. Для этого в клетки *S. glutamicum* дикого типа введена копия гена, кодирующего антранилатсинтазу, фермента, лимитирующего синтез триптофана.

Высокий уровень биосинтеза триптофана достигают введением в клетки *S. glutamicum* модифицированных генов трех ключевых ферментов: 3-дезоксид-Д-арабиногептулозонат-7-фосфатсинтазы, антранилатсинтазы и антранилатфосфорибозилтрансферазы. В качестве альтернативы для синтеза аминокислот можно использовать *E. coli*.

Известно, что важным регулятором функций клеток, тканей и органов, осуществляемых через жидкие среды организма, является  $\alpha_2$ -макроглобулин (МГ). Этот белок способен ингибировать активность протеолитических ферментов, транспортировать цитокины, регулировать процессы эндоцитоза, кооперации различных клеток крови, презентировать микроорганизмы и гены. Из плазмы крови человека очисткой  $\alpha_2$ -МГ, сочетающей дробное осаждение полиэтиленгликолем, анионообменной и металхелатной аффинной хроматографией, получен нативный белок  $\alpha_2$ -МГ, имеющий уникальные регуляторные свойства, – высокую ингибирующую активность в отношении протеиназ; препарат (НПО «Вектор», Новокузнецкий ГИУВ) показан при воспалительных процессах, передозировках протеиназ, септических состояниях, вызванных микроорганизмами. На основе нативного  $\alpha_2$ -МГ получены стабильные, имеющие полную биологическую совместимость комплексы с плазмином и интерфероном  $\alpha$ -ИФ<sub>2</sub>. Доставка комплекса  $\alpha_2$ -МГ-ИФ<sub>2</sub> непосредственно в опухоль весьма перспективна в онкологии.

Природные пептиды любого происхождения универсальны, они оказывают защитное действие на организм млекопитающих, стимулируя работу одной из главных систем – иммунной. Ценным сырьем для получения полипептидов являются гидробионты. Первым препаратом гидробионтов был *ганглин*, полученный в 1981 г. в НПО «Биомед» из ганглиев тихоокеанских кальмаров методом ультрафильтрационной очистки и выделения пептидов. Ганглин содержит 45 пептидных фракций. Иммуномодулирующие свойства ганглина определили его применение для устранения любых вторичных иммунодефицитов. Препарат оказывает регулирующее влияние на реакции клеточного и гуморального звеньев иммунитета и неспецифическую резистентность организма, усиливает функциональную активность ПМЯЛ и макрофагов, стимулирует образование, дифференцировку и функциональную активность Т-лимфоцитов, синтез специфических антител в сыворотке крови, уменьшает развитие аутоиммунных процессов, обладает антигистаминными, антисеротониновыми, противовоспалительными свойствами.

Ганглин зарегистрирован в качестве пищевой добавки для ветеринарии, корригирующей иммунодефициты и оказывающей положительное влияние на гомопоз.

Препарат гидробионтов – *молокин* – получен из молок лососевых рыб; наряду с иммунорегулирующей активностью обладает гонадотропными свойствами.

Препарат *вермин* (НПО «Биомед») представляет собой очищенную, стерильную, лиофильно высушенную смесь белков и пептидов, экстрагированных из гомогената червей *Eisenia foetida*; препарат нетоксичен, не проявляет мутагенной активности; обладает ферментативной активностью оксидоредуктаз, трансфераз и гидролаз, оказывает иммуномодулирующее действие. Мазь на основе вермина предложена для лечения длительно незаживающих гнойных ран.

#### 6.4. Синтез L-аскорбиновой кислоты

В настоящее время для крупномасштабного производства L-аскорбиновой кислоты (витамина С) используют преимущественно трудоемкий процесс, включающий одну микробиологическую стадию и несколько химических. Исходным субстратом для него является D-глюкоза (рис. 16).

На последнем этапе этого процесса 2-кето-L-гулоновая кислота (2-KLG) превращается в кислых условиях в L-аскорбиновую кислоту.

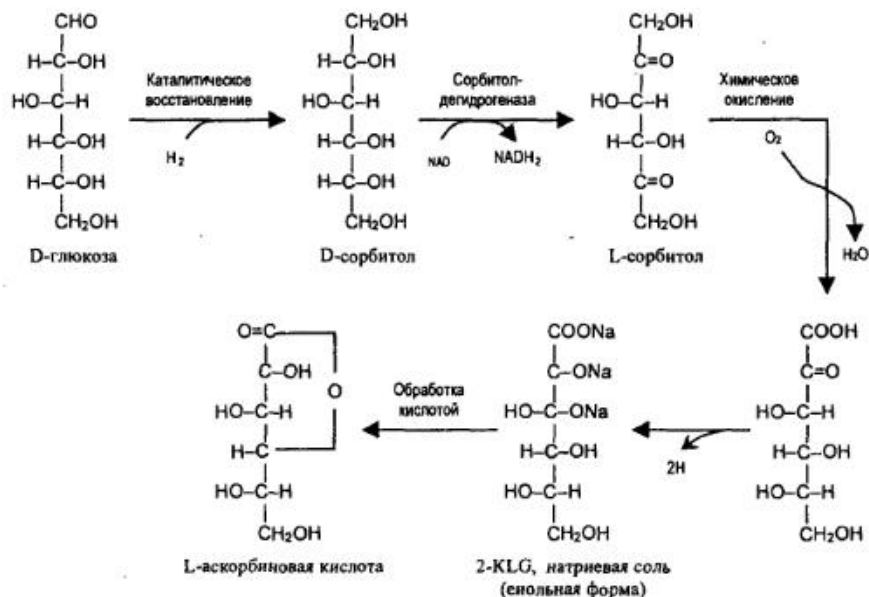


Рис. 16. Промышленный синтез L-аскорбиновой кислоты. Стадия превращения L-сорбитола в L-сорбозу осуществляется при участии бактерии *Acetobacter suboxydans*, которая синтезирует фермент сорбитолдегидрогеназу. Остальные стадии – чисто химические реакции (по Б. Глику, Дж. Пастернаку)

Биохимические исследования метаболизма различных микроорганизмов показали, что 2-KLG можно получить, включая совместное культивирование микроорганизмов *Corynebacterium* и *Erwinia herbicola* для превращения глюкозы в 2-KLG. Однако условия культивирования, оптимальные для одного организма, неприемлемы для другого, что влечет спонтанное «вымывание» из среды одного из них. В подобных случаях можно культивировать микроорганизмы последовательно, но такой процесс трудно сделать непрерывным, так как для роста микроорганизмов необходимы существенно разные среды (рис. 17).

Наиболее простой способ – создание одного микроорганизма, способного превращать D-глюкозу в 2-KLG, состоит в выделении гена

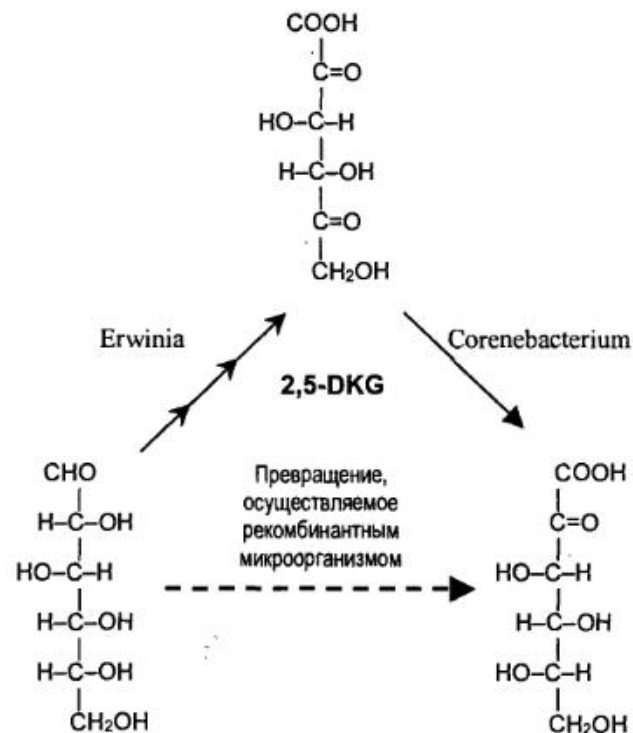


Рис. 17. Микробиологический синтез 2-KLG. *Erwinia* продуцирует три фермента, обеспечивающих синтез 2,5-DKG из D-глюкозы, а *Corynebacterium* – фермент, катализирующий превращение 2,5-DKG в 2-KLG. Таким образом, непосредственный предшественник аскорбиновой кислоты можно синтезировать из глюкозы совместным культивированием двух микроорганизмов (по Б. Глику, Дж. Пастернаку)

2,5-DKG-редуктазы *Corynebacterium* и введении его в *Erwinia herbicola* (рис. 18).

Трансформированные клетки *Erwinia herbicola* активно превращают D-глюкозу непосредственно в 2-KLG. При этом собственные ферменты *Erwinia herbicola*, локализованные во внутренней мембране бактериальной клетки, преобразуют глюкозу в 2,5-DKG (2,5-дикетоглюка-

новая кислота), а 2,5-DKG-редуктаза, локализованная в цитоплазме, катализирует процесс превращения 2,5-DKG в 2-KLG.

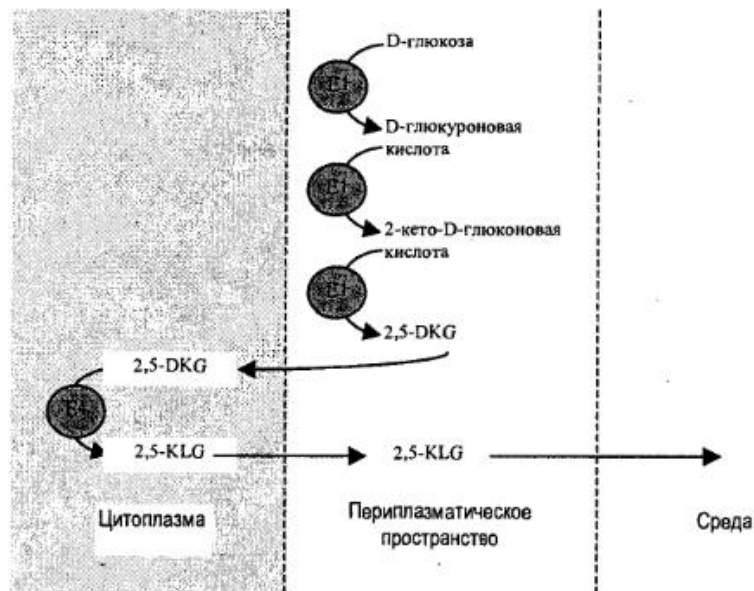


Рис. 18. Превращение D-глюкозы в 2-KLG рекомбинантной бактерией *Erwinia herbicola*. Ферменты, участвующие в этом процессе, обозначены буквой E и последовательно пронумерованы

Следовательно, с помощью генетических манипуляций удалось в одном организме осуществить метаболические реакции, протекающие в столь разных микроорганизмах. Этот гибрид приобрел способность синтезировать конечный продукт комбинированного метаболического пути. Такой организм используется как фабрика для производства 2-KLG, заменяющая три стадии в том процессе получения L-аскорбиновой кислоты, который доминирует и в настоящее время.

## 6.5. Гормональные препараты

### 6.5.1. Инсулин

**Инсулин** синтезируется  $\beta$ -клетками островков Лангерганса поджелудочной железы; 70% мРНК, выделенных из этих клеток, кодируют именно этот белок.

Человеческий инсулин – полипептид с м.м. 5808, состоящий из 51-й аминокислоты, которые образуют две соединенные дисульфидными мостиками полипептидные цепи (одна цепь состоит из 21 аминокислоты, так называемая цепь А; другая – из 30 аминокислотных остатков, так называемая цепь В). Аминокислотный состав цепей видоспецифичен. Предшественник инсулина продуцируется внутри  $\beta$ -клеток посредством ДНК- и РНК-управляемого синтеза. Длинная цепь проинсулина в аппарате гольджи упаковывается в гранулы, где в результате гидролиза удаляются четыре аминокислоты (обозначенные пунктом на рис. 19) с образованием инсулина и связывающего пигмента, называемого С-пептидом. Инсулин и С-пептид в эквивалентных концентрациях секретируются в ответ на все стимуляторы секреции инсулина (глюкозу, маннозу и некоторые аминокислоты – лейцин, аргинин). Выделяется также небольшое количество нативного или частично гидролизованного проинсулина, который оказывает некоторое гипогликемическое действие. В гранулах  $\beta$ -клеток инсулин депонируется в виде кристаллов, состоящих из двух атомов цинка и шести молекул инсулина. В целом, человеческая поджелудочная железа содержит до 8 мг инсулина, что составляет приблизительно 200 биологических «единиц» (количество единиц определяют по массе препарата; существующий инсулиновый стандарт, используемый в аналитических целях, составляет 28 ЕД/мг).

Инсулин обладает мощным действием, охватывающим биосинтез нуклеиновых кислот, белков, обмен углеводов, липидов, продукцию высокоэнергетических соединений. Инсулин регулирует углеводный обмен, усиливает усвоение тканями глюкозы и способствует превращению ее в гликоген, облегчает проникновение глюкозы в клетки тканей. Будучи специфическим средством терапии сахарного диабета, инсулин снижает гипергликемию и глюкозурию, пополняет депо гликогена в мышцах и печени, уменьшает образование глюкозы, снимает диабетическую липемию, улучшает общее состояние больного. Единственное отличие больного человека от здорового в том, что здоровые получают



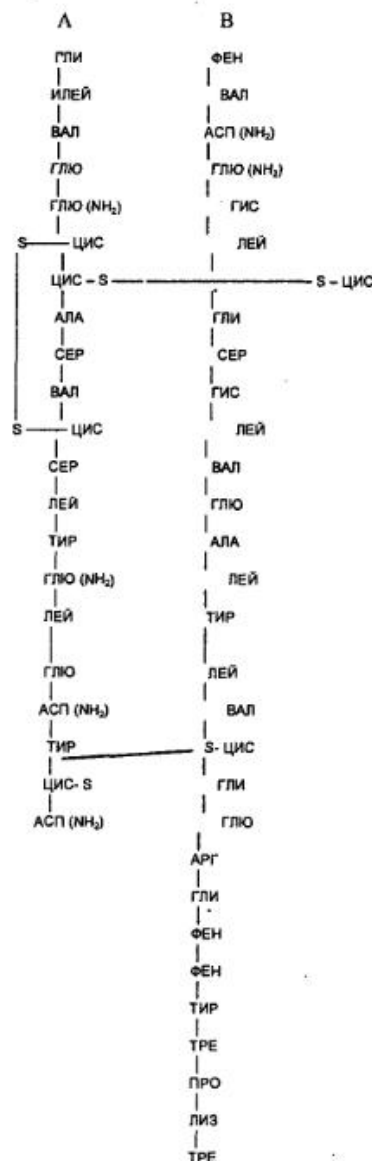


Рис. 19. Формула инсулина

этот гормон благодаря собственной поджелудочной железе, больные – из рук государства.

Сахарным диабетом I типа – инсулинзависимым диабетом (ИЗСД) – официально больны свыше 3 млн российских граждан, «неофициально» – до 10 млн. Известно, что ИЗСД (тяжелая форма, при отсутствии лечения приводящая к кетозу), наряду с сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями занимает одно из ведущих мест по медико-социальной значимости и является причиной ранней инвалидности и высокой смертности. Диабет II типа – инсулиннезависимый (ИНЗСД) включает более легкие формы диабета. Диабетом этого типа чаще болеют тучные люди.

История открытия инсулина связана с именем русского врача И.М. Соболева (вторая половина 19 в.), доказавшего, что уровень сахара в крови человека регулируется специальным гормоном поджелудочной железы.

В 1922 г. инсулин, выделенный из поджелудочной железы животного, был впервые введен 10-летнему мальчику (Торонто), больному диабетом. Результат превзошел все ожидания, и уже через год американская фирма «Eli Lilly» выпустила первый препарат животного инсулина. Поджелудочная железа крупного рогатого скота (КРС) и свиней поставляется бойнями, где опытный персонал по разработанной методике извлекает железы из туш, их быстро замораживают (оптимальная температура – 70 °С) и в вагонах-рефрижераторах направляют на фармацевтические предприятия, где экстрагируют гормон. Масса поджелудочной железы КРС составляет в среднем 200–250 г, для получения 100 г кристаллического инсулина требуется 1000–1200 кг исходного сырья. Бычий (говяжий) гормон, в отличие от свиного, обладает несколько большей антигенностью для человека. После получения первой промышленной партии инсулина в последующие несколько лет пройден огромный путь его выделения и очистки, в результате гормон стал доступен для лечения больных сахарным диабетом I типа. Для адекватного контроля уровня глюкозы в крови инсулин нужно было вводить подкожно 4 раза в сутки.

В 1935 г. датский исследователь Хагедорн оптимизировал действие инсулина в организме, предложив пролонгированный препарат – протамин-цинк-инсулин (вводили один раз в сутки).

Первые кристаллы инсулина были получены в 1952 г.; развитие методов очистки гормона (иммуноэлектрофорез, ВЭЖХ) от других гормональных веществ (глюкагона – антагониста инсулина и соматостатина,

последний подавляет выделение инсулина и глюкагона) и продуктов деградации инсулина позволили получить гомогенный инсулин, называемый однокомпонентным.

В 1954 г. английский биохимик Г. Сенджер получил Нобелевскую премию за расшифровку структуры инсулина.

Синтез обеих цепей инсулина и соединение их дисульфидными связями был проведён в 1963–1965 гг. В начале 70-х гг. советскими учёными А. Юдаевым и С. Швачкиным был предложен химический синтез инсулина. Осуществить в промышленном масштабе столь дорогостоящий и сложный синтез полипептидного гормона, состоящего из десятков аминокислотных остатков, нерентабельно, в том числе и по причине малого выхода.

В 70-е гг. 20 в. шло прогрессирующее улучшение степени очистки инсулинов, что уменьшило проблемы, обусловленные инсулиновой аллергией, нарушениями работы почек, расстройством зрения и иммунной резистентностью к инсулину. Со времени открытия и до начала 80-х гг. использовали инсулин, получаемый из поджелудочной железы КРС и свиней. Инсулин КРС отличается тремя аминокислотами, свиной – одной аминокислотой от инсулина человека. Наиболее эффективный гормон для заместительной терапии при сахарном диабете – гомологичный инсулин, т.е. инсулин человека.

В 1980 г. датская фармацевтическая компания «Novo» разработала метод превращения инсулина свиньи в инсулин человека ферментативным замещением аланина, последний является 30-й аминокислотой в цепи В, на остаток треонина с последующей хроматографической очисткой продукта, в результате был получен однокомпонентный инсулин человека 99% чистоты.

Достижения молекулярной биологии позволили установить, что биосинтез инсулина в  $\beta$ -клетках островковой ткани происходит по следующим основным этапам:

- закодированная информация о структуре гормона содержится в инсулиновом гене (участок ДНК) 11-й хромосомы;
- в результате стимулирующего действия, прежде всего глюкозы и некоторых других веществ, эта информация списывается РНК-полимеразой с инсулинового гена в виде мРНК на рибосомах, в которых осуществляется соединение аминокислот с образованием белков. На рибосомах происходит сборка полипептидной цепи из 109 аминокислот с образованием препроинсу-

лина под влиянием рестриктаз, в результате образуются фрагменты от нескольких сотен до нескольких тысяч нуклеотидов; при синтезе препроинсулина в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы первые 23 аминокислоты «проводят» молекулу через мембрану клетки. Эти аминокислоты отщепляются рестриктазами и образуется пептид проинсулин, состоящий из 86 аминокислот. Молекула проинсулина сворачивается таким образом, что начальная и конечная её сегменты сближаются, а центральная часть молекулы удаляется под влиянием ферментов рестрикции; роль центральной части сводится к правильному взаимному расположению двух цепей инсулина.

В Великобритании с помощью *E. coli* синтезированы обе цепи человеческого инсулина, которые затем были соединены в молекулу биологически активного гормона. Чтобы одноклеточный организм мог синтезировать на своих рибосомах молекулы инсулина, необходимо снабдить его нужной программой, т.е. ввести ему ген гормона. Химическим способом (операцию проводят специалисты биохимики) получают ген, программирующий биосинтез предшественника инсулина или два гена, программирующие в отдельности биосинтез цепей А и В инсулина. Следующий этап – включение гена предшественника инсулина (или гены цепей инсулина порознь) в геном *E. coli* – особого штамма кишечной палочки, выращенного в лабораторных условиях; эту задачу выполняет генная инженерия. Из *E. coli* вычлениют плазмиду соответствующей рестриктазой. Синтетический ген встраивается в плазмиду (клонированием с функционально активной С-концевой частью  $\beta$ -галактозидазы *E. coli*). В результате *E. coli* приобретает способность синтезировать белковую цепь, состоящую из галактозидазы и инсулина. Синтезированные полипептиды отщепляют от фермента химическим путём, затем проводят их очистку. В бактериях синтезируется около 100000 молекул инсулина на бактериальную клетку.

Природа гормонального вещества, продуцируемого *E. coli*, обусловлена тем, какой ген встраивается в геном одноклеточного организма. Если клонирован ген предшественника инсулина, бактерия синтезирует предшественник инсулина, который подвергается затем обработке рестриктазами для отщепления препептида с вычленением С-пептида, вследствие чего получается биологически активный инсулин. Для получения очищенного инсулина человека выделенный из биомассы гибридный белок подвергают химико-ферментативной трансформации и

соответствующей хроматографической очистке (фронтальной, гелепроникающей, анионообменной).

В Институте биорганической химии РАН получен рекомбинантный инсулин с использованием генно-инженерных штаммов *E. coli*. Из выращенной биомассы выделяется предшественник, гибридный белок, экспрессируемый в количестве 40% от всего клеточного белка, содержащий препроинсулин. Превращение его в инсулин *in vitro* осуществляется в той же последовательности, что и *in vivo* – отщепляется лидирующий полипептид, препроинсулин превращается в инсулин через стадии окислительного сульфитолиза с последующим восстановительным замыканием трёх дисульфидных связей и ферментативным вычлениением связывающего С-пептида. После ряда хроматографических очисток, включающих ионообменные, гелевые и ВЭЖХ, получают человеческий инсулин высокой чистоты и природной активности.

Использование аффинной хроматографии значительно снизило содержание в препарате загрязняющих белков с более высокой м.м., чем у инсулина. К таким белкам относятся проинсулин и частично расщепленные проинсулины, которые способны индуцировать выработку антиинсулиновых антител. Стандартизация инсулина по загрязнению классифицирует препараты на обычные, содержащие проинсулина более 1%, монопиковые – менее 0,3% п, улучшенные монопиковые – менее 0,005% и монокомпонентные, содержащие менее 0,001% проинсулина.

Использование человеческого инсулина с самого начала терапии сводит к минимуму возникновение аллергических реакций. Наиболее частые осложнения инсулиновой терапии – гипогликемические состояния, основными признаками избытка инсулина являются нарушения функции ЦНС (спутанность сознания, странное поведение, кома).

Компания «Eli Lilly» в массовом производстве человеческого инсулина использует технологию рекомбинантных ДНК, помещая кДНК гена человеческого проинсулина в *E. coli* или *S. cerevisiae* и гидролизует наработанный проинсулин до молекулы инсулина. Человеческие инсулины этой фирмы носят название «Хумулин». В медицинской практике используют рекомбинантные человеческие инсулины из серии Хумулин («Eli Lilly») – регулярный, НПХ, ленте, ультраленте и их комбинированные составы. Человеческий инсулин быстрее абсорбируется и независимо от формы препарата имеет более короткую длительность действия, чем животные инсулины. Человеческие инсулины менее иммуногенны, чем свиные, особенно смешанные бычьи и свиные инсулины.

В молекуле инсулина обнаружены области, играющие повышенную роль в его физико-химических и биологических свойствах. При внесении мутационных изменений в аминокислотную последовательность этих областей, существенным образом изменяются свойства молекулы в целом. Удалось получить аналоги с модификацией В-цепи, что привело к значительному увеличению гормональной активности по сравнению с природным инсулином.

Контроль качества генноинженерного инсулина предполагает контроль дополнительных показателей, характеризующих стабильность рекомбинантного штамма и плазмиды, отсутствие постороннего генетического материала в препарате, идентичность экспрессируемого гена и др. (всего 22 показателя).

В настоящее время в медицинской практике используют инсулины трех типов:

- короткодействующие с быстрым началом эффекта;
- средней продолжительности действия;
- длительного действия с медленным проявлением эффекта.

*Инсулин короткого действия* – регулярный инсулин – представляет собой короткодействующий растворимый при нейтральном значении рН кристаллический цинк-инсулин, эффект которого развивается в течение 15 мин после подкожного введения и продолжается 5–7 ч.

С целью увеличения длительности действия все другие препараты инсулина модифицированы и при растворении в нейтральной среде образуют суспензию. Они содержат протамин в фосфатном буфере – *протамин-цинк-инсулин* и НПХ (нейтральный протамин Хагедорна) – НПХ-инсулин или различные концентрации цинка в ацетатном буфере – *инсулины ультраленте, ленте, семиленте*.

Препараты инсулина средней длительности действия содержат протамин, представляющий белок средней м.м. 4400, богатый аргинином и получаемый из молок радужной форели. Для образования комплекса требуется соотношение протамина и инсулина 1:10. После подкожного введения протеолитические ферменты разрушают протамин, позволяя инсулину всасываться.

НПХ-инсулин не изменяет фармакокинетический профиль смешиваемого с ним регулярного инсулина. НПХ-инсулин предпочтительнее инсулина ленте в качестве компонента средней длительности действия в терапевтических смесях, содержащих регулярный инсулин.

В фосфатном буфере все инсулины (свиной, бычий, человеческий) легко образуют кристаллы с цинком, но только кристаллы бычьего ин-

сулина обладают достаточной гидрофобностью, чтобы обеспечить замедленное и стабильное высвобождение инсулина, характерного для ультраленте. Цинковые кристаллы свиного инсулина растворяются быстрее, эффект наступает раньше, длительность действия короче. Поэтому не существует препарата ультраленте, содержащего только свиной инсулин. Монокомпонентный свиной инсулин выпускают под названием инсулин-суспензия, инсулан-нейтрал, инсулин-изофан, инсулин-аминохинурид.

Инсулин ленте – это смесь 30% инсулина семиленте (аморфный преципитат инсулина с ионами цинка в ацетатном буфере, эффект которого развевается относительно быстро) с 70% инсулина ультраленте (плохо растворимый кристаллический цинк-инсулин, имеющий замедленное начало и пролонгированное действие). Эти два компонента обеспечивают комбинацию с относительно быстрой абсорбцией и стабильным длительным действием, делая инсулин-ленте удобным терапевтическим средством.

При введении инсулина в виде аэрозоля на слизистую оболочку носа эффективный уровень препарата в плазме достигается быстро, однако, длительное интраназальное введение инсулина оказывает токсическое действие на слизистую оболочку.

### 6.5.2 Соматотропный гормон (СТГ) или гормон роста человека

СТГ – пептидный гормон, состоящий из 191 аминокислоты, секретируется передней долей гипофиза. Впервые гормон был выделен и очищен в 1963 г. из гипофиза, полученного из трупного материала. Дефицит этого гормона приводит к гипофизарной карликовости, частота встречаемости которой оценивается от 7 до 10 случаев на миллион человек (среди детей западных стран она составляет 1 на 5000 человек). Гормон видоспецифичен и является единственным средством лечения детей, страдающих от его недостатка; внутримышечное введение СТГ 10 мг/кг в течение года по три инъекции в неделю, увеличивает рост в течение первого года лечения более чем на 6 см. Для достижения более ощутимых результатов введение гормона необходимо продолжать от возраста 4–5 лет до половой зрелости и даже далее. Из одного трупа удаётся получить 4–6 мг соматотропина в пересчете на конечный фармацевтический препарат.

Общего количества фармацевтического препарата, выпускаемого компаниями крупных производителей СТГ, хватало для лечения лишь

одной трети случаев гипофизарной карликовости в развитых странах; недостаток соматотропина оказался ещё более острым с учетом других случаев его применения (незаживающие переломы, ожоги, язвы, нарушение гемопоэза).

К тому же возникли проблемы, связанные с гетерогенностью гормона, выделяемого из трупного материала. Несмотря на совершенствование выделения и очистки гормона, у 5% больных, получавших препарат, вырабатывались антитела, которые сводили на нет его биологическую активность. Кроме того, гипофизарный материал заражён нейротоксическим вирусом с необычайно длительным инкубационным периодом, поэтому дети, получавшие СТГ, нуждались в многолетнем медицинском наблюдении. Вирус, содержащийся в препаратах СТГ, нередко приводил к летальному исходу. С 1985 г. ВОЗ запрещено применение гормона, выделяемого из человеческих гипофизов.

Рекомбинантный соматотропин, получивший название *соматрем*, стал вторым (после человеческого инсулина) биосинтетическим фармацевтическим препаратом. СТГ, биологически чистый и свободный от вирусных загрязнений, впервые был получен в 1980 г. фирмой «Genentech». Гормон, синтезированный в генетически сконструированных клетках кишечной палочки, отличается от гормона, выделенного из гипофиза, дополнительным остатком метионина на NH<sub>2</sub>-конце молекулы (гормон обладает биологической активностью нативного гормона и даже большим эффектом, чем гормон роста из гипофиза, по-видимому, по причине большей чистоты). У детей, страдающих гипофизарной карликовостью, зарегистрирован прирост 8–18 см в год, что несколько больше эффекта гормона, полученного из гипофиза. На первом этапе клонировали двунитевую ДНК-копию мРНК и расщеплением рестрикционными эндонуклеазами получили последовательность, которая кодирует всю аминокислотную последовательность гормона, за исключением первых 23 аминокислот. Затем клонировали синтетический полипептид, соответствующий аминокислотам от 1-й до 23-й. Далее два фрагмента объединяли, затем «подстроили» к паре промоторов (промотор – специфическая последовательность в ДНК, необходимая для инициации транскрипции РНК-полимеразы) и участку связывания рибосом. Конечный выход гормона составил 2,4 мкг на 1 мл культуры *E. coli* (100000 молекул гормона на клетку). СТГ, синтезированный в бактериях, обладал нужной м.м. и не связан с каким-либо бактериальным белком, от которого его необходимо было бы отщеплять.

Изменяя аминокислотную последовательность СТГ, т.е. его первичную структуру, посредством модификации кодирующего его гена, в бактериальных клетках можно синтезировать аналоги гормона, очень важные для изучения активных участков молекулы (например, участки, которые стимулируют рост или оказывают действие на неоглюкогенез) и этиологии карликовости на молекулярном уровне.

Используя методы рекомбинантных ДНК, можно синтезировать и другие факторы роста и факторы дифференцировки тканей, выделив вначале их мРНК, затем получив соответствующие гены. Это относится к соматомедину А, стимулирующему фиксацию серы в хряще, образование которого индуцируется соматотропином.

В 1982 г. выделен и синтезирован полипептид, содержащий из 44 аминокислотных остатков, обладающий полной биологической активностью гипоталамического рилизинг-фактора соматотропина (СТГ-РФ). Введение СТГ-РФ способно компенсировать недостаток соматотропина. Применение СТГ-РФ возможно не только для лечения гипофизарной карликовости, но и при некоторых формах диабета и для ускорения регенерации тканей у людей, получивших сильные ожоги.

### 6.5.3. Эритропоэтин

Эритропоэтин (греч. *erithros* – красный + *poietikos* – создающий, производящий; син.: эритро-лоэстимулирующий фактор) – гормон гликопротеиновой природы, стимулирующий пролиферацию и дифференцировку эритропоэтин-чувствительных клеток в морфологически распознаваемые эритробласты. Это полипептид, состоящий из 165 аминокислот с м.м. 30400. Эритропоэтин стимулирует пролиферацию и дифференцировку клеток эритроидного ростка, действуя на специфические рецепторы эритропоэтина, которые имеются на предшественниках эритроцитов в костном мозге. Эндогенный эритропоэтин выделяется в почках в ответ на тканевую гипоксию. При анемии индукция эритропоэтина повышена, что стимулирует образование эритроцитов в костном мозге и приводит к коррекции анемии. Эритропоэтин показан больным с почечной недостаточностью и выраженной анемией. Он повышает уровень гемоглобина и обычно снимает необходимость переливания крови у этих пациентов; эритропоэтин полезен при СПИДе и раке.

Эритропоэтин выделен первым из всех гемопоэтических факторов (впервые получен из мочи больных тяжелой анемией). Получение значимых количеств эритропоэтина человека из природных источников

практически невозможно из-за низкого его содержания в сырье. С использованием генно-инженерной технологии в культуре клеток млекопитающих (штамм СНО) получают рекомбинантный человеческий эритропоэтин. Производство препарата основано на комбинации иммуноаффинной и ионно-обменной хроматографии и позволяет получать практически гомогенный, мономерный, полностью активный белок, не содержащий значимых примесей. Уже много лет получаемый по новой технологии эритропоэтин является ведущим продуктом предприятия Amgen, Калифорния (США). Годовой оборот от его производства составляет более 3 млрд долларов.

Эритропоэтин принадлежит к четырем генно-инженерным препаратам, производимым в России. В частности, НПО «Микроген» выпускает «Эритроestim», представляющий высокоочищенный (99,5 %) рекомбинантный эритропоэтин человека с сывороточным альбумином в виде раствора на изотоническом цитратном буфере.

## 6.6. Вакцины

Вирусы – облигатные (безусловные) внутриклеточные паразиты, чья репликация полностью зависит от процессов синтеза ДНК, РНК и белков в клетке хозяина. Репликация вирусов включает несколько этапов:

- адсорбция и проникновение в клетку;
- синтез ранних, неструктурных белков, например, полимераз, нуклеиновых кислот;
- синтез РНК или ДНК;
- синтез конечных структурных белков;
- сборка (созревание) вирусных частиц и их выход из клетки.

При многих вирусных инфекциях репликация вируса достигает максимума во время появления первых клинических признаков заболевания или даже ранее. Формированию у реципиента иммунитета к патогенным микроорганизмам способствует вакцинация. Антитела, вырабатываемые в ответ на введение вакцины в организм, запускают иммунный ответ – вырабатываются антитела, которые при последующей инфекции блокируют пролиферацию патогенного микроорганизма и не позволяют развиваться заболеванию.

Эффект вакцинации был открыт более 200 лет назад (1796 г.) врачом Эдвардом Дженнером, доказавшим, что человек, перенесший корью оспу, не очень тяжелую болезнь крупного рогатого скота, становится невосприимчив к оспе натуральной. Натуральная оспа – высоко-

контагиозное (заразное) заболевание, с высокой смертностью; даже, если больной не погибает, у него нередко возникают различные уродства, психические расстройства, слепота. Э. Дженнер публично провел прививку коровьей оспы 8-летнему мальчику Джеймсу Фиппсу, используя для этого экссудат из пустулы больной коровьей оспой, а затем, через определенное время, дважды инфицировал ребенка гноем из пустулы больного натуральной оспой. Все проявления заболевания ограничились покраснением в месте прививки, исчезнувшим через несколько дней.

Начиная с первой вакцины, созданной Э. Дженнером, большинство человеческих противовирусных вакцин созданы на основе убитых (инактивированных) патогенных микроорганизмов или живых, но не вирулентных (аттенуированных) штаммов. Этот подход достаточно эффективен и предотвращает распространение многих вирусных инфекций, однако его применение ограничено рядом причин:

- невозможностью культивирования всех патогенных микроорганизмов;
- потенциальной опасностью в работе с патогенными микроорганизмами и вирусами;
- возможностью ревертировать (возвращаться к исходному вирулентному штамму) аттенуированных штаммов (инактивация часто бывает неполной);
- высокой стоимостью производства традиционных вакцин (титр вирусов животных и человека в культуре и скорость их размножения, как правило, невысоки).

Технология рекомбинантных ДНК позволяет создавать новое поколение вакцин более безопасных и эффективных, менее дорогих, не имеющих ограничений в применении. При этом используют разные подходы:

1. Патогенный микроорганизм модифицируют, делетируя (убирая) гены, ответственные за вирулентность, при этом сохраняется способность штамма вызывать иммунный ответ. Получаются живые вакцины, содержащие непатогенные микроорганизмы, которые не могут ревертировать и становиться патогенными.
2. Гены или их сегменты, кодирующие основные антигенные детерминанты (белки) патогенных микроорганизмов, экспрессируют в альтернативном хозяине, например *E. coli*, получают нужный продукт в большом количестве и используют его как вакцину. Такие вакцины, содержащие лишь отдельные компоненты па-

тогенного микроорганизма, называют субъединичными вакцинами. *Достоинства* субъединичных вакцин состоят в том, что препарат, содержащий очищенный иммуногенный белок, стабилен и безопасен, его химические свойства известны, в нем отсутствуют дополнительные белки и нуклеиновые кислоты, которые могут быть причиной нежелательных побочных эффектов в организме хозяина. *Недостатки* субъединичных вакцин – очистка специфического белка высока по стоимости; его конформация после выделения может отличаться от той, которую он имеет *in situ* (т.е. в составе вирусного капсида или оболочки), что может повлечь изменение его антигенных свойств.

3. Клонированные гены, кодирующие основные антигенные детерминанты патогенного организма, встраивают в геном непатогенного носителя (обычно вируса) и получают живую безопасную, не содержащую болезнетворных микроорганизмов вакцину. Живые вакцины, как правило, более эффективны, чем неживые или субъединичные.

Одним из новых направлений создания рекомбинантных вакцин является разработка *ДНК-вакцин* (так называемых *генных, полинуклеотидных вакцин, вакцин из нуклеиновых кислот*). Принцип применения ДНК-вакцин заключается в том, что в организм пациента вводят молекулу ДНК, содержащую гены, кодирующие иммуногенные белки патогенного организма и генетические элементы, которые необходимы для экспрессии этого гена в клетках эукариотов (человека). В качестве продуцентов таких генов используют бактериальные клетки, содержащие рекомбинантные плазмиды с соответствующими генами. После получения достаточной биомассы (количества копий) плазмидную ДНК выделяют из бактерий, очищают от других молекул ДНК и примесей. Полученную ДНК-вакцину вводят парентерально, при этом большая ее часть поступает в межклеточное пространство, после чего включается в клетки.

**Противогерпетические вакцины.** Вирус простого герпеса (HSV. Herpes simplex virus) вызывает инфекционное заболевание генерализованного или местного характера (характеризуется преимущественно поражением кожи, слизистых оболочек, нервной системы и хроническим рецидивирующим течением, урогенитальными инфекциями, тяжелым поражением глаз, энцефалитом и т.д.). Кроме того, он является онкогенным, поэтому вакцинация убитым или аттенуированным вирусом

сопряжена с определенным риском развития рака. Для защиты от HSV-инфекции используют неонкогенную субъединенную вакцину.

Для создания любой субъединенной вакцины прежде всего идентифицируют те компоненты патогенного микроорганизма, которые индуцируют выработку антител. В случае HSV-типа таким компонентом является гликопротеин Д-оболочки (gD). В ответ на введение этого гликопротеина мышам у них вырабатывается антитела, нейтрализующие интактный HSV. Ген gD HSV-1 был изолирован, клонирован в одном из экспрессирующих векторов в клетках млекопитающих и введен в яйцеклетки китайского хомячка (CHO), в которых, в отличие от *E. coli*, происходит гликолизирование чужеродных белков. Полноразмерный ген gD кодирует белок, в норме связывающийся с мембраной клетки млекопитающего. Затем модифицированным геном трансформировали CHO-клетки, которые гликозилировали белковый продукт и секретировали его во внешнюю среду, так как он не мог встраиваться в клеточную мембрану. Антитела, вырабатываемые в ответ на введение модифицированного белка gD, эффективны в отношении вируса простого герпеса.

**Противосальмонеллезные вакцины.** Разные штаммы *Salmonella* вызывают острые кишечные инфекции, постнатальную (послеродовую) инфекцию, брюшной тиф, пищевую токсикоинфекцию. Для профилактики всех этих заболеваний у овец, КРС, цыплят и человека эффективные пероральные вакцины созданы методом *двойной делеции*.

Такой способ получения непатогенных штаммов, пригодных для создания на их основе живых вакцин, состоит в удалении из генома патогенных бактерий хромосомных областей, отвечающих за независимые жизненно важные функции. Лучше делетировать по крайней мере две такие области, так как вероятность их одновременного восстановления очень мала. Штамм с двойной делецией обладает ограниченной пролиферативной способностью и сниженной патогенностью, но обеспечивает выработку иммунного ответа. Штаммы *Salmonella* с двойной делецией вызывают легкую форму инфекции и обладают в 100 тыс. раз меньшей вирулентностью.

### 6.7. Цитокины

Цитокины – большая гетерогенная группа белков с различными функциями, синтезируемая лимфорециркулярными клетками. Цитокины участвуют во многих видах взаимодействий, обеспечивающих функ-

ционирование иммунной системы и контроль гемопоэза. Первая группа цитокинов была представлена **интерферонами (ИФН)**, часть цитокинов была классифицирована как интерлейкины (ИЛ), пронумерованные в порядке их обнаружения.

ИФН – это группа эндогенных гликопротеидов с м.м. около 3000, которые оказывают неспецифическое противовирусное действие, влияя на клеточные метаболические процессы синтеза РНК и белка. Первоначально было установлено, что ИФН вырабатывают клетки, инфицированные вирусами (тип I); в дальнейшем – что ИФН вырабатывают также лимфоциты в ходе иммунной реакции (тип II).

Для получения больших количеств ИФН используют шестидневные однослойные культуры клеток куриного эмбриона или культивируемые лейкоциты крови человека, зараженные определенным видом вируса. Иными словами, для получения ИФН создают определенную систему вирус-клетка.

Из клетки человека изолирован ген, ответственный за биосинтез ИФН. Экзогенный человеческий ИФН получают, используя технологию рекомбинантных ДНК. Процедура выделения кДНК ИФН-ов состоит в следующем:

- Из лейкоцитов человека выделяют мРНК, фракционируют ее по размерам, проводят обратную транскрипцию, встраивают в сайт модифицированной плазмиды.
- Полученным продуктом трансформируют *E. coli*; образовавшиеся клоны подразделяют на группы, которые идентифицируют.
- Каждую группу клонов гибридизируют с ИФН – мРНК.
- Из образовавшихся гибридов, содержащих кДНК и кРНК, выделяют мРНК, проводят ее трансляцию в системе синтеза белка.
- Определяют интерферонную противовирусную активность каждой смеси, полученной в результате трансляции. Группы, проявившие интерферонную активность, содержат клон с кДНК, гибридизировавшийся с ИФН – мРНК; повторно идентифицируют клон, содержащий полноразмерную ИФН – кДНК человека.

ИФН проявляют некоторые виды активности как лимфокины и иммуномодуляторы. ИФН I типа, действующие преимущественно как ингибиторы репликации вирусов в клетке, реализуют свой эффект, стимулируя выработку рибосомами клеток хозяина клеточных ферментов, которые тормозят продукцию вирусов, нарушая трансляцию вирусной мРНК и синтез вирусных белков.

ИФН вырабатывают большинство видов животных, но проявление их активности видоспецифично, т.е. они действуют только у того вида животных, в которых вырабатываются.

Описаны три основных человеческих ИФН:

- ИФН- $\alpha$ , представляющий собой фибробластный ИФН типа I;
- ИФН- $\beta$  – человеческий фибробластный ИФН типа I;
- ИФН- $\gamma$  – человеческий иммунный ИФН типа II.

ИФН, вырабатываемые клетками любого типа, различают по химическому строению и виду активности (табл. 2). ИФН являются одним из основных эндогенных факторов, препятствующих поражению организма вирусной инфекцией.

ИФН вызывают индукцию трех ферментов:

- протеинкиназы, нарушающей начальный этап построения пептидной цепи;
- олигоизоденилат синтазы, активирующей РНК-азу, которая разрушает вирусную РНК;
- фосфодиэстеразы, разрушающей конечные нуклеотиды тРНК, что приводит к нарушению элонгации пептида.

С учетом противовирусного и иммуномоделирующего эффектов ИФН в НПО «Биомед» предложены и успешно апробированы суппозитории с ИФН $\alpha_1$  и пробиотиками при терапии дисбактериозов вирусной и бактериальной этиологии, кандидозов; в гинекологической практике для лечения эндометритов, кольпитов, вагинитов и гинекологического герпеса.

Побочные эффекты ИФН включают лихорадку, утомляемость, головные боли, слабость, миалгии, анемии, желудочно-кишечные и сердечно-сосудистые нарушения.

Развитие методов клонирования генов в значительной мере облегчило продукцию высокоочищенных цитокинов всех типов и идентификацию большинства *интерлейкинов (ИЛ)*.

Специфический ген человеческого ИЛ с присоединенным к нему сегментом ДНК, кодирующим маркерный пептид (участок гибридной белковой молекулы, облегчающий идентификацию и очистку белка), переносят в микробные клетки-продуценты, где экспрессируется *химерный белок* (продукт клонированного гена, защищенный одной или несколькими аминокислотами от расщепления протеиназами клетки-хозяина). Конструирование рекомбинантных молекул ИЛ осуществляется набором специфических ферментов. Маркерный пептид, входящий в состав химерного белка, очищают иммуноаффинной хроматографией.

Таблица 2

Терапевтическое применение ИФН человека

Название препарата	Подтип ИФН	Способ получения	Фармакологическое действие	Показания к применению
1	2	3	4	5
Интерферон	$\alpha$	Биосинтез в культуре лейкоцитов донорской крови под воздействием вирусом	Антивирусное, иммуномодулирующее, антипролиферативное	Вирусные заболевания, лейкоз, злокачественная меланнома, рак почек, карциноидный синдром
Интерлок	$\alpha$	Биосинтез в культуре лейкоцитов донорской крови под воздействием парамиксовирусом	Подавляет жизнедеятельность ряда вирусов	Вирусные заболевания глаз, гепатиты
Интерферон альфа-2	$\alpha_2$	Рекомбинантный	Антивирусное, иммуномодулирующее, ингибирует пролиферацию большого спектра опухолевых клеток	Эпителиальная форма острой и рецидивирующей вирусной инфекции глаз; онкологические заболевания
Интерферон альфа-2a	$\alpha_{2a}$	Рекомбинантный. Белок, содержащий 165 аминокислот	Противовирусная, противоопухолевая активность	Лейкемический ретикулэндотелиоз, саркома Капоши, рак почки, мочевого пузыря, меланнома, опоясывающий лишай



1	2	3	4	5
Реаферон	$\alpha_2$	Рекомбинантный ИФН, продуцируемый бактериальным штаммом псевдомонады, в генетический аппарат которой встроены ген человеческого лейкоцитного ИФН $\alpha_2$ . Идентичен человеческому лейкоцитарному ИФН $\alpha_2$	Противовирусная, иммуномодулирующая, противоопухолевая активность	Вирусные, опухолевые заболевания
Интерферон альфа-п1	$\alpha_{п1}$	Высокоочищенный человеческий ИФН	Противовирусная	Хронический активный инфекционный гепатит В
Интерферон бета	$\beta$	Суперпродукция фибробластов человека стимулятором в присутствии ингибиторов обменных процессов	Противовирусная, иммуномодулирующая, противоопухолевая активность	Хронические вирусные инфекции в офтальмологии, гинекологии и урологии, дерматологии, гепатологии, онкологии
Интерферон гамма	$\gamma$	Рекомбинантный	Противовирусная, иммуномодулирующая, противоопухолевая активность	Хронические гранулематозные заболевания

Главным из цитокинов являются ИФН $\gamma$  и ИЛ-2. ИФН $\gamma$  – ключевой медиатор активации системы естественной цитотоксичности, регулирует процесс дифференцировки естественных киллерных клеток и их цитотоксическое взаимодействие с клетками-мишенями, стимулирует цитотоксические и регуляторные функции макрофагов, активирует цитотоксические лимфоциты. Под действием ИФН $\gamma$  повышается продукция цитокинов, таких, как ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-12, ИФН $\beta$ , и фактора некроза опухолей- $\alpha$ . ИЛ реализуют эффект через рецепторы на поверхности соответствующих клеток-мишеней.

Многие ИЛ проходят стадию клинического изучения, другие – нашли разнообразное применение в лечении инфекций, воспалительных, аутоиммунных и неопластических расстройств. Так, ИЛ-1 показан для лечения воспалений и септического шока, ИЛ-2 включен в схемы лечения иммуногенных опухолей (меланомы, почечноклеточного рака, рака мочевого пузыря).

## Тест-контроль к главе 6

**Выберите правильные ответы:**

1. Антигенсвязывающая активность антитела определяется:
  - А – Fab-фрагментом (Fv-фрагментом);
  - Б – вариабельными концами Н- и L-цепей;
  - В – константной областью или доменом;
  - Г – всей молекулой нативного антитела;
  - Д – количеством дисульфидных мостиков между L- и H-цепями.
  
2. Присоединение молекулы ЛВ к моноклональным антителам или их Fv-фрагментам используют для:
  - А – повышения стабильности ЛВ;
  - Б – целенаправленной доставки ЛВ к месту его действия;
  - В – расширения фармакологического спектра действия ЛВ;
  - Г – снижения стоимости лекарственного препарата;
  - Д – получения пролекарства.
  
3. Механизм получения пролекарства на основе моноклональных антител заключается в:
  - А – использовании лекарства в неактивной форме;
  - Б – использовании лекарства в активной форме;
  - В – связывании лекарства с ферментом;
  - Г – заключении антитела в липосомы;
  - Д – связывании фермента с моноклональным антителом.
  
4. Активация лекарственного средства у клетки-мишени происходит за счет:
  - А – введения активаторов связывания;
  - Б – локального повышения температуры вблизи клетки-мишени;
  - В – связывания фермента с моноклональным антителом;
  - Г – антигенной специфичности моноклонального антитела;
  - Д – связывания лекарственного вещества с ферментом.
  
5. Источником препарата урокиназы является:
  - А – изолированные каллусные культуры;
  - Б – культуры клеток эмбриона почки человека;
  - В – донорская кровь;

- Г – клонированная *E. coli*;
- Д – связывания лекарственного вещества с ферментом.

## 5. Стрептокиназа:

- А – производится из донорской крови;
- Б – производится из  $\beta$ -гемолитического стрептококка группы С;
- В – является прямым тромболитиком;
- Г – является непрямым тромболитиком;
- Д – проникает внутрь тромба;
- Е – не проникает внутрь тромба.

## 6. Отличия фармакотерапевтических свойств урокиназы от стрептокиназы заключаются в том, что:

- А – более медленно наступает фибринолитический эффект;
- Б – более быстро наступает фибринолитический эффект;
- В – не обладает выраженными антигенными свойствами;
- Г – обладает выраженными антигенными свойствами;
- Д – активирует эндо- и экзотромболиз.

## 7. Репкомбинантный гибрид белка С – это:

- А – антикоагулянт;
- Б – витамин-К-зависимый ингибитор свертывающей системы;
- В – провитамин аскорбиновой кислоты;
- Г – фибринолитик;
- Д – белок крови человека.

## 8. Промышленным источником получения аминокислот являются:

- А – низкомолекулярные азотистые соединения;
- Б – продукты метаболизма неспорообразующих грамположительных почвенных бактерий;
- В – гидролизат белка;
- Г – торф;
- Д – белок крови человека.

## 9. Промышленный синтез аскорбиновой кислоты осуществляется:

- А – химическим синтезом;
- Б – продуктами метаболизма неспорообразующих грамположительных почвенных бактерий;
- В – гидролизатом белка;

Г – торфом;  
Д – белком крови человека.

10. Биотехнологический процесс получения аскорбиновой кислоты включает:

А – культивирование трансформированных клеток *Erwinia herbicola*;  
Б – микробиологическое расщепление целлюлозы;  
В – совместное культивирование микроорганизмов *Corynebacterium* и *Erwinia herbicola*;  
Г – последовательное культивирование микроорганизмов *Corynebacterium* и *Erwinia herbicola*;  
Д – культивирование штамма *Streptococcus equisimilis*.

11. Производство инсулина, идентичного человеческому, осуществляется:

А – высокоэффективной очисткой инсулина животного происхождения;  
Б – превращением свиного инсулина замещением аланина на треонин;  
В – химическим синтезом;  
Г – генно-инженерным методом;  
Д – любым из перечисленных методов.

12. Процесс получения генно-инженерного инсулина включает:

А – выращивание биомассы рекомбинантного штамма *E. coli*;  
Б – выделение препроинсулина из культуральной массы;  
В – отщепление лидирующего полипептида;  
Г – восстановительное замыканием трёх дисульфидных связей и ферментативное вычленение связывающего С-пептида;  
Д – хроматографическую очистку инсулина.

13. Гетерогенность человеческих генно-инженерных препаратов инсулина связана с:

А – недостаточной степенью очистки;  
Б – различием аминокислотного состава полипептида;  
В – нестабильностью штамма-продуцента;  
Г – наличием постороннего генетического материала в препарате;  
Д – неидентичностью экспрессируемого гена.

14. Отличия препарата генно-инженерного соматотропина от гормона, выделяемого из гипофиза, заключаются в:

А – разной степени чистоты;  
Б – разным аминокислотном составе;  
В – отсутствии нейротоксичных вирусов;  
Г – более выраженной токсичности;  
Д – более на единицу массы сырья высоком выходе.

15. Промышленным источником препаратов эритропоэтина являются:

А – моча больных анемией;  
Б – донорская кровь животных, больных анемией;  
В – культура клеток млекопитающих;  
Г – культура растительных клеток;  
Д – почки животных.

16. Применение человеческих противовирусных вакцин ограничено:

А – невозможностью культивирования всех патогенных микроорганизмов;  
Б – потенциальной опасностью в работе с патогенными микроорганизмами и вирусами;  
В – возможностью ревертировать (возвращаться к исходному вирулентному штамму) аттенуированных штаммов;  
Г – высокой стоимостью производства традиционных вакцин;  
Д – отсутствием реактивности иммунной системы на некоторые вирусы.

17. Субъединичные вакцины – это:

А – вакцины против одного возбудителя;  
Б – антигенные детерминанты (белки);  
В – генетически модифицированный патогенный микроорганизм;  
Г – непатогенные микроорганизмы с клонированным геном, кодирующим антигенные детерминанты патогенного организма;  
Д – ДНК-вакцины.

18. Недостатки субъединичных вакцин:

А – низкая эффективность;  
Б – высокая стоимость;

В – риск изменения конформации белка (антигенных свойств);  
 Г – способность проявлять вирулентность;  
 Д – более выраженные побочные реакции в сравнении с классическими вакцинами.

19. Пероральные вакцины, созданные методом двойной делеции, это:

А – мертвые вакцины, прошедшие двойную стерилизацию;  
 Б – живые вакцины на основе патогенных бактерий с удаленными из генома областями, отвечающими за независимые жизненно важные функции;  
 В – живые вакцины на основе патогенных бактерий с удаленными из генома областями, отвечающими за вирулентность;  
 Г – вакцины с ограниченной пролиферативной способностью и сниженной патогенностью;  
 Д – вакцины против двух возбудителей (видов инфекций).

20. Большие количества ИФН получают из:

А – шестидневных однослойных культур клеток куриного эмбриона;  
 Б – культивируемых лейкоцитов крови человека, зараженных определенным видом вируса;  
 В – культивируемых лимфоцитов крови человека, зараженных определенным видом вируса;  
 Г – культивируемых фибробластов крови человека, зараженных определенным видом вируса;  
 Д – генно-инженерным путем.

## Глава 7. АНТИБИОТИКИ

Антибиотики – специфические продукты жизнедеятельности различных групп микроорганизмов, низших и высших растений и животных или их модификаций, обладающие высокой физиологической активностью в отношении определённых групп микроорганизмов или злокачественных опухолей, избирательно задерживающие их рост или подавляющие развитие.

Образование антибиотиков – наследственно закреплённая особенность метаболизма организмов. Это проявляется в том, что каждый вид (или даже штамм) способен образовывать один или несколько определённых, строго специфичных для него антибиотических веществ. Вместе с тем одинаковые антибиотики могут образовываться несколькими видами организмов (это свидетельство того, что данные микроорганизмы имеют общего предка). Образование антибиотика обусловлено определённым характером обмена веществ, возникающим и закреплённым в процессе эволюции организма. Эволюционное значение антибиотиков подчёркивается тем, что в антибиотикообразование может быть включено около 1% генов продуцента (род *Streptomyces*) и эта часть ДНК, несмотря на энергетические затраты при её репликации, не теряется во время селекции в естественных условиях.

Образование антибиотиков – фактор биологический, имеющий адаптационное значение. Для продуцента способность образовывать антибиотики важна не постоянно, а лишь в неблагоприятных условиях, например, при истощении среды питательными компонентами, при контакте со специфическими продуктами жизнедеятельности другого организма.

Формы взаимодействия между организмами весьма разнообразны – от мирного сожительства до явного антагонизма. Типы связей внутри микробиологических сообществ подразделяют на трофические и метаболические. *Трофические связи* характерны для метабиоза (последовательное использование субстрата), когда продукты жизнедеятельности одного микроорганизма, содержащие значительное количество энергии, потребляют другие виды микроорганизмов в качестве питательного ма-

териала. *Метаболические связи* выстраиваются, когда одни микроорганизмы могут потреблять отдельные продукты метаболизма других микроорганизмов или продукты метаболизма являются их ингибиторами.

Тип связи определяет специфику взаимодействия организмов. *Симбиотические взаимоотношения* характеризуются тем, что различные виды микроорганизмов создают для себя взаимовыгодные условия. Например, совместное развитие аэробных и анаэробных микроорганизмов: развиваясь в аэробных условиях, микробы поглощают кислород, создавая благоприятные условия для развития анаэробов. *Паразитизм* – форма взаимоотношений, при которой некоторые микробы развиваются за счет веществ клетки других организмов, например бактерии. Паразиты бывают внеклеточные (риккетсии) и внутриклеточные (вирусы). *Хищничество* имеет место, когда некоторые микробы поглощают клетки организмов других видов, используя их в качестве источника питания (преимущественно продукты лизиса живых клеток других бактерий). К числу микроорганизмов-хищников относятся, главным образом, миксоформы (миксобактерии, миксоамебы, миксомицеты). *Антагонизм* – это условия, при которых один вид микроорганизмов угнетает или полностью подавляет рост и развитие других видов. Явление антагонизма широко распространено среди бактерий, актиномицетов, грибов и других микроорганизмов. Образование антибиотических веществ – специфическая особенность вида или даже штамма микроорганизмов, возникшая в результате их эволюционного развития как одна из приспособительных особенностей.

В естественных условиях четко ограниченных форм взаимоотношений не наблюдается. В процессе эволюции на разных этапах роста организмов и в зависимости от условий их развития один тип взаимодействия может смениться другим. Так, ряд бактерий (*E. coli*, *B. subtilis*, *V. cereus* и др.) образуют фермент пенициллиназу, разрушающий пенициллин, выделяемый *Penicillium notatum*, *P. chrisogenum* и мицелиальными грибами других видов.

Антибиотики – первые лекарственные средства, полученные биотехнологическим способом. С антибиотиками человечество сталкивается с древних времён. Уже в Библии упоминается использование травы иссоп для лечения кожных заболеваний. Эта трава, как известно, поражается плесенью рода *Penicillium* или *Aspergillus* и может быть насыщена метаболитами грибов антибиотического характера.

### Основные этапы развития производства антибиотиков

1870 г. – обнаружено, что в среде, содержащей плесень, бактерии не развиваются (Д. Сандерсон);

1872 г. – доказана способность *Penicillium glaucum* подавлять рост бактерий (Д. Листер);

1871–1872 гг. – показано, что молодая культура зеленой плесени – грибы рода *Penicillium* – способна задерживать развитие возбудителей ряда кожных заболеваний человека (В.А. Манассеин, А.Г. Полотебнов);

1877 г. – опубликовано сообщение о подавлении роста *Bacillus anthracis* аэробными бактериями (Л. Пастер и С. Джебарт, А.Г. Лебединский);

1929 г. – обнаружены антибиотические свойства грибов *Penicillium* (А. Флеминг);

1940 г. – выделена субстанция пенициллина (Х. Флори, Е. Чейн);

1942–1956 гг. – коллектив ученых и практиков во главе с академиками Л.А. Зильбером и З.В. Ермольевой провели поиск и отбор штаммов-продуцентов; разработали ферментационные среды и первые регламенты промышленного производства бензилпенициллина. Сравнение двух штаммов (советского и английского) показало, что советский штамм образует 28 ед/мл, английский – 20 ед/мл.

Открытие и изучение свойств нового антибиотика, применяемого в медицинской или сельскохозяйственной практике, – это огромный труд ученых различных направлений (микробиологов, биохимиков, микологов, химиков, генетиков, фармакологов, биотехнологов, врачей). Со времени открытия пенициллина из разных микроорганизмов были выделены более 6000 антибиотиков, обладающих разной специфичностью и разным механизмом действия. Их широкое применение для лечения инфекционных заболеваний помогло сохранить миллионы жизней.

#### Основные причины быстрого роста числа антибиотиков:

- многие антибиотические вещества или продукты их модификации являются незаменимыми ЛП при инфекционных заболеваниях, ранее считавшихся неизлечимыми;
- изменилась этиологическая структура инфекционных заболеваний, возросло число видов бактерий, их индуцирующих; широкое распространение получили инфекции, вызываемые грамотрицательными инфекциями, оттеснив стафилококковые заболевания;

- как лечебные средства антибиотики применяют в животноводстве, птицеводстве, пчеловодстве, растениеводстве; отдельные антибиотики являются стимуляторами роста животных;
- проблема резистентности микроорганизмов предполагает замену одних антибиотиков другими, более эффективными;
- некоторые антибиотики применяют в качестве консервантов в пищевой промышленности;
- развитие химии природных соединений (изучение структуры, их модификация и синтез) способствует появлению новых знаний об антибиотиках;
- антибиотики используют при изучении отдельных сторон метаболизма организмов, расшифровке тонких молекулярных механизмов биосинтеза белка, механизма функционирования мембран, специфических ингибиторов ферментов, в первую очередь, инактивирующие антибиотики.

Подавляющее большинство основных антибиотиков было выделено из граммотрицательной почвенной бактерии *Streptomyces*, хотя их продуцируют также грибы и другие грамположительные и граммотрицательные бактерии. Ежегодно во всем мире производится 100000 т антибиотиков на сумму около 5 млрд долларов, в том числе более 10 млн долларов приходится на долю антибиотиков, добавляемых в корм скоту в качестве пищевых добавок или ускорителей роста.

По оценкам ВОЗ каждый год ученые обнаруживают от 100 до 200 новых антибиотиков, прежде всего в рамках обширных исследовательских программ по поиску среди тысяч различных микроорганизмов таких, которые синтезировали бы уникальные антибиотики. Получение, лабораторные и клинические испытания новых лекарственных средств обходятся дорого, до применения доходят только те из них, которые имеют большую терапевтическую ценность и представляют экономический интерес; на их долю приходится 1–2% всех обнаруживаемых антибиотиков.

Образование антибиотиков – наследственно закреплённая особенность метаболизма микроорганизмов, проявляющаяся в том, что каждый вид (или даже штамм) способен продуцировать один или несколько определенных, строго специфичных для него антибиотических веществ, что обусловлено определённым характером обмена, возникающим и закреплённым в процессе эволюции микроорганизма. Метаболиты являются промежуточными продуктами обмена веществ, результатом ка-

таболических и анаболических реакций; конечный продукт обмена – антибиотики – синтезируются из первичных метаболитов.

*Специфичность антибиотиков характеризуется:*

- высокой биологической активностью в отношении чувствительных к ним организмов, т.е. способностью проявлять эффект даже в очень низких концентрациях;
- избирательностью действия, т.е. способностью конкретного антибиотика проявлять свое действие лишь в отношении определенных организмов или групп организмов, не оказывая заметного эффекта на другие формы живых существ.

Величину биологической активности антибиотиков выражают в условных единицах, содержащихся в 1 мл (ед/мл) или в 1 мг (ед/мг) препарата. За единицу антибиотической активности принято минимальное количество антибиотика, способное подавить развитие или задержать рост определенного числа клеток стандартного штамма тест-микроба в единице объема питательной среды. Так, за единицу активности пенициллина принято минимальное количество препарата, способное задерживать рост золотистого стафилококка (штамм 209) в 50 мл питательного бульона; для стрептомицина единица активности – минимальное количество антибиотика, задерживающее рост *E. coli* в 1 мл питательного бульона.

Угнетение роста микроорганизмов антибиотиками может осуществляться только при наличии трех условий:

- биологически важная для жизнедеятельности бактерий система должна реагировать на воздействие низких концентрацией препарата через определенную точку приложения;
- препараты должны обладать способностью проникать в бактериальную клетку и воздействовать на точку приложения;
- препарат не должен инактивироваться раньше, чем вступит во взаимодействие с биологически активной системой бактерии.

Точки приложения действия антибактериальных препаратов в бактериях различны – большая часть их находится в клеточной мембране и внутри клетки. Для достижения этих точек антибиотики сначала должны проникнуть через поверхностные слои клетки, находящиеся снаружи от цитоплазматической мембраны. Главным барьером на этом пути препарата является клеточная стенка. В клеточной стенке грамположительных бактерий содержится большое количество *мукопептидов*, являющихся основной мишенью для антибиотиков. Клеточная стенка грамотрицательных бактерий содержит большое количество липидов, в

силу чего она менее проницаема и является надежным барьером для многих антибактериальных средств. Это обстоятельство служит причиной поиска новых антибиотиков (полусинтетические пенициллины и цефалоспорины), которые обладают хорошей проникающей способностью через *липополисахаридный слой* грамотрицательных бактерий и имеют высокую активность против большинства из них.

### 7.1. Классификация антибиотиков

Сложилось несколько подходов к классификации антибиотиков:

- по принципу биологического происхождения (предпочтительна для биологов, изучающих организмы-продуценты антибиотических веществ);
- по химическому строению (удобна для химиков, занимающихся изучением строения молекул антибиотиков и путей из синтеза);
- по типу и механизму биологического действия (принята в медицинской практике).

Тип действия антибиотиков бывает *цидным* (бактерицидным, фунгицидным, вируцидным, протозооцидным), под ним понимают необратимое нарушение жизнедеятельности (гибель) инфекционного агента, и *статическим* (бактериостатическим, фунгистатическим, вирустатическим, протозоостатическим), при котором прекращается или приостанавливается размножение возбудителя. Такая градация имеет основное практическое значение при лечении тяжелых инфекций, особенно у пациентов с нарушениями иммунитета, когда обязательно назначение «цидных» препаратов.

Связь антимикробного препарата с точками приложения в микробной клетке может быть прочной или непрочной, что, в той или иной мере, определяет степень активности данного препарата. Антибиотики должны обладать высокой избирательной токсичностью, т.е. они должны быть активны по отношению к микробным клеткам и безвредны для клеток большого организма. Подобная избирательная токсичность может быть реализована лишь в том случае, если активные биохимические системы микробных клеток – мишени антибиотиков – отличны от подобных систем клеток макроорганизма. Селективная токсичность может носить пограничный характер, когда отличия в биохимических структурах клеток организма человека и бактерии заключаются в различном положении фосфолипидов в цитоплазматической мембране. Проблема селективности антибиотиков сложнее по причине того, что для репликации вирусы используют ферменты клеток хозяина.

В зависимости от точки приложения и механизма биологического действия антибиотики делят на:

- I. Специфические ингибиторы биосинтеза клеточной стенки (пенициллины, цефалоспорины и цефамицины, ванкомицин, ристомин, циклосерин, бацитрацин, тиенамицины и др.)
- II. Препараты, нарушающие молекулярную организацию и функции клеточных мембран (полимиксины, полиены).
- III. Препараты, подавляющие синтез белка на уровне рибосом (макролиды, линкомицины, аминогликозиды, тетрациклины, левомицетин, фузидин).
- IV. Ингибиторы синтеза РНК на уровне РНК-полимеразы и ингибиторы, действующие на метаболизм фолиевой кислоты (рифампицины).
- V. Ингибиторы синтеза РНК на уровне ДНК-матрицы (актиномицины, антибиотики группы ауреоловой кислоты).
- VI. Ингибиторы синтеза ДНК на уровне ДНК-матрицы (митомидин С, антрациклины, нитрофураны, налидиксовая кислота).

При выделенном возбудителе назначают антибиотики с максимальным узким спектром активности, так как «избыточная» широта спектра не дает преимуществ и опасна с точки зрения подавления нормальной микрофлоры.

*Общая стратегия рекомбинантных микроорганизмов, способных синтезировать антибиотики*, состоит во введении в организм хозяина специфических генов, клонированных в подходящем векторе, которые кодируют один или несколько ферментов, катализирующих не свойственные микроорганизму метаболические реакции, или генов, влияющих на осуществляемый им в норме биосинтез определенных соединений.

При создании рекомбинантных штаммов *Streptomyces* – основного микроорганизма, используемого для получения антибиотиков, важно, чтобы трансформация и отбор трансформированных клеток не должны быть слишком сложны. В отличие от *E. coli*, *Streptomyces* существуют не в виде изолированных клеток, а в виде протяженных мицелл, поэтому перед трансформацией необходимо ферментативное разрушение клеточной стенки мицелл и высвобождение отдельных протопластов. Без этого невозможно отличить трансформированные клетки от не трансформированных, поскольку видимые колонии на твердой среде будут образовываться из группы клеток, а не из индивидуальной клетки. Соответственно колонии, растущие в присутствии селективного антибиотика, будут представлять собой смесь трансформированных и не-

трансформированных клеток. Проникновение плазмидной ДНК в протопласты *Streptomyces* облегчается в присутствии ПЭГ. После трансформации протопласты высевают на твердую среду, чтобы образовалась клеточная стенка, а затем для отбора трансформированных клеток переносят на селективную среду, обычно содержащую неомицин, где образуется колония, выросшая из трансформированных клеток, способных синтезировать антибиотик.

С помощью генетических или биохимических экспериментов можно идентифицировать, затем выделить один или несколько ключевых ферментов биосинтеза антибиотиков, определить их N-концевые аминокислотные последовательности и, исходя из этих данных, синтезировать олигонуклеотидные комплементарные последовательности.

## 7.2. Производство антибиотиков

Технологический процесс производства антибиотиков представлен на рис. 20.

Биосинтез антибиотика осуществляется микроорганизмами на определенном этапе их развития. Эта закономерность характерна для бактерий, мицелиальных грибов (*Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus fumigatus* и др.) и для большинства актиномицетов, образующих такие антибиотики, как стрептомицин, хлортетрациклин, окситетрациклин и другие. Максимально высокую активность штамма-продуцента способна обеспечить технология рекомбинантных ДНК, так как можно создавать новые антибиотики с уникальной структурой, оказывающие более мощное воздействие на определенные микроорганизмы и обладающие минимальными побочными эффектами. Генно-инженерные подходы используются для увеличения выхода антибиотиков и соответственно снижения стоимости их производства.

Примеры промышленных продуцентов основных антибиотиков, используемые в РФ, представлены в табл. 3.

При проведении первой стадии технологического процесса (рис. 20) применяют натуральные среды неопределенного состава, к числу которых относят продукты крахмалопаточного производства, агар, желатин, отруби, зерно. Композиция натуральных сред неопределенного состава не является постоянной. Например, агар, получаемый из разных видов морских водорослей, по химическому составу – сложный эфирный комплекс полисахарида с серной кислотой и разнообразными микроэлементами. Агар содержит также жирные кислоты, биотин, тиамин или его

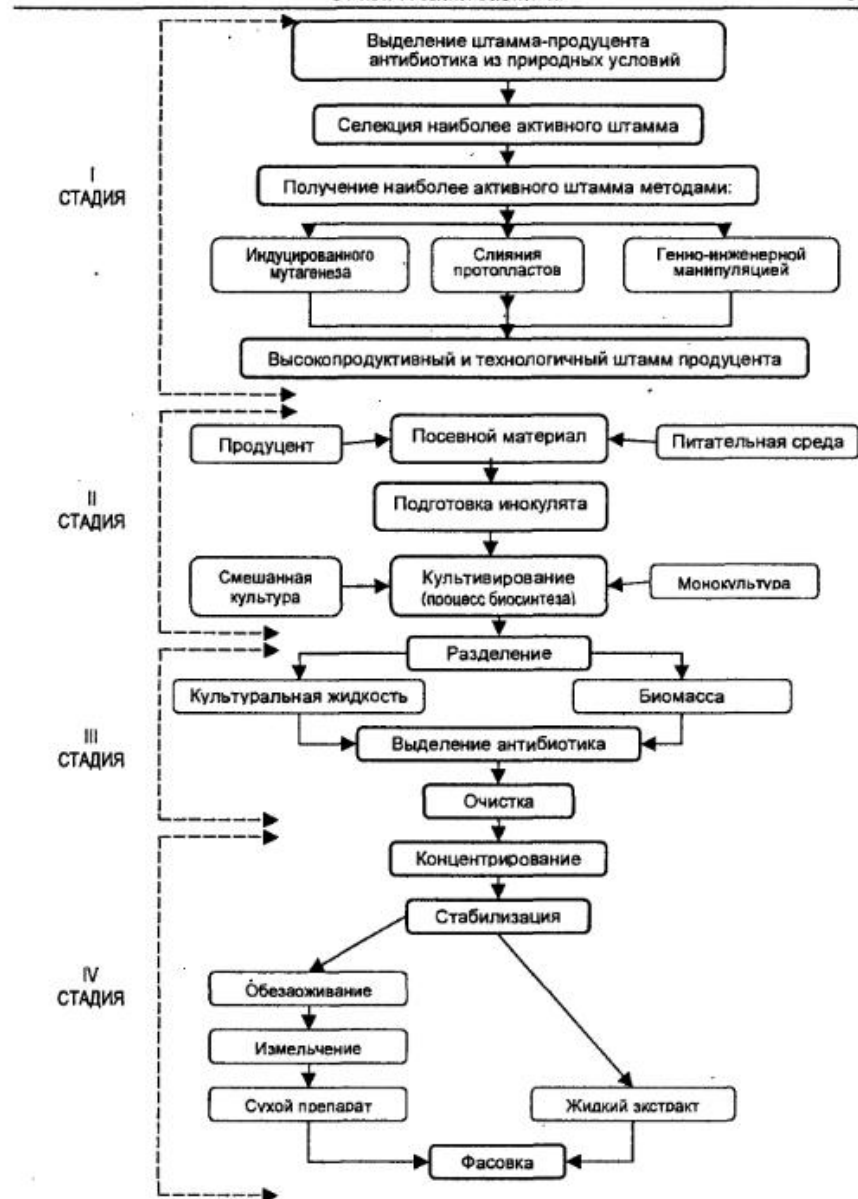


Рис. 20. Схема производства антибиотиков в процессе микробного биосинтеза (по Н.Е. Егорову)



Таблица 3

## Промышленные продуценты антибиотиков

Антибиотик	Продуцент
Антибиотики, образуемые бактериями	
1. Грамицидин С	<i>Bacillus brevis</i>
2. Полимиксины	<i>Bacillus polymyxa</i>
3. Бацитрацины	<i>Bacillus licheniformis</i> и <i>B. erevis</i>
4. Низин	<i>Streptococcus lactis</i>
Антибиотики, образуемые актиномицетами	
1. Стрептомицин	<i>Streptomyces griseus</i>
2. Неомидин	<i>Streptomyces fradiae</i>
3. Канамицин	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>
4. Гентамицин	<i>Micromonospora purpurea</i>
5. Сизомицин	<i>Micromonospora inyoensis</i>
6. Тобрамицин	<i>Streptomyces tenebraris</i>
7. Хлортетрациклин	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
8. Окситетрациклин	<i>Streptomyces rimosus</i>
9. Амфотерецин В	<i>Streptomyces noolusus</i>
10. Тетрациклин	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
11. Хлорамфеникол	<i>Streptomyces venezuelae</i>
12. Эритромицин	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
13. Спирамицин	<i>Streptomyces ambofaciens</i>
14. Гилозин	<i>Streptomyces fradiae</i>
15. Нистатин	<i>Streptomyces noursei</i>
16. Леворин	<i>Streptomyces levoris</i>
Антибиотики, образуемые грибами	
1. Пенициллины	<i>Penicillium chrysogenum</i>
2. Цефалоспорин	<i>Cephalosporium acremonium</i>
3. Циклоспорин	<i>Trichoderma polysporum</i>
4. Гризеофульвин	<i>Penicillium griseofulvum</i>
5. Фузидин	<i>Fusidium coccineum</i>

компоненты. В картофельной среде с глюкозой и пептоном, при одной и той же партии пептона и химически чистой глюкозы, состав картофельного экстракта зависит от сорта картофеля, места его произрастания, времени уборки, срока и режима хранения и других причин. Поэтому для получения сопоставимых результатов, особенно при изучении физиологических и биохимических особенностей микроорганизма,

применяют синтетические среды, в состав которых входят определенные химически чистые соединения, взятые в точно указанных концентрациях.

Задача второй стадии – создать оптимальные условия для развития продуцента и максимально возможного биосинтеза необходимого антибиотика. Особенность производства антибиотиков – *двухфазный характер развития продуцентов*. В первой фазе развития культуры, носящей название *тропофазы* (фазы сбалансированного роста микроорганизма), идет интенсивное накопление биомассы продуцента. Продуцент синтезирует белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, ферменты, и другие БАВ, необходимые для роста микроорганизма; наблюдается быстрое потребление основных компонентов субстрата, интенсивное поглощение кислорода. В культуральной среде может снижаться рН, как результат накопления органических кислот. В тропофазе антибиотик, как правило, не образуется или его количество незначительно. Возможно, в этой фазе синтез ферментов, принимающих участие в образовании антибиотика, подавлен. Во второй фазе – *идиофазе* (фазе несбалансированного роста микроорганизма) – накопление биомассы замедлено. Культуральная среда уже обеднена компонентами, необходимыми для развития продуцента и обогащена продуктами его жизнедеятельности. В культуре преобладают протеолитические процессы, приводящие к её подщелачиванию. Продукты метаболизма микроорганизма частично используются на построение клеток мицелия, частично – на синтез антибиотика. Максимум биосинтеза антибиотика в культуральной среде наступает, как правило, после максимального накопления биомассы, этот максимум неодинаков у разных микроорганизмов и при разных условиях культивирования.

Практика промышленной микробиологии показывает, что процесс получения того или иного продукта жизнедеятельности активнее идет в *смешанных культурах*, при совместном развитии нескольких видов (чаще двух) микроорганизмов. Совместным культивированием специально подобранных микроорганизмов создают условия, при которых значительно увеличивается образование антибиотиков, как результат активации ряда биохимических процессов. В смешанных культурах ферментативная реакция служит ответом на проявление определенных антагонистических взаимоотношений. При совместном культивировании различных микробов могут возникать своеобразные гибриды этих организмов, обладающие иными свойствами по сравнению с исходными чистыми культурами.

С накоплением определенной концентрации антибиотика рост микроорганизмов прекращается (например, *Streptomyces griseus* прекращает свой рост при концентрации в среде стрептомицина сульфата 0,5%). Из культуральной среды антибиотики выделяют экстракцией органическими растворителями, осаждением, адсорбцией.

Очистку антибиотиков проводят повторной заменой растворителя, адсорбционно-хроматографическими методами, ВЭЖХ. От степени чистоты препарата, влажности, температуры, pH растворителя зависит стабильность антибиотика.

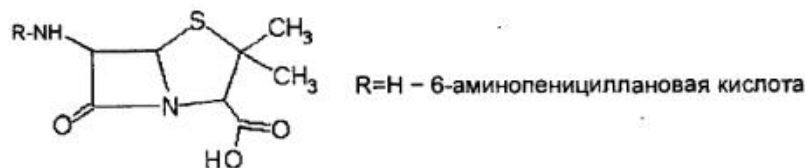
Затем оценивают антимикробный спектр, стерильность, токсичность, пирогенность, действие на лейкоциты крови и другие показатели.

На всех стадиях получения антибиотика строго соблюдается технологическая дисциплина, все процессы осуществляются в асептических условиях.

### 7.3. Частная технология антибиотиков

**Пенициллины и цефалоспорины** – большая группа лекарственных препаратов, имеющих определенное сродство химического строения, механизмов действия, фармакологических, клинических эффектов. Эти препараты называют β-лактамами антибиотиками, что обусловлено наличием в их структуре общего для всей группы четырехчленного лактамного кольца.

Все **пенициллины** имеют одинаковое строение основной группы, которая представлена тиазолидиновым кольцом, соединенным с β-лактамым кольцом, и имеющим аминогруппу – 6-аминопеницилановая кислота (6-АПК).



Различные пенициллины (G, X, F, K и др.) отличаются строением радикала молекулы боковой цепи (табл. 4), активностью и спектром действия. Важные, с точки зрения клинического использования, представители пенициллинов можно разделить на несколько групп:

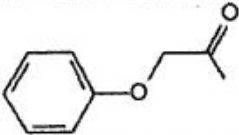
- обладающие наивысшей активностью в отношении грамположительных микроорганизмов и слабой в отношении грамотрицательных видов, а также гидролизующиеся β-лактамазам (пенициллин G);
- относительно резистентные к действию β-лактамаз стафилококков, но с более низкой активностью в отношении грамположительных микроорганизмов и не действующие на грамотрицательные (нафциллин, метациллин);
- относительно высокоактивные против грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, но разрушаемых β-лактамазами (карбенициллин, тикарциллин);
- препараты с относительной кислотоустойчивостью и пригодные для перорального применения (пенициллин V, ампициллин, клоксациллин).

Таблица 4

Различные типы пенициллинов и строение их радикалов

Название пенициллина		Строение радикала при аминогруппе 6-АПК	Активность натриевых солей против <i>Micrococcus pyogenes</i> , ед/мг
общепринятое	условное		
1	2	3	4
Бензилпенициллин	G		1667
n-Оксибензилпенициллин	X		900
2-Пентенилпенициллин	F	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CO-6-АПК	1600
n-Гептилпенициллин	K	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-6-АПК	2300
n-Амилпенициллин	Дигидро F	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-6-АПК	1500

Продолжение табл. 4

1	2	3	4
Феноксиметилпенициллин	V		1670
Аллилмеркаптометилпенициллин	O	CH <sub>2</sub> =CH-CH <sub>2</sub> -S-CH <sub>2</sub> -6-АПК	1630

Структурное единство ядра 6-АПК существенно для проявления биологической активности молекул. При ферментативном расщеплении β-лактамного кольца бактериальными β-лактамазами (пенициллиназами) с образованием неактивной пенициллановой кислоты антибиотик лишается своих антимикробных свойств. Задачей получения новых пенициллинов является разработка препаратов, устойчивых к β-лактамазам или со сниженной способностью к индукции синтеза β-лактамаз. Для предотвращения возникновения резистентных форм бактерий к β-лактамным антибиотикам получены липосомальные формы этих антибиотиков (защита антибиотика происходит в результате включения β-лактама в положительно заряженные липосомы). Комплекс антибиотик-липосома обладает рядом преимуществ:

- снижается токсичность препарата за счет направленного транспорта;
- повышается проникновение антибиотиков через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий;
- антибиотик, включенный в липосомы, защищен от действия β-лактамаз;
- повышается химическая стабильность антибиотика

Для промышленного производства антибиотика используют культуру *Penicillium chrysogenum* и среду, содержащую кукурузный экстракт, гидрол, лактозу и минеральные соли.

Вместо кукурузного экстракта может быть применена арахисовая мука, жмыхи, мука из хлопковых семян и другие источники; возможность широкого использования продуктов растительного происхождения обусловлена тем, что у *P. chrysogenum* имеются сильные протеолитические ферменты. В качестве углеводов часто используют сахарозу

или смесь лактозы с глюкозой в соотношении 1:1. Глюкоза может снижать биосинтез антибиотика; на средах, содержащих лактозу или сахарозу (в условиях депрессии), биосинтез антибиотика идет активнее. Важную роль в процессе биосинтеза пенициллина играет сера, которая содержится в структуре антибиотика. В качестве источников серы используются натрия сульфат и натрия тиосульфат. Избыток ионов меди не влияет на рост гриба, но подавляет биосинтез пенициллина. Эффект торможения биосинтеза снимается добавлением в среду ионов железа. *P. chrysogenum* в качестве источника фосфора может использовать не только фосфаты, но и фитаты (соли инозитфосфорных кислот): этот продуцент содержит фермент, разрушающий фитин с освобождением неорганического фосфора.

Температура в период первой фазы должны быть 30 °С, во вторую фазу 20 °С, pH в период роста гриба – ниже 7,0, потребление углеводов должно быть медленным, что достигается использованием лактозы, либо дробным внесением глюкозы.

Синтез того или иного пенициллина зависит от наличия специфического вещества в среде, иначе говоря, предшественника, который микроорганизм включает в молекулу антибиотика без предварительного расщепления. Следует отметить, что предшественники биосинтеза пенициллина (фенилуксусная кислота, фенилацетамид, феноксиуксусная кислота) при определенных концентрациях и pH среды оказывают токсическое влияние на продуцента. Фенилуксусная кислота наименее токсична. Добавление её в среду в концентрации выше 500 мкг/мл угнетает рост мицелия, особенно в первые 24 ч его развития. Фенилуксусная кислота добавляется в концентрации от 100 до 500 мкг/мл через 24 ч развития *P. chrysogenum*. При таких условиях обеспечивается наибольший выход бензилпенициллина, который через 72 ч развития может достигать 500–1000 мкг/мл.

При развитии гриба без внесения предшественника образуется около 45% бензилпенициллина (пенициллин G) и около 53% пенициллина K (радикал – *n*-гептилпенициллин). При добавлении к среде фенилуксусной кислоты (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>COOH) меняется соотношение образующихся компонентов в сторону резкого увеличения бензилпенициллина, количество которого в зависимости от возраста достигает 75–99% от смеси пенициллинов. В процессе культивирования *P. chrysogenum* в среде, не содержащей фенилуксусной кислоты, в ней накапливаются серосодержащие соединения не β-лактамного характера, близкие к цистину и метионину. Добавление в среду фенилуксусной кислоты спо-

собствует более интенсивному метаболизму серосодержащих компонентов в соединения β-лактамажного характера.

При развитии продуцента пенициллинов – гриба *P. chrysogenum* – на кукурузно-лактозной среде выделяют три фазы.

Первая фаза – рост мицелия, выход антибиотика низок. Всегда присутствующая в кукурузном экстракте молочная кислота потребляется продуцентом с максимальной скоростью, лактоза используется медленно. Потребление кислорода высокое. Усиливается азотный обмен, в результате в среде появляется аммиак и резко поднимается значение pH.

Вторая фаза – максимальное образование пенициллина, это связано с быстрым потреблением лактозы и аммонийного азота. pH среды остаётся почти без изменений, увеличение массы мицелия незначительное, потребление кислорода снижается.

Третья фаза – снижение концентрации антибиотика в среде в связи с начавшимся автолизом мицелия и выделением в результате этого процесса аммиака, что сопровождается повышением pH среды.

В настоящее время описано шесть условно выраженных возрастных фаз продуцента пенициллина. Заметное количество пенициллина начинает образовываться с IV возрастной фазы гриба, максимум накопления приходится на VI фазу – в период автолиза.

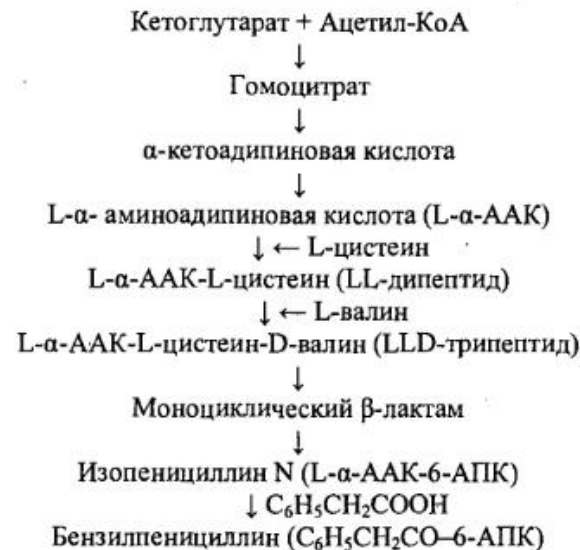
Определение возрастных фаз путём микроскопического контроля позволяет установить: 1) ход общего темпа развития гриба, его состояние, пригодное для использования посевного материала, контроль за ходом образования антибиотика; 2) дефекты развития и возможные причины этих дефектов; 3) момент окончания развития гриба в реакторе.

По мере развития гриба меняется и химический состав мицелия. Количество общего азота и белка в мицелии уменьшается, содержание моносахаров в период максимального биосинтеза пенициллина (96 ч) увеличивается почти в 6 раз по сравнению с начальным периодом, количество дисахаридов уменьшается. Изменяется количество отдельных аминокислот.

Процесс биосинтеза пенициллина ведётся при самом тщательном соблюдении стерильности всех операций, так как загрязнение культур посторонней микрофлорой резко снижает накопление антибиотика. Это связано с тем, что многие бактерии воздуха способны образовывать пенициллиназу. Особенно активно продуцируют этот фермент *B. subtilis* и *B. cereus*. Одним из активных продуцентов пенициллиназы является туберкулёзная палочка (*Mycob. tuberculosis*). Предположительно имен-

но с этим свойством связана резистентность этого микроорганизма к пенициллину.

Механизм биосинтеза молекулы пенициллина представлен на схеме.



Современная промышленная микробиология получает культуральные жидкости, содержащие свыше 55 тыс. ед/мл. Выделение пенициллина начинается с фильтрации или центрифугирования (отделения мицелия гриба).

Из культуральной жидкости антибиотик, где он находится в виде кислоты, выделяют путём экстракции неполярными органическими растворителями (амилацетатом, хлороформом, бутилацетатом, бутанолом и др.). Очистку антибиотика проводят путём замены растворителей, поскольку соли пенициллина плохо растворимы в органических растворителях. Экстрагированный пенициллин в виде кислоты переводят в водный раствор в виде соли, добавляя щёлочь. Повторяя эти операции, пенициллин концентрируют и очищают. Большинство пенициллинов производят в виде натриевых или калиевых солей. Новокаиновые и бензатиновые соли являются основой пролонгированных препаратов пенициллина для внутримышечного введения.

В сухой кристаллической форме пенициллиновые соли достаточно стабильны в течение длительного времени при температуре 4 °С. Рас-

творы быстро теряют активность (в течение 24 часов при температуре 20 °С), их готовят непосредственно перед введением.

В настоящее время большое практическое значение имеет полусинтетический (биологический + химический) способ получения аналогов природного пенициллина. Исходным продуктом служит 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК).

6-АПК получают в результате биосинтеза при развитии *P. chrysogenum* при отсутствии предшественника в среде или путём ферментативного дезацилирования бензилпенициллина или феноксиметилпенициллина при участии фермента пенициллинацилазы (пенициллинамидазы). Второй способ наиболее перспективен. Используется иммобилизованная пенициллинацилаза, которая гидролизует бензилпенициллин с образованием 6-АПК и фенилуксусной кислоты. Пенициллинацилаза образуется различными группами микроорганизмов, в том числе она образуется всеми продуцирующими пенициллин грибами. В настоящее время предложен способ получения иммобилизованных клеток *E. coli* с высокой пенициллинацилазной активностью, пригодных для многократного применения.

Сама по себе 6-АПК не активна. Её подвергают химическому ацилированию и получают аналоги пенициллина с улучшенными или новыми свойствами; некоторые из них: оксациллин, ампициллин, метициллин, амоксициллин и другие. Всего в настоящее время используется порядка четырёх десятков таких препаратов.

В настоящее время бензилпенициллин необходим не только как медицинский препарат, но и как вещество, являющееся исходным продуктом для получения 6-АПК и в дальнейшем полусинтетических пенициллинов. Из общего количества природных пенициллинов примерно 35% используется как медицинские препараты, а 65% – для получения 6-АПК.

В начале 60-х гг. были предприняты попытки химического синтеза пенициллинов, в частности был синтезирован феноксиметилпенициллин, но практического значения эти попытки не имели.

Большинство пенициллинов производят в виде натриевых и калиевых солей. Новокаиновые и бензокаиновые соли являются пролонгированными формами для внутримышечного введения. В сухой кристаллической форме пенициллиновые соли достаточно стабильны при температуре 4 °С. Растворы быстро теряют активность (в течение 24 ч при температуре 20 °С), их готовят непосредственно перед введением. Пе-

роральные пенициллины применяют за 1 ч до или через 2 ч после приема пищи, чтобы снизить связывание компонентами пищи и кислотную инактивацию препаратов.

**Цефалоспорин** – антибиотик из грибов рода *Cephalosporium*. Основным продуцентом является *C. ascremonium*.

Впервые сообщение было сделано Джузеппе Бротцу в 1948 г. В культуральной жидкости было обнаружено несколько цефалоспоринов, основной из которых – цефалоспорин С. На основе этого антибиотика в дальнейшем были созданы многочисленные полусинтетические цефалоспорины с ценными свойствами.

По химическому строению цефалоспорин принадлежит к β-лактамым соединениям, но β-лактамное кольцо конденсировано не с пяти, а с шестичленным гетероциклом. Цефалоспорины в отличие от пенициллинов устойчивы к β-лактамазе, подавляют развитие и грамположительных и грамотрицательных бактерий, но активность этого антибиотика ниже пенициллина.

Цефалоспорин не инактивируется пенициллиназой. Но имеется аналогичный фермент, гидролизующий β-лактамное кольцо цефалоспорина – цефалоспориназа.

В процессе развития *C. ascremonium* наряду с цефалоспорином С синтезируется и пенициллин N. Его образование идёт тем же путём, что и образование изопенициллина N в процессе биосинтеза бензилпенициллина. Через ряд стадий из изопенициллина N образуется цефалоспорин С.

Все пенициллины и цефалоспорины являются селективными ингибиторами синтеза клеточной стенки. Первый этап действия препаратов заключается в их связывании с клеточными рецепторами; такими рецепторами являются *пенициллинсвязывающие протеины (ПСП)*, количество которых составляет от 3 до 6 тыс. у различных бактерий. Отдельные ПСП могут иметь неодинаковый аффинитет к препарату, и каждый из них может опосредовать различное действие. Так, присоединение пенициллина к одному ПСП может вызывать аномальное увеличение клетки, присоединение к другому – приводить к дефекту на поверхности клеточной стенки без последующего лизиса клетки. ПСП контролируется хромосомами, мутации могут изменить их количества и аффинитет к отдельным β-лактамным препаратам. После связывания β-лактамного препарата с рецепторами ПСП ингибируется реакция транспептидирования и останавливается синтез пептидогликана. Следующий этап – устранение или инактивация ингибитора аутолити-

ческих энзимов (гидролаз) в клеточной стенке, что сопровождается активизацией литического фермента у некоторых микроорганизмов и может привести к лизису клетки.

В последние годы методом смешанного (биологического и химического) синтеза удалось получить около 50 тыс. аналогов цефалоспоринов. Примерно 50 антибиотиков имеет практическое клиническое значение. Цефалоспорины традиционно делят на четыре поколения по спектру действия и антимикробной активности (табл. 5).

Таблица 5

## Характеристика цефалоспоринов различных поколений

Поколение	Препараты	Спектр активности
I	Цефадроксил, цефазолин, цефалексин, цефалотин, цефапирин, цефрадин	Стафилококки, стрептококки, пневмококки, энтеробактерии
II	Цефаклор, Цефамандол, Цефоницид, Цеокситин, Цефметазол, цефотетан, цефуроксим, цефпрозил, лоракарбеф, цефподоксим	Грамотрицательные бактерии, устойчивые к действию β-лактамаз
III	Цефеперазон, цефотаксим, цефазидим, цефтизоксим, цефтриаксон, цефиксим, максалактам	Энтеробактерии, в т.ч. устойчивые к другим антибиотикам. Устойчивы к действию β-лактамаз, образуемых грамотрицательными бактериями
IV	Цефипин	Низкое сродство к β-лактамазам, быстро проникает в периплазматическое пространство

**Стрептомицин** принадлежит к группе аминогликозидных антибиотиков.

Актиномицет, синтезирующий стрептомицин *Streptomyces griseus* впервые был выделен в лаборатории микробиологии Ратджерского университета в 1943 г. С появлением стрептомицина медицина получила мощное оружие для борьбы с таким тяжёлым и достаточно широко распространённым заболеванием, как туберкулёз. Поэтому детально разрабатывались вопросы применения стрептомицина в терапии различных инфекционных заболеваний и его промышленного производства.

Стрептомицин продуцируют ряд видов актиномицетов рода *Streptomyces*. Однако основным продуцентом стрептомицина признан *S. griseus*, способный синтезировать до 10–20 тыс мкг/мл антибиотика. Культуры актиномицетов весьма переменчивы и каждому штамму должна соответствовать определённая среда и свой режим для развития микроорганизма. На их изменчивость влияют условия культивирования и особенно состав сред (на более богатых по составу средах наблюдается и более быстрая изменчивость). Изменчивость продуцентов стрептомицина – результат генетической нестабильности этих микроорганизмов, обусловленный существенными перестройками ДНК, которые затрагивают многие гены, в том числе и гены биосинтеза антибиотиков и гены устойчивости к ним.

Для стабилизации признаков, связанных с антибиотикообразованием, при хранении и поддержании штамма иногда в среды добавляют антимуагены – вещества, способные стабилизировать процессы, приводящие к хромосомным перестройкам и регуляции экспрессии генов. Среди антимуагенов – пуриновые нуклеотиды, ионы марганца, L-метионин, гистидин, полиамины, кофеин и другие соединения. В контроле биосинтеза стрептомицина *S. griseus* принимает участие плазмидная ДНК, в процессе биосинтеза – 20–30 генов.

При промышленном производстве стрептомицина используются штаммы, хорошо развивающиеся на соевых средах, их основными компонентами является соевая мука, гидролиз, аммонийные соли. Существенную роль в биосинтезе стрептомицина играют жиры соевой муки и её минеральный состав. Белок сои и его кислотный гидролизат мало пригодны для биосинтеза антибиотика.

Аэрация среды имеет существенное значение, так как *S. griseus* – высокоаэробный организм и поглощает значительное количество кислорода, которое зависит от состава среды и стадии развития продуцента. В ранний период развития актиномицета потребление кислорода воздуха более интенсивное, а затем оно падает до нуля. Увеличение степени аэрации повышает выход стрептомицина. В анаэробных условиях продуцент стрептомицина развивается слабо. Мицелий, выращенный в аэробных условиях и перенесённый затем в анаэробные, стрептомицина не образует. Для максимального накопления антибиотика культура должна находиться в условиях непрерывной аэрации.

Оптимальная температура для развития антибиотика 27–29 °С. Повышение её до 30 °С и выше резко снижает и даже прекращает его об-

разование. Оптимальную температуру меняют в зависимости от штамма продуцента и состава среды.

Лучшим начальным рН для развития актиномицета является 7,0. Стрептомицин образуется при значении рН от 7,5 до 8,5. В кислых средах активность стрептомицина снижается, в щелочных – максимальная. Так, активность стрептомицина при рН 5,8 в 20–80 раз меньше, чем при рН 8,0. Для проявления максимальной антимикробной активности стрептомицина оптимальное значение рН 7,5–8,0.

Наличие некоторых веществ в среде влияет на антибиотическую активность стрептомицина. Если к этой среде прибавить 0,5–3% натрия хлорида, калия хлорида или натрия сульфата, *E. coli* развивается в присутствии 10 мкг/мл стрептомицина. Имеется два объяснения этому факту: в присутствии натрия хлорида уменьшается скорость и степень диффузии стрептомицина, или натрия хлорид снижает адсорбцию антибиотика бактериальной клеткой. При концентрации пировиноградной, фумаровой кислот до 1% продуцент развивается в присутствии 10 мкг/мл стрептомицина, если концентрацию солей повысить до 3%, рост бактерий наблюдается при концентрации антибиотика 150 мкг/мл. Защитные свойства этих кислот по-разному проявляются по отношению к различным микроорганизмам. В отношении *E. coli* защитные свойства проявляются в большей степени, в отношении *Staph. aureus* защитных свойств не наблюдается. Сильно снижается активность стрептомицина в присутствии цистеина и гидроксиламина (цистеин полностью инактивирует антибиотик в течение нескольких часов).

При развитии продуцента различают две основные стадии. На первой стадии идёт быстрый рост и развитие микроорганизма с энергичным использованием основных компонентов субстрата, максимальное потребление кислорода. В цитоплазме высокое содержание РНК, ДНК вначале отсутствует и обнаруживается только через 12 ч развития. В среде происходит некоторое увеличение аммонийного азота, связанное с разложением белков соевой муки. рН вначале несколько снижается, затем повышается с 6,8 до 7,9. Образование стрептомицина незначительное.

Через 28 ч масса мицелия прекращает увеличиваться, начинается вторая стадия – процесс образования стрептомицина. На третьи сутки рН с 7,9 падает до 6,7, а на четвёртые и пятые – вновь возрастает до 7,7. Вторая стадия характеризуется медленным потреблением оставшихся в среде питательных веществ, замедлением роста актиномицета, снижением потребления кислорода, автолизом мицелия, максимальным обра-

зованием стрептомицина. Максимальное накопление стрептомицина наблюдается, когда автолитические процессы начинают преобладать над процессами роста. Количество аммонийного азота продолжает возрастать, что, по всей вероятности, связано с разложением белков соевой муки и автолизом мицелия. В культуральной жидкости находятся минеральные вещества, белки, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, полисахариды, жиры, стрептомицин и другие вещества.

*S. griseus* при определённых условиях развития культуры образует ещё один антибиотик – маннозидострептомицин (стрептомицин В), в чистом виде выделенный в 1947 г. из культуры актиномицета методом противоточной хроматографии. Маннозидострептомицин отличается от стрептомицина наличием в молекуле маннозы. Он менее активен, чем стрептомицин. Культуры *S. griseus* содержат фермент, превращающий маннозидострептомицин в стрептомицин. При соответствующем контроле развития культуры актиномицета можно добиться минимального образования маннозидострептомицина.

Основная часть стрептомицина выделяется в культуральную среду, но часть его остаётся в мицелии и на его поверхности. С целью извлечения стрептомицина из микроорганизма культуральную жидкость вместе с биомассой обрабатывают минеральной кислотой. При этом весь антибиотик переходит в раствор. Мицелий отделяют прессованием или центрифугированием. Свободную от мицелия культуральную жидкость обрабатывают щавелевой кислотой. Этим достигается удаление белков и органических оснований, ионов металлов (кальция, магния, железа), далее ведётся выделение стрептомицина в чистом виде.

Стрептомицин – сильно полярное соединение и его основание и соли неорганических кислот хорошо растворимы в воде. Соли же органических кислот стрептомицина нерастворимы почти во всех органических растворителях.

Для выделения стрептомицина из культуральной жидкости в чистом виде используются методы адсорбции на активированном угле и метод ионообменной хроматографии.

В основу первого метода положена адсорбция стрептомицина на активированном угле при нейтральном или слабощелочном рН среды. При рН 2–4 стрептомицин остаётся в растворе, в то время как примеси адсорбируются на сорбент. После удаления примесей на активированный уголь адсорбируют из подщелоченной среды антибиотик, его десорбцию осуществляют этанолом, подкисленным кислотой хлороводо-

родной. Далее в раствор добавляется диэтиловый эфир – стрептомицин выпадает в осадок.

Стабильность стрептомицина имеет значение для производства и хранения антибиотика. Она зависит от чистоты препарата, влажности, температуры, pH растворителя. Химически чистый стрептомицин устойчив в сухом состоянии и в виде растворов. Соли стрептомицина при хранении при комнатной температуре инактивируются лишь в незначительной степени на протяжении нескольких лет. Максимальная стабильность растворов стрептомицина сульфата и гидрохлорида находится при pH от 3,0 до 7,0 при температуре от 7 до 25 °С.

По отношению к стрептомицину микроорганизмы условно делятся на 3 группы:

1. Чувствительные, рост которых подавляется при концентрации стрептомицина 10 мкг/мл, это роды *Bacillus*, *Bordetella*, *Brucella*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus* и некоторые другие.
2. Умеренно чувствительные, для подавления которых *in vitro* необходима концентрация антибиотика от 10 до 100 мкг/мл, сюда относят многие бактерии из родов *Enterobacter*, *Corinebacterium*, *Diplococcus*, *Proteus*, *Streptococcus*, *Vibrio*.
3. Устойчивые, для подавления которых необходима концентрация стрептомицина, превышающая 100 мкг/мл. К этой группе относят роды *Bacteroides*, *Clostridium*, некоторые виды *Proteus*, многие виды грибов, дрожжей, риккетсии, вирусы.

К стрептомицину легко возникает вторичная резистентность. Повышение устойчивости к нему в 1000 раз возникает у золотистого стафилококка всего лишь через три пассажа на бульоне с возрастающими концентрациями антибиотика, а у *Salmonella typhi* повышение устойчивости после 14 пассажей наблюдается в 22 600 раз.

При лечении стрептомицином необходимо учитывать его побочные эффекты, могут появиться глухота, вестибулярные и другие нарушения функций. Их развитие определяется длительностью периода лечения, дозой антибиотика, методами введения, степенью очистки. Токсичность менее очищенных препаратов стрептомицина первого периода получения и применения стрептомицина была более высокой, что связано с наличием в препаратах гистаминоподобных веществ, которые сами достаточно токсичны.

**Грамицидин С.** Продукт *Bacillus brevis* способен синтезировать полипептидные антибиотики, к числу которых относят грамицидины А, В, С<sub>в</sub>, D, С. Последний иногда обозначают как грамицидин S (совет-

ский грамицидин). Все они отличаются как по аминокислотному составу, так и по пространственной структуре молекулы.

Для производства грамицидина С (S) предложены среды на основе мясного и дрожжевого гидролизатов, содержащие сбалансированный набор минеральных и органических солей.

В процессе культивирования необходимо подобрать сбалансированное сочетание интенсивности аэрации среды (от 0,38 до 4,38 г О<sub>2</sub>/л/ч) и концентрации входящих в неё веществ. Температура культивирования – 40 °С. Развитие продуцента и синтез антибиотика может идти и при температуре 28 °С, но в этом случае максимальный биосинтез антибиотика наблюдается в первые 24 ч, в то время, как при температуре 40 °С – между 24 и 48 ч.

При выделении грамицидина С культуральную жидкость подкисляют кислотой хлороводородной до pH 4,5–5,0. В осадок выпадает дихлоридат грамицидина С вместе с бактериальными клетками продуцента. Из осадка антибиотик экстрагируют этанолом. Концентрат, содержащий 4 % грамицидина, используется в медицинской практике.

**Неомицины.** В 1949 г. З. Ваксман и Х. Лешевалье из культуры *Streptomyces fradiae* выделили неомицин. В дальнейшем было установлено, что это комплекс, состоящий из семи антибиотиков аминоклидоного строения.

На синтетической среде актиномицет развивается лучше, чем на среде с соевой мукой, но биосинтез неомицина на синтетической среде почти в 8 раз ниже, чем на натуральной среде неопределённого состава. Некоторые вещества способствуют повышению выхода неомицина на 50%. К ним относятся ауксин, α-нафтилуксусная кислота. Наиболее эффективная доза ауксинов – семь частей на миллион, внесённая в среду перед стерилизацией. Стимулирующий эффект ауксинов проявляется при продолжительности процесса 138–162 ч, в ранние сроки развития культуры эффект отсутствует.

В процессе образования антибиотика существенную роль играет цинк. Степень аэрации культуры должна быть несколько ниже, чем при выработке стрептомицина.

Неомицины – основания, хорошо растворимые в воде и нерастворимые в органических растворителях, наибольшая их антибиотическая активность проявляется в щелочной среде.



Неомициновый комплекс не теряет антимикробных свойств при длительном хранении (до 2-х лет) как в виде растворов, так и в твёрдом состоянии.

Антимикробный спектр сходен со спектром стрептомицина. Но неомицин подавляет развитие устойчивых к стрептомицину штаммов *Mycobacterium tuberculosis*. Он малоактивен в отношении большинства видов *Clostridium*, *Streptococcus*, грибов, а также против вирусов и протозоа.

Чувствительные к неомицину микроорганизмы приобретают устойчивость к нему в меньшей степени, чем к стрептомицину.

При использовании неомицина следует учитывать его токсичность. Для человека неомицин более токсичен, чем стрептомицин. Степень токсичности колеблется в зависимости от состава неомицинового комплекса и чистоты препарата.

### Тест-контроль к главе 7

**Выберите правильные ответы:**

1. Антибиотики являются:
  - А – первичными метаболитами;
  - Б – вторичными метаболитами.
  
2. Биологическая роль антибиотиков:
  - А – они необходимы для деления клеток;
  - Б – это одна из форм микробного антагонизма;
  - В – являются кофакторами ферментов, принимающих участие в синтезе клеточной мембраны;
  - Г – являются кофакторами ферментов, принимающих участие в формировании клеточной стенки.
  
3. Цель стадии предварительной обработки культуральной жидкости в производстве антибиотиков:
  - А – освободить культуральную жидкость от кислорода;
  - Б – освободить культуральную жидкость от продуцента;
  - В – освободить культуральную жидкость от окислителей;
  - Г – освободить культуральную жидкость от азотистых соединений.
  
4. Процессы, НЕ характерные для тропофазы стадии биосинтеза антибиотиков:
  - А – интенсивное накопление биомассы продуцента;
  - Б – интенсивное поглощение кислорода;
  - В – снижение уровня рН;
  - Г – интенсивное образование антибиотика.
  
5. Автолиз мицелия продуцента в процессе биосинтеза антибиотиков характерен для стадии:
  - А – тропофазы;
  - Б – идиофазы.
  
6. Натуральные среды как правило не используются:
  - А – для поддержания культуры микроорганизма;
  - Б – для накопления биомассы;

- В – для диагностических целей;  
Г – для изучения обмена веществ.
7. Источник углерода подбирается с таким расчётом, чтобы:  
А – продуцент активно развивался и в идиофазу, и в тропофазу;  
Б – накопление антибиотика максимально шло и в идиофазу, и в тропофазу;  
В – продуцент активно развивался в идиофазу и максимально синтезировал антибиотик в тропофазу;  
Г – эффективно шло использование источника азота.
8. При биосинтезе какого антибиотика необходим источник хлора:  
А – ампициллина;  
Б – стрептомицина;  
В – левомицетина;  
Г – грамицидина С.
9. При использовании в качестве источника азота калия нитрата субстрат будет:  
А – подщелачиваться;  
Б – подкисляться;  
В – среда остаётся нейтральной.
10. При использовании в качестве источника азота аммония сульфата в присутствии ионов кальция субстрат будет:  
А – подщелачиваться;  
Б – подкисляться;  
В – среда остаётся нейтральной.
11. Антибиотик, нарушающий синтез клеточной стенки микроорганизмов:  
А – эритромицин;  
Б – хлортетрациклин;  
В – хлорамфеникол;  
Г – феноксиметилпенициллин.
12. Антибиотик, к которому медленно развивается у микроорганизмов вторичная резистентность:  
А – эритромицин;

- Б – стрептомицин;  
В – хлорамфеникол;  
Г – канамицин.
13. Не вводят в культуральную среду на стадии биосинтеза антибиотика:  
А – стерильный воздух;  
Б – пеногасители;  
В – пенообразователи.
14. Перекись водорода может вводиться в культуральную среду на стадии биосинтеза антибиотика с целью:  
А – подкисления среды;  
Б – подщелачивания среды;  
В – разжижения среды;  
Г – ликвидации кислородного голодания продуцента.
15. В производстве антибиотиков при культивировании микроорганизмов используется:  
А – поверхностное культивирование;  
Б – глубинное культивирование.
16. В производстве антибиотиков при культивировании микроорганизмов используются питательные среды:  
А – твёрдые;  
Б – жидкие;  
В – мягкие;  
Г – газообразные.
17. Какая цель НЕ преследуется при перемешивании среды в реакторе:  
А – удаление с поверхности клеток продуктов обмена и лизиса клеток;  
Б – распыление воздуха, выходящего из барботёра;  
В – равномерное распределение питательных веществ;  
Г – отделение культуральной среды от продуцента.
18. Микроорганизмы, которые НЕ используются в процессе биосинтеза антибиотиков:

- А – вирусы;
- Б – бактерии;
- В – актиномицеты;
- Г – грибы.

19. Широкое применение для промышленного выделения и очистки антибиотиков находят:

- А – хроматография в тонких слоях;
- Б – ионообменная хроматография;
- В – высокоэффективная жидкостная хроматография;
- Г – бумажная хроматография.

20. Требование, неприемлемое для кормовых антибиотиков:

- А – не должны всасываться из желудочно-кишечного тракта;
- Б – не должны загрязнять продукты животного происхождения;
- В – должны использоваться в медицине;
- Г – не должны обладать способностью образовывать у микроорганизмов множественную резистентность.

21. Грамицидан С из культуральной жидкости осаждают:

- А – кислотой хлороводородной;
- Б – сернокислым аммонием;
- Г – этанолом.

22. Для выделения полимиксинов из культуральной среды используется:

- А – гель-фильтрация;
- Б – катиониты;
- В – аниониты;
- Г – силикагель.

23. При промышленном производстве стрептомицина используют штаммы, хорошо развивающиеся на средах:

- А – кукурузных;
- Б – гороховых;
- В – хлопковых;
- Г – соевых.

24. Токсичность плохо очищенных препаратов стрептомицина связана:

- А – с наличием в препаратах гистаминоподобных веществ;
- Б – с образованием токсичных веществ из стрептомицина;
- В – с повышенной скоростью проникновения стрептомицина в ткани организма;
- Г – с пониженной скоростью проникновения стрептомицина в ткани организма и, таким образом, повышенным его содержанием в крови.

## Глава 8. ФЕРМЕНТЫ. ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ

Ферменты (Ф) – белковые вещества, выполняющие функции катализаторов химических реакций и используемые в медицине, пищевой, фармацевтической и химической промышленности. Реакции, осуществляемые ферментами, не требуют экстремальных условий (температуры, кислотности среды и др.), оптимальное значение температуры для большинства Ф 20–40 °С, ее повышение до 40 °С и выше, как правило, влечёт снижение активности Ф или их полную денатурацию. Ферменты характеризуют высокая скорость, стереоспецифичность, и незначительное количество образующихся побочных продуктов. Важное их свойство – эффективность катализа (ферменты увеличивают скорость в  $10^{10}$ – $10^{12}$  раз) и избирательность действия (каждый фермент, как правило, катализирует одну химическую реакцию). Ферменты способны катализировать не только расщепление, но и образование химической связи.

Ферменты – высокомолекулярные соединения с м.м. от 10000 до 1000000. Ферментные белки малоустойчивы, весьма чувствительны к изменениям pH и температуры. Для каждого Ф существует оптимум значения pH, при котором скорость катализируемой реакции максимальна; отклонения значения pH в ту или иную сторону ведут к снижению скорости ферментативной реакции.

По экономическим и технологическим соображениям получать Ф с помощью микроорганизмов более выгодно, чем из растительных и животных источников. Микробные клетки содержат или продуцируют более двух тысяч Ф, которые катализируют биохимические реакции, связанные с ростом, дыханием и образованием продуктов. Культуры микроорганизмов способны вырабатывать большое количество Ф за короткое время с использованием дешёвых исходных веществ. Многие из этих Ф могут быть выделены и проявляют свою активность независимо от клетки.

К настоящему времени в научной литературе описано около 3000 Ф, примерно 100 из них применяют в промышленном производстве. Промышленность выпускает свыше 50 индивидуальных Ф и вдвое больше ферментных препаратов, последние представляют собой смеси, содер-

жащие кроме целевого продукта – Ф – значительное количество близких по физико-химическим свойствам белков.

В биологических объектах Ф находятся в фиксированном состоянии на поверхности различных клеточных структур и сохраняют активность в течение длительного времени. Выделенные из органов и тканей или полученные из микробного сырья, особенно в высокоочищенном состоянии, Ф быстро инактивируются.

### 8.1. Промышленное производство ферментов, получаемых биотехнологическими методами

Схема производства Ф микробиологического происхождения представлена на рис. 21.

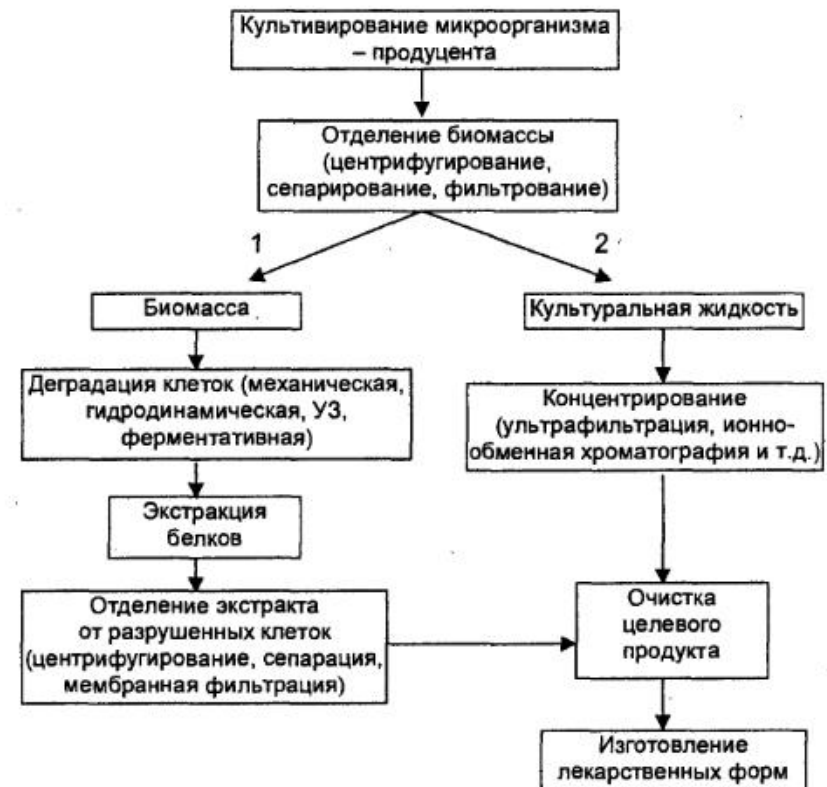


Рис. 21. Технология ферментов, получаемых биотехнологическим методом: 1 – внутриклеточные Ф; 2 – внеклеточные Ф

### 8.1.1. Культивирование продуцентов ферментов

Интенсивность биосинтеза любого фермента микроорганизмом, его продуктивность обусловлена генетическими свойствами продуцента. Функционирование биосинтетической системы регулируется составом питательной среды и динамикой изменения отдельных ее компонентов во время роста микроорганизмов. Культивирование микроорганизмов – продуцентов ферментов целесообразно в средах строго детерминированного состава, обеспечивающих направленный биосинтез нужного Ф.

Синтез многих Ф репрессируется легкоусвояемыми источниками углерода (глюкозой, фруктозой, маннозой и др.); этот эффект носит название катаболитной репрессии (иногда глюкозным эффектом). Катаболитной репрессии подвержен биосинтез таких Ф, как  $\alpha$ -амилаза, целлюлаза, глюкоамилаза, инвертаза, трансэлиминаза полигалактуроновой кислоты.

Ферменты, катализирующие превращение азотсодержащих субстратов, также регулируются по механизму катаболитной репрессии; их биосинтез репрессируется ионами аммония или быстроусвояемыми аминокислотами. Аминокислоты в анаэробных условиях культивирования инициируют биосинтез соответствующих декарбоксилаз. При наличии в среде большой концентрации мочевины стимулируется биосинтез уреазы. Введение в среду культивирования аргинина индуцирует биосинтез аргиназы. Источниками органического азота могут служить пептон, триптон, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина или любая их смесь.

Наличие в среде культивирования различных биополимеров обуславливает одновременное накопление комплекса протеаз, амилаз, нуклеаз, липаз.

На рост микроорганизмов и биосинтез Ф существенное влияние оказывают ионы кальция, марганца, цинка и др. Ионы железа и магния активируют и стабилизируют протеолитические ферменты. Присутствие ионов железа и меди в среде культивирования существенно для биосинтеза железо- и медьсодержащих Ф, участвующих, как правило, в окислительно-восстановительных реакциях (утилизации и превращения энергии). Отсутствие таких ионов может негативно отразиться на скорости многих метаболических процессов и на биосинтезе Ф, катализирующих эти процессы.

Продуценты Ф, относящиеся к строгим анаэробам, требуют полностью бескислородных условий культивирования и очень богатых, пол-

ноценных сред. Процесс культивирования в этом случае можно проводить в более простых ферментерах, так как не нужна аэрация и перемешивание.

Оптимизация питательных сред и условий культивирования для обеспечения направленного биосинтеза продуцентом целевого продукта является важным этапом разработки биотехнологического процесса получения высокоочищенных Ф. Преимущественный биосинтез культурой нужного продукта с минимальным содержанием посторонних белков позволяет в дальнейшем существенно упростить выделение и очистку Ф.

### 8.1.2. Переработка культуральной жидкости

Большинство Ф промышленного производства относится к внеклеточным, поэтому они находятся в культуральной жидкости. При выделении внутриклеточных Ф (изоферментов) основной задачей является сбор клеток, содержащих Ф.

Глубинная культура представляет собой суспензию, содержащую остатки питательных веществ, продукты метаболизма (в том числе внеклеточные Ф), взвешенные клетки продуцента. В период культивирования обычно происходит ограниченный лизис микробных клеток и в суспензии появляется неконтролируемое количество внутриклеточных метаболитов. Из этой достаточно сложной и многокомпонентной смеси приходится выделять и очищать один Ф.

Технологический процесс начинают с разделения растворимых и нерастворимых веществ, концентрирования и фракционирования, заканчивают разнообразными способами хроматографической очистки.

**Фильтрация** жидкости, содержащей мелкодисперсный клеточный материал, частично разрушенные клетки и внутриклеточные полимеры, сопряжена с определенными трудностями. Фильтруемый раствор вязок, склонен к гелеобразованию, осадок сжимается и закупоривает поры фильтра. Для избежания этого применяют крупнопористые фильтрующие материалы – диатомиты, кизельгур, бентонит, фильтроперлит и др.: они задерживают очень мелкие частицы, образуются несжимаемые слои фильтрующего материала и биомассы, которые не изменяют фильтрующих свойств и не забивают фильтры. На фильтрующем материале может происходить сорбция или денатурация некоторых белков, в результате значительно снижается выход Ф. Обработка фильтроперлита раствором ЭДТА уменьшает потери на 2–6%.

Сепарацию клеточной массы и сопутствующих конгломератов осуществляют с помощью центрифуг (фирмы «Beckman», США, MSE, Англия, «Hitadi», Япония).

*Дезинтеграция биомассы.* Основное количество Ф обычно находится внутри клеток, где он образует комплексы с другими биополимерами. Клеточные структуры могут быть разрушены в результате прямого механического воздействия (баллистическими, УЗ-, экструзионными, ферментативными методами – см. гл. 5.7). После дезинтеграции биомассы продуцента фермента получается вязкая, опалесцирующая суспензия, содержащая фрагменты клеточных стенок, субклеточных структур и продукты их деградации, а также самые разнообразные высоко- и низкомолекулярные органические вещества. Ферменты находятся в растворенном состоянии, поэтому на одной из первой стадий обработки клеточного гомогената должны быть удалены нерастворимые частицы. Для этого применяют скоростное центрифугирование. Образуется прозрачный клеточный экстракт, содержащий только растворенные биополимеры и низкомолекулярные компоненты. Среди нежелательных процессов, которые могут происходить в таком растворе – протеолиз собственными клеточными протеазами, что влечет потерю каталитической способности, изменение специфичности или стабильности выделяемого Ф. Этот процесс может протекать несмотря на поддержание низкой температуры, особенно при очистке Ф, так как после удаления сопутствующих белков Ф становится единственным субстратом протеазы.

*Инактивацию протеаз* осуществляют обработкой клеточного экстракта специфическими ингибиторами-комплексонами (ЭДТА, о-фенантролин, оксикинолин), солями ртути или серебра. Протеазы из клеточных экстрактов могут быть удалены сорбцией на аффинных сорбентах. Если протеазы термолабильны, а выделяемый Ф термостабилен, их можно денатурировать нагреванием клеточных экстрактов. Денатурацию нуклеиновых кислот в процессе очистки Ф обуславливает низкая ионная сила или основность среды. Можно использовать специальные осадители, образующие с нуклеиновыми кислотами нерастворимые комплексы. С этой целью применяют бромистый цетилтриметиламмоний, стрептомицинсульфат, протаминасульфат, полиэтиленимин. Полнота удаления нуклеиновых кислот зависит от pH и ионной силы раствора, концентрации осадителя и белка. Чтобы белки остались в растворенном состоянии, повышают ионную силу растворов. По эффективности осаждающего действия на нуклеиновые кислоты в экстрактах *E. coli* осадители располагаются в следующем порядке: полилизин > полиэти-

ленимин > бромистый цетиолтриметиламмоний > стрептомицинсульфат > протаминасульфат > магния хлорид.

Другой способ удаления нуклеиновых кислот из клеточных экстрактов – их гидролиз под действием нуклеаз; для этого применяют панкреатические ДНК-азу и РНК-азу.

*Значительную часть биополимеров можно удалить* термообработкой клеточных растворов, если Ф термостабилен. Далее проводят хроматографическую очистку, в том числе аффинную.

В качестве сорбентов применяют различные гели – фосфатов кальция, гидроксида алюминия, реже – древесный уголь или гель гидроксида цинка. Сорбцию на гелях проводят в слабокислых растворах (pH 5,0–6,0); важны оптимальные соотношения между количеством геля и белкового раствора. Гель, содержащий сорбированный Ф, отделяют центрифугированием.

Для ультрафильтрации используют мембранные фильтры, селективность и скорость работы которых зависят от давления, гидродинамических условий, температуры, состава фракционируемой смеси и ее концентрации.

*Для фракционирования белковых растворов используют нейтральные соли.* Известно, что растворимость белков зависит от величины молекул белка, степени их гидратации и ионной силы солевых растворов. Растворяясь, соль связывает воду и, таким образом, изменяет степень гидратации молекул белка, что приводит к их агрегации и образованию осадка. С этой целью применяют аммония сульфат, который обладает стабилизирующим эффектом по отношению ко многим Ф. Обычно выход Ф при фракционировании аммония сульфатом достигает 100%.

*Фракционирование белков растворителями.* При смешивании органических растворителей с водой изменяется ее диэлектрическая константа и соответственно степень гидратации молекул, вплоть до замены молекул воды молекулами органического растворителя. Все это ускоряет образование нерастворимых агрегатов белковых молекул. Обычно для фракционирования растворов Ф применяют этанол и ацетон. При повышенной температуре (более 4 °С) в водно-органических смесях Ф денатурируют, поэтому работы с органическими растворителями проводят при низких температурах. Органический растворитель охлаждают до (–30) – (–40 °С) сухим льдом или жидким азотом; температура смеси поддерживается при этом на уровне от –10 до –20 °С. Осадок центрифугируют, затем растворяют в небольшом объеме буферного раствора,

удаляя следы органических растворителей диализом или ультрафильтрацией через гель.

Для хроматографического фракционирования применяют ионно-обменную, аффинную хроматографию и гель-фильтрацию. Наиболее эффективная очистка Ф достигается ионно-обменной хроматографией с использованием сорбентов на основе сополимеров метакриловой кислоты и различных гидрофобных мономеров. В препаративной энзимологии применяют иониты на основе натуральных или полусинтетических полисахаридных матриц (ионно-обменные целлюлозы). Среди многих производных целлюлозы чаще используют ДЭАЭ-, ТЭАЭ-, КМ- и фосфоцеллюлозы (первые два – аниониты, последние – катиониты). Предпочтительна гранулированная целлюлоза, гидродинамические свойства которой позволяют проводить хроматографический процесс с большой скоростью.

После элюирования из колонки функционально активных белков сорбент подлежит регенерации. Для удаления неактивных белков, пигментов и др. сорбированных соединений колонку промывают щелочами, водой, кислотами и вновь водой. Иногда для полного удаления пигментов используют органические растворители или детергенты. Процесс регенерации колонки завершается обработкой стандартным буферным раствором.

Фракционирование смесей Ф, имеющих различный размер молекул, проводят *гель-фильтрацией* на разных типах сефадексов – модифицированных производных линейного полисахарида полидекстрана. Для фракционирования крупномолекулярных смесей применяют поперечно-сшитые акриламиды под названием ультрагелей (фирма LKB, Швеция) и агарозу в поперечно-сшитом состоянии (сефарозы CL 2В, 4В и 6В). В поперечно-сшитых агарозах хроматографический процесс можно осуществить в широком интервале рН и температуры, использовать буферные растворы, содержащие органические растворители, соли. Аналогичными свойствами обладают декстраны, поперечно-сшитые акриламидом сефакрилы: на них можно фракционировать смеси белков с м.м. от  $10^5$  до  $10^7$ .

Наряду с натуральными и полусинтетическими полисахаридными матрицами для гель-фильтрации используют синтетические полиакриламидные гели (биогель Р, акрилекс фирм «Bio Rad Laboratories», США и «Reanal», Венгрия). Большое количество аминогрупп в их структуре придает полимеру гидрофобные свойства, хорошую набухаемость в воде с образованием пористой структуры геля. К синтетическим гелям от-

носят также оксиакрилметакрилатные гели-сфероны (фирма «Lachema», Чехия).

Для гель-хроматографии, в отличие от других методов хроматографического разделения белков, не требуется обессоливать пробу, корректировать рН, не нужны специальные элюирующие буферы. Смесь белков, продвигаясь по сорбенту, освобождается от солей и распределяется в порядке уменьшения м.м. Белки и другие компоненты смеси с сорбентом не взаимодействуют. Из колонки вначале выходят самые крупные молекулы, затем – меньшими м.м. и, наконец, соли.

В большинстве случаев после того, как из сорбента вышли белки и все низкомолекулярные компоненты, колонка пригодна для применения в следующем хроматографическом цикле.

*Аффинная хроматография* характеризуется высокими выходом и степенью очистки выделяемого белка. Основа этого биоспецифического метода состоит в том, что в многокомпонентной смеси между одним или несколькими белками-ферментами и полимерными сорбентами образуется стабильная связь, в результате чего эти белки из раствора переходят на нерастворимый сорбент. Чем меньше белков связывает сорбент, тем выше его селективность (идеальная селективность – связывание одного Ф). Центром связывания служат субстраты, их аналоги, обратимые ингибиторы, коферменты, антитела и другие вещества, называемые лигандами, присоединенные к матрицам. Лиганды специфически взаимодействуют с активными центрами выделяемого Ф. В качестве лигандов используют синтетические аналоги субстратов или коферментов.

Матрицей сорбента, к которой присоединен лиганд, может быть любой полимер, обладающий:

- крупнопористой гелевой структурой, позволяющей крупным молекулам Ф проникать внутрь структуры и взаимодействовать с центрами связывания;
- гидрофильностью структуры, обеспечивающей взаимодействие с водой и отсутствие неспецифического связывания белков по гидрофобным центрам;
- отсутствием в структуре заряженных групп, исключающих образование неспецифических электростатических связей;
- способностью полимера легко активироваться определенными химическими агентами, позволяющими за счет несложных процессов присоединять большое количество лиганда;

- достаточной химической, механической, микробиологической стойкостью, обеспечивающей стабильность во время работы сорбентов.

Указанным требованиям наиболее полно отвечают различными образом модифицированные агарозы; недостаток агароз – нестойкость к воздействию микроорганизмов, малая механическая прочность, высокая стоимость.

Строгая специфичность аффинного сорбента к выделяемому Ф значительно улучшает сам хроматографический процесс, состоящий из последовательно сменяющихся этапов сорбции, удаления несорбированных белков и элюирования сорбированного Ф. Условия сорбции подбираются таким образом, чтобы выделяемый Ф сорбировался наиболее полно, а сопутствующие белки не задерживались. Это зависит от рН, ионной силы, природы буферных растворов, температуры. После отмывки сорбента от несорбированных белков резко изменяется один или нескольких из указанных параметров, в результате разрушается комплекс фермента с сорбентом и Ф высвобождается. Элюирование Ф проводят, добавляя в элюент специфически взаимодействующие с ферментом вещества – субстраты, коферменты, растворимые ингибиторы. Как правило, это повышает эффективность очистки, так как специфические агенты не разрушают неспецифические комплексы между сорбентом и сопутствующими белками.

## 8.2. Иммунизация как путь повышения эффективности и стабильности

Высокая лабильность Ф к различным факторам окружающей среды (значению рН, температуре), быстрая инактивация в организме и выделение из организма, наличие антигенных свойств чужеродных организму белков – в значительной мере могут быть устранены при иммобилизации Ф в иммобилизованном виде.

Иммобилизация Ф – это повышение их стабильности. Существует несколько общепринятых методов иммобилизации Ф, которую проводят в строго асептических условиях, но ни один из существующих методов иммобилизации биологически активных молекул, таких, как Ф, антитела, антигены, не является универсальным.

Самый простой способ иммобилизации Ф – *физический метод (адсорбция на нерастворимом носителе)*. В основе метода лежат действия электростатических сил и сил поверхностного натяжения. Процеду-

ра иммобилизации состоит в смешивании при соответствующих условиях Ф и носителя, инкубации и отделении нерастворимого компонента смеси от растворимого центрифугированием или фильтрованием. Недостаток этого метода – непрочная связь Ф с носителем. Например, адсорбция Ф на носителе ДЭАЭ – сефадекс (диэтиламиноэтил) осуществляется за счёт множественных солевых связей. На такого рода связи влияют даже незначительные изменения рН, ионной силы, температуры и природы растворителя, что может приводить к десорбции фермента с носителя, десорбцию Ф может вызвать даже субстрат. Кроме солевых связей во взаимодействии Ф с носителем могут участвовать и другие слабые силы, например, водородные или ван-дер-ваальсовы.

*Материалы, используемые для адсорбции Ф:* алюминия оксид, бентонит, кальция карбонат, гель кальция фосфата, активированный уголь, целлюлоза, глина белая, коллаген, ионно-обменные смолы, фенольные полимеры, силикагель.

Адсорбция – мягкий метод иммобилизации, который, как правило, слабо влияет на каталитическую активность Ф.

*Иммобилизация Ф с помощью ковалентного связывания* считается мягким методом. Способ основан на образовании химической связи между молекулами Ф и носителя. При этом важно, чтобы аминокислоты, необходимые для проявления каталитической активности Ф, не участвовали в ковалентном связывании с носителем. Способ ковалентной иммобилизации может приводить к снижению ферментативной активности. Инактивацию можно предотвратить, проводя иммобилизацию в присутствии субстрата, защищающего активный центр. Типичные водонерастворимые носители, используемые для ковалентной иммобилизации – агароза (сефароза), целлюлоза, декстран (сефадекс), сополимеры полиакриламида, полиаминоэтирол.

Для ковалентного присоединения требуется предварительная активация носителя. Активированный носитель может реагировать с определёнными группами Ф: α- и ε-аминогруппами остатков лизина, функциональными группами остатков тирозина, гистидина, аргинина, цистеина. Например, носитель сефароза активирована бромцианом, что основано на реакции между бромцианом и гидроксильными группами сефарозы; образующиеся при этом имидокарбонатные группы могут реагировать со свободными аминогруппами Ф.

Для определения количества Ф, иммобилизованного на носителе, измеряют ферментативную активность исходного раствора, который инкубирован с носителем, и активность, остающуюся в растворе после



завершения процесса иммобилизации. Разность между этими активностями соответствует теоретическому или максимальному количеству иммобилизованного Ф.

**Иммобилизация Ф металлохелатным методом.** Для этой цели используют свойства переходных металлов образовывать комплексы. В качестве переходных металлов используют титана хлорид чистый или в кислом растворе, гидроксиды титана, циркония, хрома (их оксиды не токсичны), железа, ванадия, олова. В качестве носителей – производные целлюлозы и силикагели (с соответствующим размером пор), глутаровый альдегид. Гелеобразные гидратированные оксиды металлов образуют с Ф нерастворимые комплексы, обладающие хорошей ферментативной активностью. На полисахаридных носителях, именно целлюлозе, получают препараты иммобилизованных Ф с наиболее высокой активностью.

Например, хелатный комплекс титана хлорида и целлюлозы (D-глюкопиранозы); гидроксильные группы в положении 6 D-глюкопиранозы, взаимодействуя с ионами титана, образуют полимерный хелат. В нейтральном водном растворе между полимером, активированным титана хлоридом, и Ф образуется ковалентная связь; далее смесь должна быть полностью высушена. Температура высушивания избирательна, но она не должна превышать 50 °С; обычно активирование носителя проводят под вакуумом. Связывание Ф с титановыми комплексами полимеров происходит в молекуле Ф по свободным карбоксильным группам кислых аминокислот, фенольным гидроксилам остатков тирозина, спиртовым гидроксильным группам остатков серина и треонина, свободным сульфгидрильным группам остатков цистеина, ε-аминогруппам остатков лизина.

**Иммобилизация клеток и Ф с включением в гель** относится к механическим методам. Гель, в который включают клетки, как правило, состоит из сферических частиц. Включение живых клеток и Ф требует мягких условий иммобилизации, носитель должен представлять систему открытых пор с хорошими условиями для газообмена.

**Включение клеток в полиакриламидный гель.** Полиакриламид (ПАА) – носитель, чаще других используемый для включения Ф, так как он не обладает ионно-обменными свойствами, поэтому при иммобилизации рН-профиль активности Ф практически не меняется. Для удерживания включённых белков с носителем требуется высокая степень сшивки носителя, т.е. полная полимеризация. Важным фактором при этом является удаление кислорода из раствора.

**Включение клеток в гель кальция альгината.** Альгинат – основной структурный полисахарид бурых морских водорослей. Моновалентные катионы полисахарида даже в низких концентрациях образуют вязкий раствор в присутствии двухвалентных катионов, особенно кальция, что способствовало широкому применению альгината для иммобилизации живых клеток. Ионы кальция можно заменить другими двухвалентными катионами, например бария. Важно отсутствие в системе хелатирующих агентов, таких, как фосфаты и цитраты, разрушающие структуру геля, связывая кальций.

**Включение клеток в гели каррагинина.** Каррагинины – гетероциклические полисахариды, содержащие эфиры α-D-галактопиранозил серной кислоты. В водном растворе каррагинин (гель) при добавлении ионов кальция образует нерастворимую фракцию.

**Включение клеток в гели агара.** Препараты клеток, включенных в агар, как и в каррагинин, получают в виде сферических частиц. Иммобилизацию проводят в растворе, нагретом до температуры, при которой агар остаётся жидким. Затем добавляют клетки и смесь охлаждают до образования геля. Как и в случае с каррагинином, клетки должны быть устойчивы к нагреванию при 40 °С. Иммобилизацию проводят в реакторе при непрерывном режиме с перемешиванием или в реакторах, работающих в режиме псевдооживления. В процессе полимеризации геля молекулы Ф связываются на небольших расстояниях и Ф оказывается заключённым внутри ячеек геля. Размеры пор геля должны быть меньше размера молекул Ф, но они не должны препятствовать доступу субстрата к Ф.

**Иммобилизация Ф микрокапсулированием.** Основное при этом виде иммобилизации – удержание раствора, окружающего Ф. Иммобилизуется целиком исходный раствор, содержащий Ф, а не отдельные молекулы Ф. Преимущество микрокапсулирования – большая площадь поверхности, приходящаяся на единицу активности иммобилизованного Ф, позволяющая использовать высокие концентрации Ф в исходном растворе и достигать большей эффективности действия иммобилизованного Ф. Размер микрокапсул составляет десятки или сотни микрон.

Для предотвращения Ф от инактивации с органическими растворителями и мономерами перед микрокапсулированием Ф смешивают с полимерами, способствующими сохранению его активности – бычьим сывороточным альбумином, гемоглобином, ПВП, ПВС, ПЭГ в концен-

трации 1%. Гидрофобные участки полимеров экранируют молекулу Ф, защищая её в процессе микрокапсулирования.

Для образования микросфер в органическом растворителе используют эмульгатор (span-85 в концентрации 0,1%) для покрытия поверхностей капелек водной фазы, что предохраняет Ф от непосредственного контакта с органическим растворителем.

Физические и химические свойства микрокапсулированных Ф зависят от природы полимера, из которого формируется микрокапсула. Полимер должен обладать когезионными свойствами, обеспечивающими образование непрерывной плёнки, быть проницаем для субстрата, инертным по отношению к реакционной смеси. Для получения микрокапсул используют природные и синтетические полимеры – карбоксиметилцеллюлозу, ацетатфталат целлюлозу, нитрат целлюлозы, желатин, эпоксидные смолы, полиуретаны, стирол, полиамиды.

Для микрокапсулирования ферментных систем чаще всего используют коацервацию. Полимерами для коацервации являются – ацетат и нитрат целлюлозы, бутадиеновый каучук.

Микрокапсулирование включает следующие стадии:

- 1) Растворение Ф в буферном растворе, содержащем для защиты Ф от денатурации другие белки, например альбумин.
- 2) Приготовление органической фазы, содержащей эмульгирующий агент, например, span-85. Органическая фаза не должна смешиваться с водой; обычно это эфир, циклогексан, толуол.
- 3) Внесение водного раствора Ф в органическую фазу, перемешивание в течение заданного времени с определённой скоростью; от скорости перемешивания зависит размер микрокапсул.
- 4) Добавление к двухфазной смеси второго органического раствора, содержащего полимер и органический растворитель (перечисленные на второй стадии). При добавлении второго органического раствора происходит образование мелкого коллоида, обусловленное разбавлением органического растворителя.
- 5) Не прекращая перемешивания в условиях вакуума (до 25 мм рт. ст.), отгоняют органический растворитель, при этом происходит дальнейшее осаждение водных микросфер с плотной мембраной. Толщина мембраны зависит от количества полимера, добавленного к органической фазе и времени преципитации.

- 6) Выделение микрокапсул из органической фазы центрифугированием и промывка буферным раствором, содержащим твин-20.

*Включение Ф в липосомы.* Известно, что липосомы – бислойные сферические образования с водной фазой внутри или полислоенные образования, состоящие из нескольких концентрических бислоев с внутренней полостью и размером до 10 нм.

Для получения липосом Ф или другие БАВ в водных растворах подвергают УЗ-обработке в присутствии положительно или отрицательно заряженных фосфолипидов.

В зависимости от физических параметров фосфолипидов (заряда, жидкости, размера) липосомы проникают в клетку эндоцитозом или за счет слияния с природными мембранами. При эндоцитозе фосфолипидная оболочка липосом внутри клеток разрушается фосфолипазами и Ф высвобождаются в цитоплазму; при слиянии с клеточной мембраной фосфолипидный комплекс липосом входит в состав клеточных мембран, активная субстанция поступает в цитоплазму.

Направленность действия липосом может быть изменена за счет состава компонентов, образующих мембрану, сродство липосом к клеткам-мишеням усилено специфическими факторами (антителами и др.).

Таблетки и гранулы ферментных препаратов (трипсина, лизоцима, щелочной фосфотазы, каталазы и др.) получают в смеси с биосовместимыми полимерами (ПАВ, ПВП, ПВС и др.). Имплантированный в очаг поражения или поблизости от него Ф, находящийся в полимере, практически полностью защищён от воздействия агрессивной физиологической среды. Из полимера Ф выходит в нативном состоянии, скорость его последующей инактивации и выведения (как и вызываемые им токсические, аллергические и иммунные реакции) аналогична нативному Ф, применяемому традиционным способом.

Ферментсодержащие препараты с помощью катетеризации вводят непосредственно в мышечную ткань или в капиллярную сеть поражённого органа, иммобилизованные Ф поддерживают там высокую локальную концентрацию.

Иммобилизованные на водорастворимой полисахаридной матрице тромболитические Ф (стрептодеказа, стрептокиназа, целиаза), депонируемые в место расположения тромба методом катетеризации, эффективны в меньшей дозе.

Таблица 6

## Ассортимент некоторых иммобилизованных ферментных препаратов

Наименование препарата	Источник получения	Форма выпуска, способ применения	Фармакологическое действие
1	2	3	4
Стрептодеказа (streptodecasa)	Streptomyces Naemoliticus	Лиофилизированный порошок во флаконах, внутривенно	Фибринолитик
Стрептокиназа (streptokinasa)	- // -	- // -	Тромболитик
Целиаза (celiasa)	- // -	- // -	- // -
Рибонуклеаза (ribonucleasum)	Поджелудочная железа крупнорогатого скота.	Лиофилизированный порошок, внутримышечно, Аэрозоль – местно	Антифлогистик при заболеваниях дыхательных путей
Аспераза (asperasum)	Aspergillus oryzae	2%-я мазь в тубах, местно	Протеолитическое, лизирующее, при гнойно-некротических процессах
Террилитин (terriylitinum)	Aspergillus terricola	Лиофилизированный порошок во флаконах, местно, внутривенно	- // -
терридеказа (terridecasa) модифицированная форма террилитина.	- // -	- // -	Протеолитическое, противовоспалительное, ранозаживляющее
Профезим (profezimum)	Bacillus subtilis.	10%-я взвесь во флаконах, местно	Протеолитическое, некротическое, противоотечное
Альфа-амилаза (alpha-amylasum)	- // -	Таблетки во флаконах, перорально	Регулирующее пищеварение
Ораза (orazum)	Aspergillus oryzae	Гранулы во флаконах, перорально	Протеолитическое, противовоспалительное, регулирующее пищеварение

Продолжение табл. 6

1	2	3	4
Сомилаза (somylasum)	Penicillium solitum, bacillus subtilis	Таблетки во флаконах, перорально	Липолитическое, регулирующее пищеварение
Пенициллиназа (penicillinazum)	Bacillus licheniformis	Лиофилизированный порошок во флаконах, внутримышечно	Острые аллергические реакции, анафилактический шок

## 8.2.3. Иммобилизованные растительные клетки

Известно широкое использование иммобилизованных Ф в качестве стабильных биокатализаторов. Иммобилизованные клетки микроорганизмов способны относительно долго осуществлять характерные для них биохимические процессы. Иммобилизованные клетки бактерий, грибов способны синтезировать соответствующие антибиотики; главное – подбор метода иммобилизации клеток – продуцентов антибиотиков, позволяющего сохранить способность клеток синтезировать большое количество того или иного антибиотика длительное время.

Растительные клетки весьма чувствительны к изменениям окружающей среды, и для их иммобилизации могут быть использованы только наиболее мягкие методы, например включение в гель кальция альгината. С помощью иммобилизации растительных клеток частично или полностью удаётся решить проблемы, связанные с использованием культур растительных тканей для получения сложных органических соединений. Например, иммобилизованные клетки *Digitalis lanata* способны осуществлять 1-2-β-гидроксилирование производного дигоксина с образованием дигитоксина – единственного препарата наперстянки, который используется во всём мире.

Разработана технология получения биологически активных веществ из биомассы растительных клеток, культивируемых в ферментерах различной вместимости суспензионным способом. Созданы коммерческие препараты (женьшень, шиконин и др.) Получен патент на штамм женьшеня ДАН-25.

Иммобилизованные клетки используют при трансформации стероидных соединений; так как некоторые стероидтрансформирующие Ф, особенно гидроксилазы и дегидрогеназы, – весьма лабильные белки. В качестве носителей используют ПАА, ПВС, каррагинины, агар, кальция альгинат.

## Тест-контроль к главе 8

## Выберите правильные ответы:

1. Изoeлектрическая точка – это:
  - А – рН среды, при котором молекула белка не несёт заряда;
  - Б – рН среды, при котором молекула белка несёт максимальный заряд;
  - В – рН среды, при котором фермент имеет максимальную активность;
  - Г – рН среды, при котором фермент теряет активность.
2. Пептидная связь играет ключевую роль в образовании:
  - А – первичной структуры белковой молекулы;
  - Б – вторичной структуры белковой молекулы;
  - В – третичной структуры белковой молекулы;
  - Г – четвертичной структуры белковой молекулы.
3. Витамин РР входит в небелковую часть ферментов:
  - А – НАД зависимых дегидрогеназ;
  - Б – ФАД зависимых дегидрогеназ;
  - В – переаминирования аминокислот;
  - Г – декарбоксилаз.
4. Витамин В<sub>2</sub> входит в небелковую часть ферментов:
  - А – НАД зависимых дегидрогеназ;
  - Б – ФАД зависимых дегидрогеназ;
  - В – переаминирования аминокислот;
  - Г – декарбоксилаз.
5. Преимущество метода микробиологического синтеза ферментов перед получением их из животного сырья:
  - А – доступность сырья;
  - Б – безопасность производства;
  - В – получение рацемата;
  - Г – можно использовать более доступные методы стандартизации.

6. В состав препаратов, применяемых при гнойно-некротических процессах, входят ферменты:
  - А – аминолитические;
  - Б – протеолитические;
  - В – липазы;
  - Г – дегидрогеназы.
7. Для производства ферментов в настоящее время используется метод промышленного культивирования микроорганизмов:
  - А – поверхностное культивирование;
  - Б – глубинное культивирование.
8. Сорбент для гель-фильтрационной очистки белков и ферментов:
  - А – алюминия окись;
  - Б – молселект;
  - В – ионно-обменные смолы;
  - Г – уголь активированный.
9. Механизм гель-фильтрационного метода очистки белков и ферментов основан на:
  - А – сорбционно-десорбционных процессах на активных центрах;
  - Б – различной растворимости веществ в фазах сорбента;
  - В – ионном обмене;
  - Г – «молекулярном ситовании».
10. В процессе выделения из культуральной среды ферментов и их очистки НЕ используется:
  - А – экстракция;
  - Б – сорбционные процессы;
  - В – осаждение (высаливание);
  - Г – перегонка с водяным паром.
11. Выражение, соответствующее понятию «имобилизованные ферменты»:
  - А – ферменты, сохраняющие значительную активность в широком диапазоне рН;
  - Б – ферменты, сохраняющие свою структуру и активность длительное время.

12. Химический метод иммобилизации ферментов:  
 А – образование ковалентных связей между носителем и ферментом;  
 Б – включение фермента в микрокапсулы;  
 В – включение фермента в полимерные гели;  
 Г – включение фермента в волокна полимера.
13. Связь, не участвующая в образовании  $\alpha$ -спирали из первичной структуры белка:  
 А – пептидная связь;  
 Б – водородная связь;  
 В – ионные взаимодействия;  
 Г – ван-дер-ваальсовы взаимодействия.
14. Химическая природа кофермента:  
 А – ионы металлов;  
 Б – витамины;  
 В – нуклеотиды;  
 Г – олигосахариды.
15. Величина аминокислотных остатков, образующих один виток  $\alpha$ -спирали, составляет:  
 А – 0,54 аминокислоты;  
 Б – 5,4 аминокислоты;  
 В – 0,36 аминокислоты;  
 Г – 3,6 аминокислоты.
16. Какая характеристика не относится к растворам белков:  
 А – растворы высокомолекулярных соединений;  
 Б – конус Тиндаля;  
 В – светорассеяние;  
 Г – светопреломление.
17. Гель-фильтрация – это метод:  
 А – высаливания белков;  
 Б – отделения растворителя от раствора;  
 В – определения заряда белка;  
 Г – фракционирования белков.

18. Протеомика характеризует состояние микробного патогена:  
 А – по ферментативной активности;  
 Б – по скорости роста;  
 В – по экспрессии отдельных белков;  
 Г – по нахождению на конкретной стадии ростового цикла.
19. Гены house keeping у патогенного микроорганизма экспрессируются:  
 А – в инфицированном организме хозяина;  
 Б – всегда;  
 В – только на искусственных питательных средах;  
 Г – под влиянием индукторов.
20. Для получения протопластов из клеток грибов используется:  
 А – лизоцим;  
 Б – трипсин;  
 В – «улиточный фермент»;  
 Г – пепсин.
21. Для получения протопластов из бактериальных клеток используется:  
 А – лизоцим;  
 Б – «улиточный фермент»;  
 В – трипсин;  
 Г – пепсин.
22. Выделение и очистка продуктов биосинтеза и оргсинтеза имеют принципиальные отличия на стадиях процесса:  
 А – всех;  
 Б – конечных;  
 В – первых;  
 Г – принципиальных различий нет.
23. Основное преимущество ферментативной биоконверсии стероидов перед химической трансформацией состоит:  
 А – в доступности реагентов;  
 Б – в избирательности воздействия на определённые функциональные группы стероида;  
 В – в сокращении времени процесса;  
 Г – в получении принципиально новых соединений.

24. Фермент лигаза, используемый в генетической инженерии:
- А – скрепляет вектор с оболочкой клетки хозяина;
  - Б – катализирует включение вектора в хромосому клеток хозяина;
  - В – катализирует ковалентное связывание углеводно-фосфорной цепи ДНК-гена с ДНК-вектора;
  - Г – катализирует замыкание пептидных мостиков в пептидогликане клеточной стенки.
25. Иммобилизация индивидуальных ферментов ограничивается:
- А – наличием у фермента кофермента;
  - Б – наличием у фермента субъединиц;
  - В – принадлежностью фермента к гидролазам;
  - Г – каталитической активностью фермента.
26. Иммобилизация целых клеток продуцентов лекарственных веществ нерациональна в случае:
- А – высокой лабильности целевого продукта (лекарственного вещества);
  - Б – использования целевого продукта в инъекционной форме;
  - В – внутриклеточной локализации целевого продукта;
  - Г – высокой гидрофильности целевого продукта.
27. Целями иммобилизации ферментов в биотехнологическом производстве являются:
- А – повышение удельной активности;
  - Б – повышение стабильности;
  - В – расширение субстратного спектра;
  - Г – многократное использование.
28. Целевой белковый продукт локализован внутри иммобилизованной клетки. Добиться его выделения, не нарушая системы, можно:
- А – усилив системы активного выброса;
  - Б – ослабив барьерные функции мембраны;
  - В – присоединив к белку лидерную последовательность от внешнего белка;
  - Г – повысив скорость синтеза белка.

29. Экономическое преимущество биотехнологического производства, основанного на иммобилизованных биообъектах, перед традиционным обусловлено:
- А – меньшими затратами труда;
  - Б – более дешёвым сырьём;
  - В – многократным использованием биообъекта;
  - Г – ускорением производственного процесса.
30. Термин «мультиферментный комплекс» означает:
- А – комплекс ферментных белков, выделяемый из клетки путём экстракции и осаждения;
  - Б – комплекс ферментных клеточных мембран;
  - В – комплекс ферментов, катализирующих синтез первичного или вторичного метаболита;
  - Г – комплекс экзо- и эндопротеаз.

## Глава 9. ПРЕПАРАТЫ НОРМОФЛОРЫ

### 9.1. Характеристика нормофлоры человека

Микрофлора человека составляет основу его микроэкологии, организм человека населяют примерно 500 видов бактерий, не считая вирусов, простейших, а также грибов. Нормальную флору принято рассматривать как совокупность микробиоценозов различных частей тела, контактирующих с внешней средой. Совокупность микробиоценозов обозначается как нормобиоценоз или зубиоз. Для здорового человека характерно состояние равновесия микроэкологии организма. В организме человека проживает  $10^{14}$ – $10^{16}$  бактерий, т.е. бактериальных клеток значительно больше, чем клеток самого организма. Они составляют своеобразный «экстракорпоральный» (хорошо организованный) орган. Этот «орган», как и любой орган человека, имеет свои функции, критерии, показатели функционального состояния, т.е. нормы и отклонения от нее.

Велика защитная роль нормофлоры в обеспечении здоровья, поэтому нарушение равновесия между отдельными видами микроорганизмов в местах их постоянного обитания за счет более интенсивного размножения или гибели какого-либо вида может повлечь нарушение гомеостаза с соответствующими последствиями патологического характера. Дисбиотические состояния приводят к изменениям количественного и качественного состава нормофлоры человека.

Микроорганизмы индигенные (постоянные) и транзиторные (случайные), с которыми человек встречается в течение жизни, можно условно разделить на 4 группы:

- 1) микроорганизмы, не способные к длительному пребыванию в организме человека, нахождение которых в нем носит случайный характер;
- 2) постоянные представители микрофлоры, приносящие несомненную пользу (бифидо-, лакто- и колибактерии);
- 3) условно-патогенные представители нормофлоры, которые при определенных условиях могут стать патогенными (стафилококки);
- 4) микроорганизмы – возбудители инфекционных заболеваний.

Рассматривая микрофлору желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) даже практически здорового человека, нельзя говорить об абсолютной норме. В табл. 7 приведены данные примерного состава микрофлоры кишечника в колониеобразующих единицах (КОЕ) на 1 г фекалий.

Таблица 7

Содержание микрофлоры кишечника в норме  
(по С.Н. Барзашка-Поповой)

Наименование микроорганизмов	КОЕ на 1 г фекалий
Бифидобактерии	$10^8$ – $10^{10}$
Лактобактерии	$10^6$ – $10^9$
Бактероиды	$10^7$ – $10^9$
Пептококки и пептострептококки	$10^5$ – $10^6$
Эшерихии	$10^6$ – $10^8$
Стафилококки гемолитические	Не более $10^3$
Стафилококки негемолитические	$10^4$ – $10^5$
Стрептококки	$10^2$ – $10^7$
Клостридии	$10^3$ – $10^5$
Зубактерии	$10^9$ – $10^{10}$
Дрожжеподобные грибы	Не более $10^3$
Условно-патогенные энтеробактерии	Не более $10^3$ – $10^4$

Нормальная микрофлора кишечника в процессе эволюции приобрела исключительно важную роль в формировании колонизационной резистентности организма. Одним из главных механизмов защиты от колонизации условно-патогенными и патогенными бактериями является присутствие в организме достаточного количества собственной полезной микрофлоры, к которой, в первую очередь, относятся *лакто- и бифидобактерии*. Молочнокислые бактерии (*Lactobacteriatae*) относятся к грампозитивным истинным бактериям, имеющим округлую форму (*Streptococcus*, *Diplococcus*) или палочковидную (*Lactocobacterium*) форму. Молочнокислые кокки и многие бактерии располагаются в виде коротких или длинных цепочек. Те и другие не образуют спор, неподвижны, анаэробны.

Молочнокислые бактерии в кишечнике человека занимают одно из ведущих мест по своей численности среди других представителей бактериальной флоры. Бесспорно, что эти микроорганизмы играют первостепенную роль в симбиотических взаимоотношениях нормальной микрофлоры кишечника с макроорганизмом.

В процессе сбраживания сахара одни молочнокислые бактерии образуют в качестве главного продукта молочную кислоту. Поэтому их называют *гомоферментными (одноферментными)*, другие – *гетероферментными*, продуцирующими в качестве основных продуктов молочную и уксусную кислоты, этанол, двуокись углерода и некоторые летучие вещества типа эфиров. Гомоферментативные бактерии включают *S. lactis*, *S. cremoris*, *Lactobacterium casei*, *L. lactus* и др. К гетероферментным относят ароматообразующие бактерии (*S. citrovorus*, *S. acetonicus*), а также представителей бактерий из групп *Betabacterium*, *Coli-aerogenes* и некоторые другие (*S. faecalis*, *S. bovis* и др.).

Имеются молочнокислые бактерии, развивающиеся при оптимальной температуре 25–35 °С (мезофилы), *S. lactis*, *S. foveis*, *L. Casei*, ароматообразующие бактерии; при 40–45 °С (термофилы) – *L. lactis*, *L. helveticum*.

Нормальная микрофлора кишечника выполняет и регулирует многие функции организма, которые можно уподобить работе лаборатории, осуществляющей многие сотни биохимических процессов. Биомасса микробов, заселяющих кишечник взрослого человека, составляет 2,5–3 кг. В процессе их жизнедеятельности образуются органические кислоты, снижающие рН среды толстой кишки до 5,3–5,8, лизоцим и другие антибиотикоподобные вещества, обуславливающие антагонистическую активность этих бактерий по отношению к патогенной, гнилостной и газообразующей микрофлоре. В результате значительно снижается хроническое отравление организма продуктами гнилостного распада в кишечнике (индол, фенол, скатол). Представители нормофлоры в кишечнике конкурируют с патогенной флорой за аргинин, аспарагиновую кислоту, серин, за область обитания – экологические ниши. Таким образом, бифидо- и лактобактерии регулируют количественный и качественный состав нормальной микрофлоры кишечника, *сдерживая рост и размножение в нем патогенных и условно-патогенных микробов*.

Важна *ферментпродуцирующая роль* микрофлоры кишечника, имеющая большое значение в процессах пищеварения и метаболизма. Бактериальные протеазы гидролизуют белки и пептиды, последние под действием бактериальных гидролизуются до аминокислот и пептидных остатков. Одним из свойств нормофлоры является метаболизм азот- и углеродсодержащих соединений за счет микробных ферментов. Метаболизм мочевины в кишечнике происходит за счет микробных уреаз. Микрофлора кишечника участвует в деградации липидов и в их синтезе. Нормальная микрофлора принимает участие в рециркуляции желч-

ных кислот и активно влияет на холестериновый и билирубиновый метаболизм. Бифидо- и лактобактерии, бактероиды, зубактерии способствуют всасыванию кальция, витамина Д, железа.

Эшерихии, бифидо-, лакто- и зубактерии выполняют *витаминообразующую функцию* (участвуют в синтезе и всасывании витаминов К, группы В, тиамин, биотин, цианкобаламина, фолиевой и никотиновой кислот). Кроме того, они способствуют синтезу незаменимых аминокислот, лучшему усвоению солей кальция, витамина Д. Метаболиты бифидо- и лактобактерий препятствуют микробному декарбоксилированию пищевого гистидина и повышению количества гистамина, т.е. обладают антианемическим, антирахитическим, антиаллергическим действием. Лактобактерии образуют молочную кислоту, продуцируют лизоцим, лизин, ацидофилин и др. Кишечная палочка способствует синтезу иммуноглобулинов, что препятствует развитию инфекции, вырабатывает канцеролитические вещества.

Большое значение имеет *продуцирование анаэробами биологически-активных соединений* – летучих жирных кислот, принимающих участие в рециркуляции и абсорбции ионов натрия, калия, кальция, магния, цинка, хлора, воды. Кишечная нормофлора способна разлагать белки до конечных продуктов распада (индол, фенол, скатол), утилизировать непереваренные пищевые субстраты, образуя органические кислоты, аминокислоты и другие соединения, которые нормализуют обмен веществ в организме. Микрофлора кишечника, в конечном счете, поддерживает водный, электролитный и кислотно-щелочной балансы организма.

Нормальная микрофлора кишечника играет важную роль в *формировании и функционировании иммунной системы*. В экспериментах на животных установлено, что пероральное введение бифидо- и лактобактерий повышает устойчивость к различным инфекциям, что дает возможность говорить об иммунопотенцирующей способности зубиотиков. Иммуностимулирующий эффект под воздействием нормофлоры проявляется усилением фагоцитарной активности макрофагов, моноцитов, синтезом цитокинов, стимуляцией клеточных иммунных механизмов защиты.

Нормальная микрофлора *способствует пролиферации плазматических клеток*. Бифидобактерии стимулируют синтез антител, лактобактерии повышают активность фагоцитов и лимфоцитов. Бактериальные модулины бифидо- и лактобактерий стимулируют лимфоидный аппарат, синтез иммуноглобулинов, интерферона, увеличивают уровень пропердина и комплемента, повышают активность лизоцима, способст-



вуют уменьшению проницаемости сосудисто-тканевых барьеров для токсичных продуктов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, препятствуют транслокации бактерий во внутренние органы и кровь, уменьшают воспалительные процессы слизистой кишечника.

Анаэробные бактерии *вырабатывают БАВ*, как  $\beta$ -аланин, 5-аминовалериановая и  $\gamma$ -аминоасляная кислоты, а также медиаторы, влияющие на функцию ЖКТ, печени, сердечно-сосудистой системы, кровообразование и обменные процессы. Продукты жизнедеятельности нормальной микрофлоры кишечника (в том числе пропеонозные бактерии) оказывают регулирующее действие на вегетативную нервную систему. Как «естественный биосорбент» нормальная микрофлора способна аккумулировать значительное количество различных токсических продуктов, включая металлы, фенолы, яды растительного и микробного происхождения, другие ксенобиотики. Деятельность нормальной микрофлоры кишечника делает организм менее зависимым от окружающей среды.

Положительными функциями нормальной микрофлоры кишечника являются:

1. Колонизационная резистентность;
2. Синтетическая функция – способность бактерий продуцировать витамины, гормоны, антибиотики;
3. Поддержание высокого уровня содержания лизоцима, секреторных иммуномодулинов, интерферона, важных для иммунологической резистентности;
4. Детоксикация экзогенных и эндогенных субстратов и метаболитов;
5. Обменная функция – участие бактерий в метаболизме белков, углеводов, липидов, нуклеиновых кислот, солей, желчных кислот и других жизненно важных веществ;
6. Пищеварительная – морфокинетическое влияние на слизистые оболочки, абсорбцию абиотических компонентов, транзит нутриентов, газовый состав, мышечный тонус кишечника, перистальтику кишечника, эвакуацию кишечного содержимого.

Защитные и физиологические функции нормальной микрофлоры кишечника в условиях нормобиоценоза указаны в табл. 8.

При определенных условиях микрофлора человека может оказать неблагоприятное влияние на жизнедеятельность и состояние организма человека. Возможно возникновение гнойно-воспалительных реакций, сенсibilизации организма со многими клиническими проявлениями

аллергического порядка, формирование в организме банка плазмид и генов с проявлениями мутагенной и антимутагенной активности.

Таблица 8  
Функции нормальной микрофлоры (нормобиоценоза)

Функция	→	Механизм реализации
Колонизационная резистентность	→	Межмикробный антагонизм, активация иммунной системы
Детоксикационная	→	Гидролиз продуктов метаболизма белков, липидов, углеводов и т.д.
Синтетическая	→	Синтез витаминов, гормонов, антибиотических и других веществ
Пищеварительная	→	Усиление физиологической активности ЖКТ

## 9.2. Дисбактериоз. Причины возникновения, профилактика и лечение

Факторы, ведущие к нарушениям в состоянии нормофлоры, весьма многочисленны. Возможно, в связи с этим почти 90% населения нашей страны, в той или иной мере, страдает *дисбактериозами, т.е. микроэкологическими нарушениями*. Наиболее распространен дисбактериоз кишечника (в англоязычной литературе принят термин «синдром бактериального разрастания», bacterial overgrowth). Наиболее распространен дисбактериоз кишечника, причинами которого могут быть тяжелые болезни, интоксикации, нерациональное питание, нарушения в иммунной системе и, особенно часто, бесконтрольное и необоснованное применение антибиотиков и других антимикробных препаратов. Дисбактериоз может служить причиной возникновения колитов, холециститов, диатеза, нейродермита, анемии, псориаза, грибковых поражений слизистых, аллергии.

Тактика лечения зависит от степени выраженности дисбактериоза и предполагает, как правило, комплексный подход, включающий:

- устранение избыточного бактериального обсеменения тонкой кишки, восстановление нормальной микробной флоры;
- улучшение кишечного пищеварения и всасывания;
- восстановление нормальной моторики кишечника;
- стимуляция реактивности организма.

В профилактике и лечении дисбактериозов показано применение биопрепаратов нормальной микрофлоры кишечника, т.е. **зубиотиков (пробиотиков)** – препаратов нормальной микрофлоры человека. Термин «пробиотики» впервые ввели в научную литературу в 1965 г. Lilley и Stillwell для обозначения соединений микробного происхождения, которые, в отличие от антибиотиков, не убивали, а стимулировали рост микроорганизмов. Пробиотики (зубиотики) имеют в своем составе живые клетки специально подобранных штаммов микроорганизмов растительного или животного происхождения; они выживают в условиях кишечного окружения, непатогенны, нетоксичны, стабильны в течение длительного срока хранения. Механизм положительного влияния пробиотиков включает:

- подавление микробных патогенов за счет продукции антибактериальных веществ, конкуренции за лимитируемые питательные вещества и сайты адгезии на кишечной стенке;
- влияние на ферментативную активность кишечных микроорганизмов;
- стимуляцию иммунной системы макроорганизма.

Препаратами этой группы являются бифидумбактерин, бификол, бифиформ, лактобактерин, бактисубтил, линекс, энтерол и др. Весьма перспективно создание с помощью генной инженерии рекомбинантных пробиотиков, характеризующихся одновременно антибактериальными и антивирусными свойствами.

**Пребиотиками** принято считать пищевые добавки, селективно-стимулирующие рост и размножение так называемых дружественных человеку бактерий. Это низкомолекулярные углеводы (фруктозо-олигосахариды, инулин, лактулоза и др.), которые не должны подвергаться гидролизу пищеварительными ферментами.

**Симбиотики** – комплексные препараты, содержащие пробиотик и пребиотик.

Возможен еще один способ устранения дисбактериоза – воздействие на патогенную микробную флору продуктами метаболизма нормальных микроорганизмов. К таким препаратам относится хилак форте, представляющий собой стерильный концентрат продуктов обмена веществ нормальной микрофлоры кишечника: молочной кислоты, лактозы, аминокислот и жирных кислот. Эти вещества способствуют восстановлению в кишечнике биологической среды, необходимой для существования нормальной микрофлоры, и подавляют рост патогенных бактерий.

Возможно, продукты метаболизма улучшают трофику и функцию эпителиоцитов и колоноцитов.

### 9.3. Производство препаратов нормофлоры

Необходимым условием массового производства препаратов зубиотиков является сохранение их стабильности в течение длительного времени. Бактерийные препараты, содержащие живые микроорганизмы, относятся к наименее стойким, их активность снижается за счет гибели клеток. Микроорганизмы, имея низкий уровень биологической организации, сохраняют жизнеспособность практически при полной потере воды, при этом в них *обратимо* замедляются или прекращаются обменные процессы. Для увеличения сроков жизнеспособности бактерий показана сублимационная сушка, проходящая в условиях низкой температуры и глубокого вакуума (незначительной концентрации кислорода).

По причине гигроскопичности укупорку сухих биопрепаратов проводят под вакуумом или в токе инертного газа.

К факторам, оказывающим влияние на выживаемость микроорганизмов в препаратах сухих зубиотиков при хранении, следует отнести:

- регламентированное содержание остаточной влаги;
- наличие защитных сред;
- хранение сухих препаратов в атмосфере, не содержащей кислород.

В целях защиты зубиотиков от кислой среды желудка на таблетированные и капсулированные формы наносят ацидорезистентные покрытия или проводят иммобилизацию бактерий на сорбенте.

Производство должно быть организовано в соответствии с ГОСТ Р 52249-2004 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств (good manufacturing practice for medicinal products (GMP))».

#### Общая схема технологического процесса производства пробиотиков

1. Подготовка производственных помещений, оборудования, посуды, персонала, вентиляционной системы – проводят в соответствии с требованиями инструкций, регламентирующих условия работы со стерильными лекарственными средствами.
2. Подготовка и стерилизация сред (концентрированной, производственной и защитной среды высушивания). Предварительные работы включают:

- качественный подбор необходимых для данной культуры веществ;
  - оценку влияния отдельных компонентов на выход целевого продукта;
  - нахождение оптимального соотношения составляющих и удешевление сред.
3. Выращивание маточных (до 6 пассажей) и производственных культур. Вначале выращивают маточную культуру из специального штамма при температуре 370 °С, используя различные питательные среды. Производственную культуру выращивают методом глубинного культивирования в реакторах, установленных в боксах. Реакторы оснащены магнитной мешалкой и паровой рубашкой.
  4. Розлив жидкого полуфабриката во флаконы. Розлив микробной суспензии в ампулы и флаконы проводят на аппаратах розлива и запайки ампул. Заполненные ампулы и флаконы поступают на сублимацию.
  5. Сублимационная сушка. Ампулы помещают в морозильные камеры под углом 750°. Содержимое ампул замораживают при температуре -400 °С, выдерживают при этой температуре 18–24 ч, подвергая сублимации.
  6. Укупорка. Ампулы с сухой микробной массой запаивают (флаконы укупоривают) с газовой защитой.
  7. Маркировка, упаковка. Ампулы маркируют и упаковывают в пачки по 10 штук.
  8. Контроль качества готовой лекарственной формы.

### *Частная технология препаратов нормофлоры*

**Лактобактерин.** Для производства лактобактерина применяют штамм лактобактерий *Lactobacillus plantarum*, который относится к роду *Lactobacillus*. Лактобактерии представляют собой грамположительные палочки длиной 0,7–3,0 мкм. Растут в атмосфере CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>.

Лактобактерин сухой (*Lactobacterium siccum*) получают по общей схеме для бактериальных препаратов.

#### *1. Приготовление и стерилизация питательных сред:*

- 1.1. Приготовление гидролизованного молока (к прокипяченному обезжиренному молоку с рН 7,7±0,1 добавляют панкреатин и хлоро-

форм, выдерживают при 40±2 °С 72 ч, затем фильтруют, разводят вдвое водой для инъекций, разливают в бутылки и стерилизуют).

- 1.2. Приготовление дрожжевого аутолизата (хлебопекарные дрожжи разводят в бутылках водой для инъекций и стерилизуют).
- 1.3. Приготовление среды МРС (к гидролизованному молоку добавляют дрожжевой аутолизат и навески следующих веществ: марганца и магния сернокислого, аммония лимоннокислого, глюкозы и др.).
- 1.4. Приготовление гидролизата казеина (в реакторе готовят раствор казеина, устанавливают необходимое значение рН, добавляют хлороформ, выдерживают пять суток при 45 °С, затем фильтруют в бутылки и стерилизуют).
- 1.5. Приготовление казеиново-дрожжевой среды.
- 1.6. Приготовление защитных сред высушивания (желатин, сахароза, молоко, натрий лимоннокислый и вода).

#### *2. Получение маточной культуры*

(6 пассажей в пробирках, чашках Петри, флаконах и бутылках – в течение 9 суток).

#### *3. Выращивание производственной культуры*

(в реакторах с жидкой питательной средой в течение 8–12 ч при 370 °С; в 1 мл микробной суспензии производственного штамма должно быть не менее 6 млрд живых микробных клеток; к полученной микробной суспензии добавляют защитные среды высушивания – сахарозно-желатозную или обрат молока).

#### *4. Розлив лактобактерина в ампулы*

(доза зависит от концентрации живых микробных клеток).

#### *5. Лиофильная (сублимационная) сушка:*

- 5.1. Замораживание ампул с лактобактерином, расположенных наклонно под углом 75°, в течение 18–24 ч в холодильной камере до минус 40 °С;
- 5.2. Лиофилизация (сублимирование) – сушка в условиях глубокого вакуума, длительность сублимации 68–70 ч.

#### *6. Запайка ампул*

(в режиме газовой защиты – в атмосфере азота).

#### *7. Контроль качества:*

- 7.1. *Описание:* кристалльная или пористая масса желтовато-белого цвета, кисло-молочного запаха и вкуса. Определяют органолептически.

- 7.2. *Подлинность* определяется наличием характерных морфологических, культуральных и биохимических свойств в производственных штаммах лактобацилл.
- 7.3. *Показатель рН* растворенного препарата должен составлять  $5,5 \pm 0,5$ .
- 7.4. *Остаточная влажность* лактобактерина в ампулах или флаконах не должна превышать 3,5%, в таблетках 5%.
- 7.5. *Растворимость*. Сухой препарат должен растворяться в воде, очищенной и добавленной из расчета 1 мл на 1 дозу, в течение 5 мин образовывать гомогенную взвесь, желтовато-бежевого цвета. Определяют визуально.
- 7.6 *Бактериальная контаминация* проверяется бактериоскопически и бактериологически.

Бактериоскопически – путем просмотра мазков, приготовленных из взвеси растворенного препарата и окрашенных по Граму. В мазках должны быть клетки, характерные для лактобацилл (грамположительные).

Бактериологически – путем посева на питательные среды и инкубации в течение 2-х суток не должно содержаться колоний. Если обнаружили рост хотя бы в одной пробирке или чашке, производят повторный посев удвоенного количества образцов.

В случаях повторного роста серию препарата бракуют. Препарат сухой не должен быть контаминирован посторонней микрофлорой. Препарат в таблетках не должен содержать патогенных и условно-патогенных микроорганизмов; допускается наличие микробов сапрофитов в количестве не более 300 на 1 таблетку.

- 7.7. *Специфическая безвредность*. Препарат должен быть безвредным для белых мышей при введении его внутрь в количестве одной дозы. Наблюдение за мышами осуществляется в течение 5 суток. В случае гибели за этот срок хотя бы одной мыши контроль повторяют на удвоенном количестве животных. Если мыши не погибли, препарат считают выдержавшим испытание; в противном случае данную серию препарата бракуют.
- 7.8. *Специфическая активность*. По количеству жизнеспособных клеток лактобацилл в 1 дозе препарата и активностью кислотообразования.
- 7.8.1. Определение количества живых лактобацилл в 1 дозе. Для определения количества живых лактобацилл в одной дозе пре-

парата от каждой серии испытывают не менее 3-х образцов. Содержимое флакона после разведений высевают по 0,1 мл микробной суспензии на 4 чашки Петри. После 44 ч инкубации при  $t = 37^\circ\text{C}$  производят подсчет выросших колоний и вычисляют содержание живых бактерий в 1 дозе препарата.

- 7.8.2. Определение активности кислотообразования проводят титриметрическим методом при выращивании бифидобактерий в модифицированной печеночной среде. Каждую пробу титруют раствором натрия гидроксида 0,1 моль/л в присутствии индикатора фенолфталеина до появления слабо-розового окрашивания. В одной дозе препарата (1 таблетка) при выпуске должно содержаться не менее  $2 \cdot 10^9$  живых лактобацилл. Показатель активности кислотообразования лактобактерина, выраженный в градусах Тернера (ТО), должен быть не менее 200.

- 7.9. *Определение компонентов стабилизирующей среды* высушивания и других веществ, входящих в состав препарата.

#### 8. Маркировка и упаковка

При производстве таблеток лактобактерина микробную суспензию сушат в кассетах. Сухую микробную массу (СММ) протирают через металлическое сито в бутылки с азотом. Таблеточную массу готовят в шаровой мельнице с добавлением к СММ вспомогательных веществ (лактозы, азросила, кальция стеарата). В таблеточной массе определяют количество живых лактобактерий и рассчитывают массу таблетки. Таблетирование ведут методом прямого прессования в асептических условиях при строгом соблюдении влажности воздуха (не более 50% при  $18^\circ\text{C}$ ). Таблетки передают на фасовку во флаконы. Препарат должен находиться в вакууме, атмосфере азота или стерильного воздуха. С целью защиты бактериальных препаратов от агрессивной кислой среды желудка создаются таблетки с ацидорезистентным покрытием, капсулированные формы, иммобилизованные на сорбенте бактерии. Предприняты попытки создания микрокапсулированных форм пробиотиков.

Продолжительность процесса производства лактобактерина в ампулах и таблетках составляет соответственно 42 и 66 суток.

Хранят препарат в сухом, темном месте при  $T = 5 \pm 3^\circ\text{C}$ .

Срок годности 12 и 6 месяцев. Срок годности равен 12 месяцам, если в одной дозе при выпуске содержится 4 млрд и более живых лакто-

бацилл; 6 – при содержании от 2 до 3,9 млрд. К концу срока годности должно содержаться 1 млрд живых лактобацилл.

#### 9.4. Номенклатура препаратов нормофлоры

Последние годы характеризуются бурным увеличением количества пробиотиков за счет как модернизации и улучшения свойств старых препаратов, так и появления новых, в том числе поликомпонентных, содержащих новые штаммы микроорганизмов, а также различные биологически активные вещества. Это позволило классифицировать группу пробиотиков на несколько составляющих ее подгрупп:

1. *Монокомпонентные*. Бифидосодержащие (бифидумбактерин, состоящий из штаммов вида *B.breve*, бифидин, содержащий штаммы вида *B.adolescentis* М-42). Лактосодержащие (биобактон, состоящий из ацидофильных лактобактерий). Препараты из апатогенных представителей рода *bacillus* (споробактерин).
2. *Поликомпонентные*. Бифилонг, ацилак, аципол, биоспорин, линекс – 3-компонентный препарат из ацидофильных лактобактерий, бифидобактерий инфантис и фекального стрептококка. Бифилак, бификол, бифиформ, бифилонг, ацепол, ацелак, линекс.
3. *Комбинированные*. Бифидумбактерин форте, кипацид – лактобактерии и комплексный иммуноглобулин, препарат с лизоцимом – бифилиз, биофлор жидкий с экстрактом сои, овощей и прополиса.
4. *Иммобилизованные на сорбенте бактерии* – бифидумбактерин форте.  
*Бифидо- и лактосодержащие пищевые продукты* – бифилакт, бифидок и др.

*Бактисубтил (Bactisubtile)* – препарат на основе устойчивых к действию желудочного сока спор бактерий, прорастание которых происходит в кишечнике. Вегетативные формы бактерий высвобождают энзимы, расщепляющие углеводы, жиры, белки; в результате образуется кислая среда, угнетающая процессы гниения. Препарат препятствует нарушению синтеза в кишечнике витаминов группы В и Р. Форма выпуска – капсулы.

*Бифидумбактерин в порошке (Bifidum bacterium in pulveris)* представляет собой лиофилизированную микробную массу живых антагонистически активных штаммов *Bifidumbacterium bifidum*. Обладает антибактериальной активностью в отношении широкого спектра патогенных и условнопатогенных бактерий, восстанавливает микрофлору кишечни-

ка, нормализует деятельность ЖКТ, обладает иммунорегулирующими свойствами. Назначают при дисбактериозе у детей и взрослых. Выпускается в виде таблеток, во флаконах, пакетах и ампулах.

*Бификол сухой (Bificolium siccum)* представляет собой микробную массу живых антагонистически активных штаммов *Bifidobacterium bifidum* и *E. coli*. Применяется для лечения больных хроническими колитами разной этиологии на фоне дисбактериоза у детей и взрослых. Форма выпуска – флаконы и таблетки.

*Бифилиз (Bifilyz)* в 1 мл содержит 5 млн живых бифидобактерий, органические кислоты, легкоусвояемый белок, лизоцим. Показан при острых кишечных заболеваниях вируснобактериальной природы.

*Бифилонг сухой (Bifilong siccum)* представляет собой микробную массу живых антагонистически активных двух штаммов *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium longum*. В виде лиофилизата выпускается в ампулах и флаконах. Применяется для лечения острых и хронических заболеваний кишечника, профилактики и лечения дисбактериоза у детей и взрослых.

*Биовестин* – экологически чистая эмульсия живых бифидумбактерий (активнее сухого бифидумбактерина). Назначают при диатезах и иммунодефицитах с первых дней жизни.

*Лактобактерин в порошке (Lactobacterium in pulvis)* – сухая микробная масса живых антагонистически активных двух штаммов *Lactobacterium acidophilus*. Форма выпуска – ампулы.

*Аципол сухой* содержит штаммы *Lactobacterium acidophilus* и полисахарида кефирных грибков. Рекомендован детям с первых дней жизни и взрослым для коррекции дисбиотических изменений в кишечнике.

*Линекс (Linex)* содержит *Lactobacterium acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *E. faecalis*. Поддерживает физиологическое равновесие кишечной микрофлоры.

*Калибактерин сухой* – лиофилизированная микробная масса живых бактерий *E. coli*. Применяется для лечения детей и взрослых, страдающих хроническим колитом. Форма выпуска – флаконы, ампулы и таблетки.

*Споробактерин сухой* – микробная масса живых бактерий *Bacillus subtilis*. Применяется для лечения хирургических инфекций мягких тканей, остеомиелита, дисбактериозов. Выпускается в виде лиофилизированной массы в ампулах.

*Энтерол 250 (Enterol-250)* применяется в качестве активного компонента, содержит лиофилизированные дрожжи *Saccharomyces*

boulardii, механизм действия которых принципиально отличается от механизма действия других бактериальных препаратов. *Saccharomyces boulardii*, обладают генетически обусловленной устойчивостью к антибиотикам и поэтому при проведении антибактериальной терапии сохраняют свою активность. Они не колонизируют пищеварительный тракт, клетки дрожжей элиминируются с калом в течение нескольких дней после завершения курса терапии. Таким образом, *Saccharomyces boulardii* действуют как «временная» кишечная микрофлора, способная сохранять или восстанавливать равновесие экосистемы кишечника.

**Концентрат «Наринэ»** – лиофилизированная в среде культивирования микробная масса живого штамма *Lactobacillus acidophilus* новорожденных детей Армении с добавлением защитной среды сахаро-желатино-молочной. Препарат выпускается в виде порошка кремового цвета, кисломолочного вкуса, во флаконах и пакетах.

#### **Пребиотики**

**Лактулоза (Lactulose)** – синтетический дисахарид. Под влиянием препарата увеличивается количество лактобактерий, что приводит к повышению кислотности в просвете толстого кишечника; наряду с этим увеличивается объем каловых масс и проявляется слабительный эффект без влияния на слизистую оболочку и гладкую мускулатуру кишечника. Лактулоза уменьшает образование и всасывание азотсодержащих токсичных веществ в проксимальном отделе толстого кишечника, не уменьшает абсорбцию витаминов, не вызывает привыкания. Форма выпуска – сироп, состоящий из лактулозы, галактозы, лактозы.

**Пантотенат кальция.** Утилизируется бифидобактериями и способствует увеличению их массы.

**Памба** (парааминобензойная кислота). Способствует росту бифидо- и лактобактерий, кишечных палочек.

**Хилак-форте** – концентрат метаболизма бактерий. Способствует восстановлению нормофлоры.

**Нормазе (лактюлоза)** – синтетический дисахарид. Понижает рН в толстом кишечнике, снижает концентрацию гнилостных бактерий, стимулирует перистальтику и рост бифидобактерий.

**Лизоцим (Lysocim)** – мукополисахаридаза, фермент белковой природы. Препарат оказывает бактериолитическое действие, разрушает полисахариды микробной клетки, подавляет рост грамположительных бактерий, стимулирует неспецифическую реактивность организма, оказывает противовоспалительное и муколитическое действие.

## Тест-контроль к главе 9

### **Выберите правильные ответы:**

1. Микроорганизмы, с которыми человек встречается в течение жизни:
  - А – транзиторные, не способные к длительному пребыванию в организме;
  - Б – приносящие несомненную пользу;
  - В – условно-патогенные;
  - Г – возбудители инфекционных заболеваний.
2. К положительным функциям нормофлоры кишечника человека относится все, КРОМЕ:
  - А – межмикробного антагонизма и активации иммунной системы;
  - Б – синтетической и детоксикационной;
  - В – обменной;
  - Г – концентрирования и задержки в организме ксенобиотиков;
  - Д – пищеварительной.
3. К причинам, вызывающим дисбактериоз, относятся:
  - А – использование в рационе пищевых волокон;
  - Б – иммунные нарушения, соматические и инфекционные болезни;
  - В – нарушение питания и медикаментозное воздействие;
  - Г – использование в пищу молочнокислых продуктов.
4. Эубиотики (пробиотики) – это:
  - А – убитые микроорганизмы;
  - Б – живые, специально подобранные микроорганизмы;
  - В – ферментные препараты, улучшающие пищеварение;
  - Г – пищевая добавка.
5. Микроорганизмы, используемые для создания эубиотиков, должны обладать:
  - А – устойчивостью к антибиотикам;
  - Б – антагонистической активностью;
  - В – адгезивными свойствами;
  - Г – достаточной скоростью роста.

6. Для препаратов нормофлоры общим является:

- А – способ изготовления;
- Б – парентеральный способ введения;
- В – условия производства;
- Г – биологическая активность.

7. Препараты эубиотиков выпускают в виде:

- А – таблеток;
- Б – жидких форм (реже);
- В – лиофилизированной массы в ампулах и флаконах;
- Г – порошков в пакетах (сошечках).

8. Длительность (в сутках) процесса производства лактобактерина в ампулах составляет:

- А – 2;
- Б – 5;
- В – 7;
- Г – 42.

9. Лиофильная сушка – это:

- А – сушка из замороженного состояния под вакуумом;
- Б – сушка при атмосферном давлении;
- Г – сушка с помощью адсорбентов.

10. Основоположник бактериотерапии, выдвинувший идею коррекции флоры кишечника, с помощью молока, сквашенного ацидофильными бактериями:

- А – И.И. Мечников;
- Б – С. Ганеман;
- В – Д.И. Менделеев;
- Г – Л.К. Михалева.

## Глава 10. БИОПРЕПАРАТЫ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

### 10.1. Культура изолированных клеток, тканей и органов растений

Культура клеток, тканей и органов растений представляет собой части растений, выращиваемые в асептических условиях на искусственных питательных средах, и включает:

- каллусные культуры на гелеобразной (твердой) питательной среде,
- суспензионные культуры клеток в жидкой питательной среде,
- культуру протопластов,
- изолированные органы растений.

Первые попытки культивировать изолированные клетки и ткани растений были предприняты в конце XIX в. известными немецкими учеными Г. Габерландтом, Х. Фёхтингом и С. Рехингером. Они пытались выращивать *in vitro* небольшие кусочки тканей растений, помещая их на влажную поверхность фильтра в растворе сахарозы. По аналогии с культурами животного происхождения, где использовались питательные среды природного происхождения (плазма крови, зародышевая жидкость), физиологи растений пытались выращивать клеточную массу, используя соки и экстракты растений. Первые опыты оказались не совсем удачными, поскольку транспорт и превращение питательных веществ у целого растения и изолированных растительных клеток существенно отличается. Лишь к началу 20-х гг. прошлого века ученые отказались от использования природных сред неопределенного состава в пользу синтетических сбалансированных сред. Основой послужили среды, используемые для выращивания целых растений.

Описанный период может считаться лишь предысторией метода культуры тканей и клеток растений. Настоящее развитие этого метода началось с работ Филиппа Уайта в США и Роже Готре во Франции. В результате их исследований в 30-х гг. XX столетия было установлено, что изолированные органы, ткани и клетки растений могут расти в культуре *in vitro* неограниченно долго при пассировании (пересадках) их на свежую питательную среду при определенных условиях. Многие

ткани, введенные ими в культуру, существуют в пассированной культуре по настоящее время.

Культура клеток и тканей лекарственных растений – сравнительно молодая отрасль науки. Впервые культуру тканей лекарственного растения, а именно барвинка розового, получил Уайт в 1945 г. В 1947 г. в лаборатории Готре была получена культура ткани белены черной и показана ее способность вырабатывать соответствующие алкалоиды. В конце 50-х гг. XX в. был разработан метод массового выращивания клеток и тканей глубинным способом в жидких питательных средах.

В СССР первые лаборатории по исследованию культур изолированных тканей и клеток лекарственных растений были открыты на базе Института физиологии растений АН СССР под руководством членкорр. АН СССР Р.Г. Бутенко, в Ленинградском химико-фармацевтическом институте, во Всесоюзном институте лекарственных растений и в Томском медицинском институте (ТМИ). В ТМИ лаборатория была организована при кафедре фармакогнозии и ботаники под руководством профессора Л.Н. Березнеговской.

С культурами изолированных тканей и клеток работают по разным направлениям почти во всех странах Европы, в том числе и в России, а также Северной и Южной Америке, Азии, особенно в Китае, Индии, Японии.

## 10.2. Особенности культивирования изолированных клеток и тканей растений

Изолированные ткани и клетки растений могут успешно расти только при отсутствии конкуренции с микроорганизмами. Все работы по культивированию растительных объектов необходимо производить в асептических условиях. Если в состав питательной среды входят термолабильные вещества, их фильтруют через мембранные стерилизующие фильтры и добавляют в простерилизованную среду, охлажденную до 30–40 °С.

Изолированные фрагменты растения (экспланты), помещаемые на питательную среду, легко поражаются микроорганизмами, поэтому их также необходимо стерилизовать. Предварительно часть растения, из которой будет извлечен эксплант, промывают несколько раз водой очищенной. Затем растительный материал стерилизуют в растворах дезинфицирующих веществ, несколько раз промывают водой и стериль-

ным скальпелем удаляют наружные поврежденные слои клеток. Небольшие кусочки эксплантата помещают на поверхность питательной среды с гелеобразующим компонентом. Клетки изолированных растительных тканей могут делиться и давать начало длительно растущей недифференцированной массе, называемой каллусом.

В настоящее время изолированные клетки и ткани культивируют на многокомпонентных питательных средах, которые отличаются по своему составу в зависимости от вида культуры. В состав всех питательных сред обязательно входят необходимые растению макроэлементы. Лучшей формой азотного питания являются нитраты (калия или аммония), в некоторых случаях дополнительно используются аминокислоты. Кроме азотистых соединений необходимы фосфор, сера, кальций, сульфаты. Отсутствие в питательной среде микроэлементов уже в первом пассаже (пересадке) может уменьшить интенсивность роста тканей на 30–40%, а при последующих – гибель тканей. В зависимости от вида изолированной культуры могут в небольших количествах использоваться: железо, бор, цинк, марганец, медь, алюминий, никель, йод и др.

Для успешного роста культур необходимы также источники углерода, поскольку даже зеленеющие, выращиваемые на свету ткани неаутоτροφны. Лучшим источником углеводного питания является сахароза, используемая обычно в концентрации 2–5%. Реже используется глюкоза или другие сахара.

Большинство тканей, культивируемых *in vitro*, способны к синтезу всех нужных для их жизнедеятельности витаминов, если все питательные элементы присутствуют в средах. Однако большинство культур синтезируют витамины в субминимальных количествах, поэтому дополнительное внесение витаминов в среду также способствует росту клеток, особенно это относится к витаминам группы В. Чаще используют витамины В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, а также кальция пантотенат, биотин, кислоты: аскорбиновую, никотиновую, фолиевую.

Обязательными компонентами питательных сред должны быть фитогормоны. К ним относятся ауксины, регулирующие рост и дифференцировку клеток и цитокинины, индуцирующие клеточное деление. Природный ауксин в растении представлен в основном в виде β-индолил-3-уксусной кислоты (ИУК). Для практических целей чаще применяют не ИУК, а синтетические ауксины (α-нафтил-1-уксусная кислота (НУК), 2,4-дихлорфеноксисукусная кислота (2,4-Д), фенилуксусная кислота (ФУК), фенилмасляная кислота (ФМК) и др.) В отличие



от природных ауксинов эти соединения не разрушаются ИУК-оксидазой в клетках растений.

В качестве источников цитокининов в средах используют кинетин, зеатин, 6-бензиламинопурин и др. Действие цитокининов проявляется прежде всего в ускорении клеточных делений, что опосредуется усилением синтеза ДНК, РНК, белков, а также в дифференцировке клеток. В состав некоторых сред входит ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или ее натриевая соль, которые улучшают усвоение клетками железа.

На рост и развитие растительных тканей и клеток *in vitro* большое влияние оказывают физические факторы: свет, температура, аэрация, влажность воздуха. Большинство изолированных культур выращиваются в темноте. При необходимости они могут расти и на свету, образуя хлорофилл, но при этом проявляют низкую способность к фотосинтезу. В некоторых случаях свет может использоваться как фактор, обеспечивающий морфогенез или активизирующий процесс синтеза биологически активных веществ. Для освещения чаще используют люминесцентные лампы с интенсивностью светового потока 1000–1500 люкс. Оптимальная температура для успешного роста большинства культур составляет 25–27 °С; для индукции их морфогенеза требуются более низкие температуры (18–25 °С). Влажность в помещении, где растут культуры, должна составлять 60–70%. Интенсивная аэрация требуется при культивировании клеток в больших объемах с использованием жидких питательных сред. Аэрацию биомассы клеток осуществляют барботированием стерильным воздухом. При выращивании клеток в малых объемах (колбах) аэрация достигается постоянным перемешиванием суспензий клеток с помощью качалок различной конструкции.

### 10.3. Методы культивирования изолированных клеток и тканей

#### *Твердофазный способ культивирования. Каллусные культуры*

При этом способе культивирования используются так называемые твердые питательные среды, содержащие гелеобразующий компонент, чаще всего агар-агар как наиболее близкий по природе субстрат растительного происхождения. Такая среда имеет вид плотного геля, и каллусные клетки находятся на ее поверхности.

Для получения каллусных культур небольшие фрагменты тканей разных органов высших растений помещают на поверхность питательной среды (пробирки, колбы). Через 4–6 недель культивирования экс-

планта образуется первичный каллус (масса недифференцированных клеток), который необходимо разделить и перенести на свежую питательную среду. Каллусная ткань, выросшая на твердой питательной среде, имеет рыхлую аморфную структуру в виде массы тонкостенных клеток белого или желтоватого цвета. Качественный химический состав каллусной ткани обычно незначительно отличается от соответствующего интактного растения.

Твердофазный способ культивирования чаще используется в лабораторных условиях для первичного получения изолированных растительных культур, предварительной оценки культур в качестве возможных продуцентов БАВ, а также для выращивания посевного материала. За 4–6 недель среда истощается, что определяет необходимость производить пересев. В противном случае ткани могут погибнуть.

Высшие растения состоят из множества дифференцированных клеток с различными функциями: клетки зеленой ткани листа создают органические вещества в результате фотосинтеза, клетки корня поглощают из почвы минеральные вещества и подают их в другие части растения и т.д. Но все дифференцированные клетки образовались от одной оплодотворенной яйцеклетки материнского растения – зиготы. Эта клетка содержит в себе всю генетическую основу целого растения. Из нее образуются специализированные ткани, различные по химизму происходящих в них процессов, форме и структуре. Клетка (зигота) является родоначальником целого растения, она тотипотентна, т.е. многофункциональна. Кроме зиготы тотипотентность в природных условиях могут проявлять и специализированные клетки. Пример тому – вегетативное размножение черенками, от листа и др. Тотипотентность реализуется также при травмах растений. На раневой поверхности в результате неорганизованной пролиферации клеток происходит образование нароста – каллуса, способствующего заживлению ран (от лат. *callus* – мозоль, толстая кожа).

При образовании каллуса в культуре *in vitro* происходит неорганизованный рост клеток и их дедифференциация, т.е. потеря первоначальных функций, свойственных ткани или органу, из которых был получен каллус. Клетки как бы обезличиваются, их функции практически одинаковы и существуют за счет питательной среды. Однако при изменении условий культивирования можно вызвать вторичную дифференциацию и получить целое растение. По сравнению с клетками животных и человека растительные клетки обладают большим преимуществом. Они способны в определенных условиях и на соответствующих

питательных средах регенерировать целое растение. Решающую роль во вторичном образовании органов (корней и почек) из изолированных клеток и тканей играет соотношение фитогормонов (ауксинов и цитокининов) и их концентрация в питательной среде.

Как бы долго ни выращивались клетки в изолированной культуре, они твердо «помнят» свое происхождение: клетки моркови образуют зародыш целого растения моркови, клетки катарантуса розового – также соответствующее растение и т.д. Культивируемые клетки высших растений – это уникальная клеточная популяция, в которой каждая клетка представляет собой отдельный организм, способный к автономному развитию. При регулярном пассировании способность клеток к делению и росту может поддерживаться очень долго. Есть ткани, которые поддерживаются в культуре *in vitro* по 60–70 лет.

#### **Глубинное суспензионное культивирование**

Для посева в жидкую питательную среду необходимо получить посевной материал в виде суспензии клеток. Поэтому первичная каллусная ткань, которая используется в качестве посевного материала, должна быть более рыхлой и легко фрагментироваться на отдельные клетки. Для отделения крупных агрегатов клеточную массу перед пересевом фильтруют через нейлоновые или металлические сита. При пересевах на 100 мл среды используют 2–3 г свежей каллусной ткани.

В лабораторных условиях для культивирования тканей в жидких питательных средах обычно используют колбы емкостью 100–500 мл с небольшим объемом питательной среды. Сосуды с суспензией клеток помещают на качалки с частотой вращения 100–120 об/мин. В таких условиях обеспечивается аэрация тканей и нарастающая масса клеточных агрегатов распадается на отдельные фрагменты.

Необходимо отметить, что растительные клетки растут и размножаются значительно медленнее, чем клетки животных или микроорганизмов, время их удвоения составляет 1–3 суток. Поэтому даже при суспензионном культивировании стационарная фаза роста клеток, при которой культура достигает максимума сухой биомассы, наблюдается обычно через 2–3 недели. Истощение питательной среды и накопление продуктов жизнедеятельности клеток определяют необходимость обновления культуральной среды или посева культуры на свежую питательную среду.

В промышленных условиях используется метод непрерывного культивирования в ферментерах (биореакторах) различной конструкции,

имеющих конструктивные особенности, которые учитывают специфику растительных клеток. Метод основан на поддержании баланса между разбавлением среды и удалением части суспензии.

Если в культуральную систему периодически добавлять свежую среду, то деление клеток может поддерживаться неограниченно долго. Это послужило основой для создания систем, позволяющих осуществлять непрерывное культивирование.

Культуральные системы, функционирующие непрерывно, разделяют на полупроточные и проточные. При полупроточном режиме выращивания через определенные интервалы времени производится отбор части суспензии и разбавление оставшейся части суспензии свежей средой. Культивирование в ферментерах такого типа может продолжаться несколько месяцев.

Проточный режим культивирования позволяет осуществлять непрерывное снабжение культуральной системы свежей питательной средой с одновременным удалением равного объема клеточной суспензии. В таком режиме автоматизированные ферментеры могут функционировать в течение нескольких лет.

Глубинное культивирование в ферментерах имеет ряд преимуществ по сравнению с твердофазным статическим способом:

- автоматически поддерживаются все необходимые параметры: температура, рН среды, степень аэрации, скорость работы мешалки и пр.;
- постоянный контроль содержания в культуральной среде основных элементов питания;
- культуральная система периодически пополняется свежей питательной средой;
- постоянно осуществляется микробиологический контроль с целью предотвращения инфицирования и гибели культур;
- контроль активности роста и деления клеток;
- контроль образования БАВ.

Необходимо отметить, что для получения БАВ может использоваться не только биомасса клеток, но и культуральная среда. В некоторых случаях получают штаммы и клеточные линии, почти полностью выделяющие БАВ в культуральную среду, что значительно облегчает процесс их выделения из такого специфического вида сырья.

### Культура протопластов

Протопласт – это клетка, лишенная оболочки. Такая «голая» клетка потенциально способна восстанавливать новую оболочку, делиться, образовывать клеточные агрегаты, из которых можно получить клеточную культуру с новыми свойствами, а затем новое растение – регенерант. Отсутствие клеточной стенки облегчает проведение различных генетических манипуляций, связанных с реконструированием генома, а также дает возможность получать популяции гибридных клеток в результате слияния протопластов.

Существует два способа разрушения клеточной оболочки – механический и ферментативный. Последний менее травматичен для клеток и чаще используется.

Для получения протопластов растительный материал (например, суспензия клеток мезофилла листа или суспензия культуры изолированных клеток) обрабатывается препаратами пектиназ и целлюлаз или более сложными смесями ферментов. Для получения суспензии клеток целого растения предпочтительнее использовать листья стерильных растений, культивируемых *in vitro*, поскольку при получении «голых» протопластов также необходимо соблюдать стерильность.

После разрушения клеточных стенок суспензию протопластов очищают от остатков клеток и тканей фильтрованием, смесь ферментов удаляют центрифугированием с последующим промыванием в культуральной среде. После очистки протопласты ресуспендируют в питательной (культуральной) среде. Изолированные протопласты широко используются в качестве модельных систем в физиологических, цитологических, фитопатологических и других экспериментах, а также генно-инженерных манипуляциях.

В настоящее время разработаны способы получения новых гибридов в результате слияния изолированных протопластов различных растений. Поскольку поверхности протопластов имеют отрицательный заряд, то для их соединения необходимо его нейтрализовать. Для индукции слияния протопласты обрабатывают полиэтиленгликолем. Частота слияния протопластов может быть увеличена добавлением декстрана, поливинола или под влиянием электрического поля. После слияния происходит регенерация клеточной стенки. Она образуется менее чем за сутки, после чего клетки начинают делиться. При слиянии протопластов разных родительских растений образуются новые клетки, из кото-

рых через культуру каллуса можно регенерировать новое растение с заданными свойствами.

В результате слияния протопластов возникают два вида новых клеток:

- гомокарионы (гомокариоциды), состоящие из клеток одного родителя;
- гетерокарионы (гетерокариоциды), состоящие из клеток обоих родителей.

Больший интерес представляют гетерокарионы, которые после слияния отбирают микроскопически. Для отбора исходные протопласты окрашивают флуоресцентными красителями различных цветов. Если происходит слияние протопластов мезофилла листа (зеленые) и культуры изолированных клеток (бесцветные), то получают гетерокарионы, состоящие из бесхлорофильных и хлорофиллосодержащих зон, что позволяет вести отбор без предварительного окрашивания.

В результате объединения растительных геномов (ядер и цитоплазмы) формируются новые комбинации генов, которые практически невозможно получить обычными методами селекции. Метод позволяет скрещивать представителей разных видов и родов растений и широко используется при выведении новых сортов пицевых, декоративных, технических, а также лекарственных растений.

Слиянием протопластов получен гибрид томата и картофеля – «томофель», гибриды некоторых лекарственных растений: дурмана индийского и белладонны, скополии гималайской и белладонны, гибрид двух видов дурмана, содержащий на 25% больше тропановых алкалоидов, чем родительское растение.

### Микроклональное размножение (культура органов растений)

Культуры клеток и тканей для массового размножения растений и оздоровления посадочного материала, в том числе лекарственных растений, нашли широкое применение в растениеводстве. Этот метод, названный **микроклональным размножением**, позволяет от одной меристемы получить (регенерировать) достаточно большое количество новых растений, в том числе и в культуре *in vitro*.

Обязательным условием для микроклонального размножения является идентичность полученного растительного материала исходному материнскому растению. Для обеспечения максимальной генетической стабильности клонируемого материала в качестве исходного экспланта используют молодые слабодифференцированные ткани, в частности

кончики молодых стеблей и корней, пазушные почки, зародыши, части молодых проростков и другие меристематические ткани. Культуры клеток, полученные из меристематических тканей, дают возможность получить безвирусные клоны. Распределение вирусов в различных частях растения неравномерное, а меристема, как правило, их лишена.

Восстановление целого растения с помощью изолированных культур может происходить разными путями.

Прямая регенерация – это получение растений «в пробирке» непосредственно из верхушечных побегов, пазушных почек и т.д.

Косвенная регенерация – получение целых растений из меристематических тканей, но с промежуточной стадией каллуса. В обоих случаях дифференциация и органогенез управляется фитогормонами. Выросшее в пробирке растение переносится в грунт.

Следует подчеркнуть, что такой своеобразный способ вегетативного размножения основан на свойстве тотипотентности растительных клеток. Это по сути – клонирование растений. В отличие от клонирования животных, которое очень активно обсуждается лишь последнее десятилетие, метод микроклонального размножения растений используется уже более 40 лет. Впервые этот метод успешно применил французский исследователь Ж. Морель в 1960 г. для размножения орхидей. Из одного безвирусного экспланта ему удалось в течение года получить около 4 млн новых растений, свободных от вирусной инфекции. Метод клонального микроразмножения может использоваться для создания элитного и суперэлитного посадочного материала.

Основное преимущество метода микроклонального размножения, по сравнению с другими классическими методами, – значительно более высокий коэффициент размножения. Если обычным способом (черенками, луковицами, корневищами и т.д.) от одного растения можно получить от 2–3 до 100 растений в год, то методом микроклонального размножения их число можно увеличить от нескольких тысяч до миллиона.

К настоящему времени показана возможность клонировать «в пробирке» около тысячи видов растений. Более чем у ста видов этот метод имеет коммерческое значение. Среди них – декоративные, плодовые, овощные, древесные, а также некоторые лекарственные растения.

Метод культуры тканей и клеток успешно используется для выведения новых сортов, в том числе и высокопродуктивных лекарственных растений. Для создания нового сорта классическим способом в грунте

требовалось 10–30 лет. Благодаря методу культуры тканей этот период можно сократить до нескольких месяцев, поскольку сезонность значения не имеет.

#### 10.4. Культура растительных клеток как источник лекарственных веществ

Природные запасы лекарственных растений уменьшаются, а синтез БАВ либо не осуществлен, либо нерентабелен. Поэтому технология получения биомассы на основе культуры клеток приобретает большое значение для производства лекарственных средств.

Преимущества использования клеточных культур заключаются в следующем:

- решается проблема дефицита исходного сырья, особенно ценных исчезающих видов, не поддающихся плантационному культивированию;
- возможно получение фитомассы, полностью свободной от гербицидов, пестицидов, тяжелых металлов и др.;
- имеется возможность получения новых веществ, не синтезируемых соответствующим целевым растением;
- возможно управление биосинтезом целевых продуктов за счет условий культивирования, состава питательной среды и другими способами;
- имеется возможность индустриализации и удешевления производства некоторых БАВ, синтез которых пока не разработан или очень дорог.

Вместе с тем, развитие производства БАВ из изолированных клеточных культур в промышленных масштабах сдерживается рядом причин. Некоторые культуры изолированных клеток и тканей либо не синтезируют БАВ, характерные для соответствующего целого растения, либо вырабатывают их значительно меньше. В сравнении с микроорганизмами растительные клетки растут значительно медленнее, время их удвоения в среднем в 20 раз больше, чем клеток микроорганизмов. Вследствие длительности производства высок риск инфекций и гибели культур. Кроме того, большие объемы суспензионных культур растительных клеток состоят как из единичных клеток, так и агрегатов различного размера, которые не идентичны, что усложняет процесс производства БАВ. Вторичные метаболиты многих растительных культур не выделяются в питательную среду, что создает трудности их экстрагиро-

вания. Из-за больших размеров растительные клетки очень чувствительны к перемешиванию и снабжению кислородом. Себестоимость производства лекарственных средств на основе культуры изолированных растительных клеток достаточно высока. Промышленный выпуск такой продукции рентабелен лишь для особо ценных БАВ, стоимость которых на мировом рынке очень высока, сырье мало доступно, синтез пока не осуществлен и продуктивность культур достаточно высока.

В настоящее время получено более 30 видов различных изолированных клеточных культур лекарственных растений, продуцирующих БАВ либо на уровне соответствующего интактного растения, либо в большем количестве.

Первый отечественный биопродукт из культуры изолированных клеток – настойка «Биоженьшень» – разработан в лаборатории культуры тканей Института физиологии растений РАН, под руководством Р.Г. Бутенко. Препарат получен на основе высокопродуктивного клеточного штамма культуры клеток женьшеня и используется для изготовления лосьонов, кремов, а также тонизирующих напитков. Комплекс гинзенозидов (сапонинов женьшеня), выделяемый из культуры тканей, предлагается в качестве противосудорожного средства.

Культивируемые *in vitro* клетки раувольфии змеиной являются перспективным источником гипотензивных и противоаритмических индольных алкалоидов. Методами клеточной селекции с использованием химических мутагенов и оптимизации условий выращивания получен высокопродуктивный штамм, накапливающий противоаритмический алкалоид аймалин, содержание которого составляет около 50% от суммы алкалоидов, синтезируемых культурой.

Получены изолированные клеточные культуры из различных видов барбариса, а также василисника малого. Суспензионная клеточная культура василисника малого продуцирует берберин – растительный антибиотик и противоопухолевое средство, при этом более 80% синтезируемых тканями алкалоидов секретируются в культуральную жидкость. В Японии налажено биотехнологическое производство противоопухолевого алкалоида берберина из культуры клеток коптиса японского, а также производство нафтохинонового пигмента шиконина – природного антибиотика широкого спектра действия из культуры клеток Воробейника. На основе шиконина российские ученые разработали мазь «Эритромин», которая обладает антимикробной активностью в отношении антибиотико-резистентных микроорганизмов, многих патогенных бактерий, а также грибов.

Перспектива использования культуры тканей тиса обыкновенного связана с возможностью получения таксола – вещества, обладающего противоопухолевой активностью. Для лечения одного больного в течение года требуется 120–130 г сухой коры нативного растения, сырьевые запасы которого истощаются. Национальный институт рака США выделил около 1 млн долларов для разработки экономически целесообразного способа получения таксола из культуры клеток.

Активно продолжаются работы с культурой клеток барвинка розового, продуцирующего противораковые алкалоиды. Стоимость субстанции Винкристина на мировом рынке достигает 30 тыс. долларов за 1 кг, Винбластин – около 20 тыс. за кг.

В Германии разработали способ получения кислоты розмариновой из культуры клеток каллуса. Кислота розмариновая – вещество, обладающее противоопухолевой активностью, и природный антибиотик широкого спектра действия. Из культуры клеток табака получен убихинон 10. На основе убихинона получают препарат для лечения инсультов и купирования спастических процессов.

## Тест-контроль к главе 10

**Выберите правильные ответы:**

1. Культуры клеток и тканей лекарственных растений впервые получены:  
А – в начале XX в.;  
Б – в середине XX в.;  
В – в конце XX в.
2. Оптимальные условия культивирования изолированных тканей и клеток растений:  
А –  $t = 10-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , относительная влажность воздуха 30–40%;  
Б –  $t = 25-27\text{ }^{\circ}\text{C}$ , влажность 60–70%;  
В –  $t = 35-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , влажность 80–90%.
3. Практическое значение культур изолированных тканей и клеток растений:  
А – объект для цитологии генетики;  
Б – «оздоровление» сортов ценных культурных растений;  
В – создание «банков» видов растений;  
Г – быстрое клональное размножение растений;  
Д – получение ценных БАВ;  
Е – все вышеперечисленное.
4. Дополните: Способность изолированной растительной клетки перейти к выполнению программы развития, в результате которого из культивируемой соматической клетки возникает целое растение, называют...
5. Питательные среды для выращивания изолированных тканей и клеток стерилизуют:  
А – бактерицидными облучателями;  
Б – использованием консервантов;  
В – паром под давлением;  
Г – фильтрованием через мембранные фильтры;  
Д – всеми вышеперечисленными методами.
6. В качестве «твердых» носителей для каллусных культур используют:  
А – гели коллагена;  
Б – гели желатина;  
В – гели агар-агара;  
Г – все вышеперечисленное.

7. Методы селекции, используемые в культуре тканей и клеток растений:  
А – протопластирование;  
Б – физические и химические методы;  
В – спонтанные мутации;  
Г – все вышеперечисленное.
8. Стерилизация растительных объектов, впервые вводимых в культуру *in vitro*, производится:  
А – текучим паром при  $t = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  
Б – паром под давлением  $t = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  
В – бактерицидными облучателями;  
Г – обработкой дезинфицирующими средствами;  
Д – всеми вышеперечисленными методами.
9. Технологический воздух для аэрации изолированных растительных клеток стерилизуют:  
А – бактерицидными облучателями;  
Б – нагреванием;  
В – фильтрованием;  
Г – используют антисептики.
10. Преимущество растительного сырья, получаемого при выращивании культур клеток, перед сырьем из плантационных или дикорастущих растений:  
А – меньшая стоимость;  
Б – большая концентрация целевого продукта;  
В – стандартность;  
Г – более простое извлечение целевого продукта.
11. Ауксины – термин, под которым объединяются специфические гормоны (стимуляторы роста):  
А – растительных тканей;  
Б – животных тканей;  
В – зубактерий;  
Г – актиномицетов.
12. «Голые» протопласты – это:  
А – каллусная культура;  
Б – клеточная суспензия в жидкой питательной среде;  
В – клетки, лишенные оболочек;  
Г – зародыши.

13. Гибриды, образованные при слиянии протопластов разных материнских клеток, называются:

- А – гомокарионы;
- Б – гетерокарионы;
- В – зиготы;
- Г – мутанты.

14. Наиболее щадящий способ получения изолированных протопластов:

- А – воздействие электрического тока;
- Б – магнитное облучение;
- В – механическое воздействие;
- Г – использование смеси ферментов.

15. Для получения изолированных протопластов из растительных клеток используют ферменты:

- А – лизоцим;
- Б – трипсин;
- В – пектиназу;
- Г – целлюлазу.

16. Полиэтиленгликоль, вносимый в суспензию протопластов:

- А – предотвращает их слияние;
- Б – способствует их слиянию;
- В – предотвращает микробную контаминацию;
- Г – исполняет роль консерванта.

17. Дополните: дифференциация клеток и органогенез при регенерации целых растений из изолированных растительных клеток регулируется...

## Глава 11. БИОДЕГРАДАЦИЯ ТОКСИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ И УТИЛИЗАЦИЯ БИОМАССЫ

Еще сравнительно недавно ни у кого не возникало сомнений, что окружающая среда – земля, воздух, вода – всегда будут эффективно перерабатывать бытовые, промышленные, сельскохозяйственные отходы. Человечество столкнулось с двумя фундаментальными проблемами – переработкой отходов, постоянно образующихся в огромном количестве, и разрушением токсических соединений, десятилетиями накапливающихся в воде, почве, на свалках. Отходы сжигают, обрабатывают химикатами, но это лишь усугубляет загрязнение окружающей среды и, к тому же, дорого обходится. Разные страны пытаются решить эти проблемы законодательным путем, однако успеха здесь нет. В условиях НТП экосфера испытывает мощное антропогенное воздействие, в результате нарушается природная гармония, сложившаяся тысячелетиями, происходят заметные сдвиги в экосистемах, приводящие к исчезновению целых видов животных и растений, возникают новые формы микроорганизмов, нарушаются иммунные реакции человека.

В настоящее время проходят проверку многие технологические, в том числе биотехнологические приемы, с помощью которых возможно перерабатывать большие количества отходов и токсических веществ. Правительства многих стран поощряют предприятия, перерабатывающие отходы производства, повторно использующие содержащиеся в них полезные вещества.

Термин «биodeградация» относится к процессу разрушения загрязняющих веществ, попавших в окружающую среду, с помощью живых микроорганизмов. Термин «биомасса» – к совокупности веществ и материалов, побочных продуктов пищевой, перерабатывающей промышленности, ранее считавшихся отходами, ставших сырьем для производства ряда экономически важных продуктов.

В середине 1960-х гг. были обнаружены почвенные микроорганизмы, способные деградировать ксенобиотики (гербициды, пестициды, хладагенты, органические растворители и т.д.). Основную группу почвенных микроорганизмов, разрушающую ксенобиотики, составляют бактерии рода *Pseudomonas*, разные штаммы которых способны расщеплять более 100 органических соединений.

В биодegradации сложной органической молекулы обычно участвуют несколько разных ферментов. Гены, кодирующие такие энзимы, могут иметь хромосомную локализацию, но чаще всего входят в состав крупных плазмид, иногда локализируются и в хромосомной, и в плазмидной ДНК.

Бактерии, разрушающие *негалогенированные ароматические соединения*, как правило, превращают их в катехол или протокатехоат. Затем, в ходе нескольких реакций окислительного расщепления, – в ацетил-CoA и сукцинат или пируват и ацетальдегид, последние метаболизируют практически все микроорганизмы.

*Галогенированные ароматические соединения*, основные компоненты большинства пестицидов, гербицидов, с помощью этих же ферментов разрушаются до катехола, протокатехоата, гидрохинона или их галогенированных производных; причем скорость их деградации обратно пропорциональна числу атомов галогена в исходном соединении. Дегалогенирование (отщепление замещенного атома галогена от органической молекулы) необходимо для детоксикации соединения. Дегалогенирование осуществляется по ходу неспецифической диоксигеназной реакции замещением галогена в бензольном кольце на гидроксильную группу.

### 11.1. Метаболические пути биодegradации ксенобиотиков, созданных методом генной инженерии

Ряд микроорганизмов обладает природной способностью к деградации различных ксенобиотиков, однако:

- ни один из них не может разрушать все органические соединения;
- некоторые органические соединения при высокой концентрации подавляют функционирование или рост микроорганизмов, их деградирующих;
- большинство очагов загрязнения содержат смесь химикатов; микроорганизм, способный разрушать один или несколько компонентов этих смесей, может инактивироваться другими компонентами;
- многие неполярные соединения адсорбируются частицами почвы и становятся менее доступными;
- биодegradация органических соединений происходит довольно медленно.

Часть этих проблем решает конъюгированный перенос плазмид в один рецепиентный штамм. Если две плазмиды содержат гомологичные участки, между ними может произойти рекомбинация с образованием гибридной плазмиды, которая имеет больший размер и обладает свойствами исходных плазмид. Если две плазмиды не содержат гомологичных участков и относятся к разным группам несовместимости, они могут сосуществовать в одной бактерии.

В 1970 г. был создан первый бактериальный штамм, обладающий более широкими катаболическими возможностями. Он расщеплял большинство углеводов нефти и был назван «супербациллой». Для его получения использовали плазмиды, каждая из которых кодировала фермент, расщепляющий определенный класс углеводов (рис. 22).

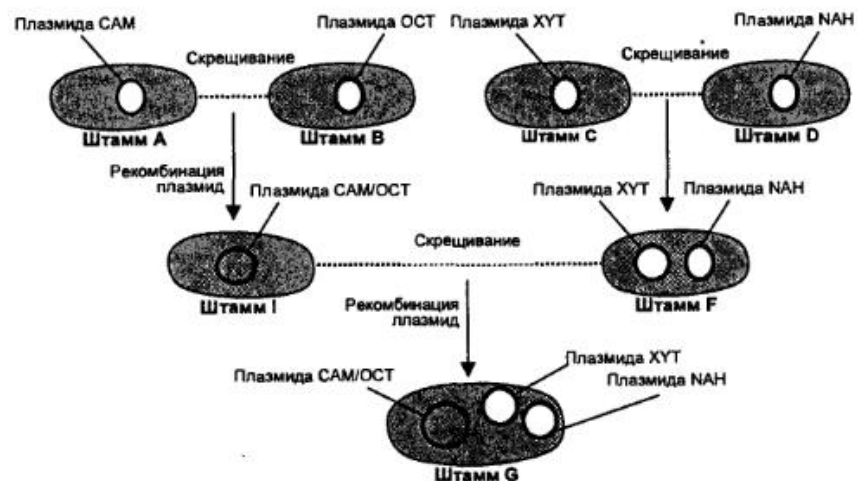


Рис. 22. Создание бактериального штамма, способного разрушать камфару, октан, ксилол и нафталин. Штамм А, несущий плазмиду САМ (она детерминирует разрушение камфары), скрещивают со штаммом В, несущим плазмиду ОСТ (разрушение октана). При этом образуется штамм Е, который содержит гибридную плазмиду, образовавшуюся в результате гомологичной рекомбинации между исходными плазмидами и обладающую функциями каждой из них. Штамм С, содержащий плазмиду ХУЛ (разрушение ксилосола), скрещивают со штаммом D, содержащим плазмиду НАН (разрушение нафталина), и получают штамм F, который несет обе эти плазмиды. Наконец, скрещивают штаммы Е и F, в результате чего образуется штамм G, содержащий плазмиды САМ/ОСТ, ХУЛ и НАН (по Б. Глику, Дж. Пастернаку)



Конъюгацией была перенесена плаزمида САМ в штамм, несущий плазмиду ОСТ. Эти плазмиды несовместимы (не могут существовать в одной клетке в виде отдельных плазмид), но в результате произошедшей между ними рекомбинации образовалась одна плаزمид, объединяющая их функции. Затем плазмиду NАН перенесли в штамм, несущий плазмиду XVЛ; эти плазмиды совместимы и могут сосуществовать в одной клетке-хозяине. Наконец, гибридную плазмиду перенесли в штамм, несущий плазмиды NАН и XVЛ. В результате этих манипуляций получили штамм, растущий на неочищенной нефти лучше исходных штаммов, взятых по отдельности или вместе. Этот штамм не использовали для ликвидации нефтяных загрязнений, но он сыграл важную роль в становлении биотехнологической промышленности. Изобретатель «супербациллы» получил патент США, описывающий структуру данного штамма и возможности его применения. Это был первый патент на создание генетически модифицированного микроорганизма.

Большинство разрушающих ксенобиотики бактерий, модифицированных переносом плазмид, являются мезофилами. Вода загрязненных рек, озер обычно имеет низкий диапазон температур, поэтому была создана бактерия, обладающая более широкими катаболическими возможностями, способная расти и развиваться при более низких температурах. Для этой цели плазмиду ТОЛ (детерминирует разрушение толуола) методом конъюгации перенесли в психрофильный штамм *Pseudomonas putida*, утилизирующий салицилат при температуре 0 °С. Трансформированный штамм содержал введенную в него плазмиду ТОЛ и собственную плазмиду SAL, детерминирующую при 0 °С разрушение салицилата и толуола как источников углерода. Психрофильный штамм не трансформированного типа не мог расти при любой температуре, если единственным источником углерода был толуол. Эта работа показала принципиальную возможность создания психрофильных штаммов бактерий, эффективно разрушающих ксенобиотики в природных условиях.

Объединение разных метаболических путей в одном микроорганизме с помощью конъюгации – это лишь один из способов создания бактерий с новыми свойствами. Можно расширить их катаболические возможности, модифицируя гены, кодирующие ферменты того или иного метаболического пути. Совершенствование того или иного катаболического пути реально с помощью технологии рекомбинантных ДНК, традиционного мутагенеза и соответствующих методов отбора.

Одним из наиболее распространенных веществ, загрязняющих почву и воздух, является трихлорэтилен, широко использующийся в каче-

стве растворителя и обезвоживающего средства. Трихлорэтилен длительное время остается в окружающей среде, считается канцерогенным; к тому же, анаэробные почвенные бактерии дегалогенируют его, превращая в еще более токсичное соединение – винил хлорид.

Некоторые штаммы *P. putida*, разрушающие такие ароматические соединения, как толуол, разрушают и трихлорэтилен. Генетическими исследованиями установлено, что для полной детоксикации трихлорэтилена не нужны все ферменты расщепления ксилола и толуола, достаточно лишь толуолдиоксигеназы, которая в норме катализирует реакцию окисления толуола до цис-толуолдигидродиола. Образование функциональной толуолдиоксигеназы кодируется четырьмя генами; их выделили и экспрессировали в *E. coli* под контролем сильного промотора, который активируется изопропил-β-D-тиогалакто-пиранозидом, в результате трихлорэтилен разлагается до безвредных соединений. Исходная скорость деградации трихлорэтилена в *E. coli* ниже, чем *P. putida*, но она более длительно сохраняется в *E. coli*.

## 11.2. Утилизация крахмала и сахаров

Крахмал – основной резервный полисахарид растений, представляющий смесь гомополимеров D-глюкозы как линейных (амилоза), так и разветвленных (амилопектин). Крахмал широко используют в пищевой промышленности и пивоварении, при этом его сначала гидролизуют до низкомолекулярных компонентов, затем превращают в другие соединения, преимущественно во фруктозу и этанол. Основные ферменты, необходимые для гидролиза крахмала и дальнейших превращений, – α-амилаза, глюкоамилаза и глюкоизомераза, стоимость которых составляет около 30% общей стоимости ферментов, применяемых в настоящее время в промышленности. Промышленное производство фруктозы и этанола из крахмала – многоэтапный процесс, включающий ферментативные и неферментативные стадии (рис. 23).

1. *Желирование молотого зерна* (содержание крахмала примерно 40%) проводится паром под давлением, в результате разрушаются крахмальные зерна и крахмал становится доступен для последующего ферментативного гидролиза. Полученный продукт имеет желеобразную консистенцию.

2. Ожижение желированного крахмала заключается в его охлаждении до 50–60 °С и добавлении α-амилазы, под влиянием которой гидролизуются доступные α-1,4-связи с образованием низкомолекулярных

полисахаридов. Высокая температура повышает эффективность проникновения фермента в желированный крахмал и увеличивает скорость гидролиза.

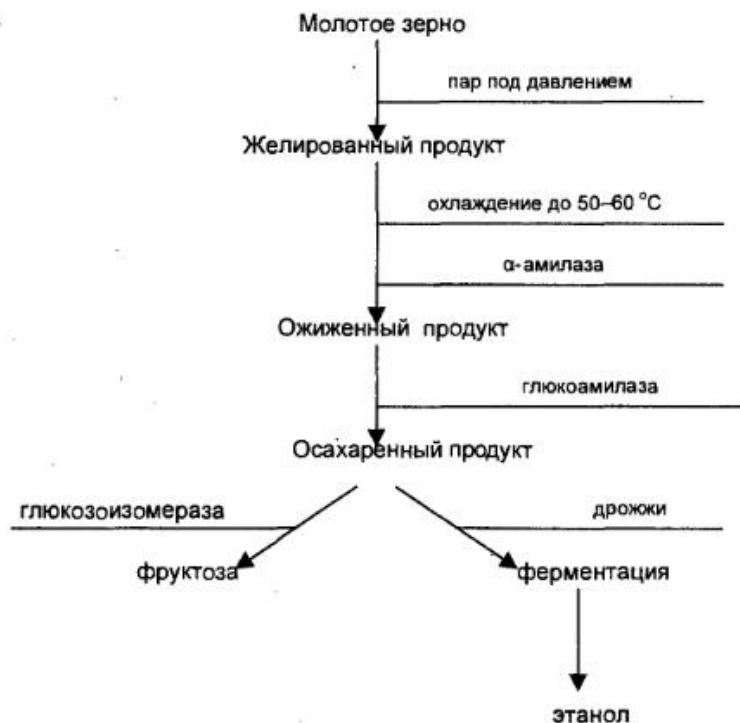


Рис. 23. Промышленное производство фруктозы и этанола из крахмала

3. Осахаривание (полный гидролиз) низкомолекулярных полисахаридов (как линейных, так и разветвленных) происходит под действием глюкоамилазы.

Конечным продуктом такой переработки является глюкоза, из которой с помощью дрожжевой ферментации получают этанол или при участии глюкозоизомеразы – фруктозу. α-амилазу можно выделить из многих микроорганизмов, для промышленных целей ее обычно получают из *Bacillus amyloliquefaciens*, глюкоамилазу также синтезируют многие микроорганизмы, но обычно ее получают из грибов *Aspergillus niger*.

Стоимость производства этанола и фруктозы из молотого зерна, в основном, определяется стоимостью ферментов, используемых одно-

кратно. Поэтому разработка недорогого широкомасштабного производства этих ферментов существенно снижает стоимость конечных продуктов; для этих целей используют:

- разновидности α-амилазы (встречающиеся в природе или созданные методом генной инженерии), обладающие более высокой активностью, позволяющие проводить ожигение при 80–90 °С, это ускоряет гидролиз желированного крахмала, экономит энергию, расходуемую на охлаждение до температуры, при которой идет гидролиз;
- модифицированные гены α-амилазы и глюкоамилазы, чтобы контролируемые ими ферменты имели одинаковые оптимумы температуры и pH, позволяющие совместить этапы ожигения и осахаривания;
- клонированные бактериальные гены, кодирующие ферменты – термостабильные, обладающие высокой каталитической активностью, устойчивые к действию этанола.

Сбраживание субстрата при промышленном производстве этанола осуществляется в основном *S. cerevisiae*, но более рационально использовать *Zygomonas mobilis*, грамтрицательную палочку, сбраживающую глюкозу, фруктозу, сахарозу с относительно большим выходом этанола.

Для расширения спектра утилизируемых *Z. mobilis* субстратов, были выделены и экспрессированы в *Z. mobilis* чужеродные гены (ферментов, гидролизующих лактозу, крахмал, целлюлозу, ксилозу, целлобиозу, пентозу), в частности ген глюкозо/ксилозоизомеразы и ксилулокиназы – ферментов, необходимых для утилизации ксилозы. На следующем этапе в *Z. mobilis* имплантировали плазмиду, несущую два оперона, один из которых кодировал два фермента, метаболизирующих пентозу. Затем эти два оперона встраивали в челночный вектор *E. coli* – *Z. Mobilis*, которые трансформировали *Z. mobilis*. Трансформированные клетки утилизировали ксилозу и перерабатывали пентозы до этанола, причем продуценты эффективно росли, используя в качестве источника углерода побочные продукты деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности.

При переработке растительного материала образуется большое количество лигноцеллюлозных отходов, годовое производство их огромно, поэтому идет интенсивный поиск эффективных способов ферментативного расщепления. Комплекс лигноцеллюлозы подвержен совмест-

ному действию целлюлолитических микроорганизмов только после предварительной обработки сильной кислотой или щелочью, или высокой температурой под давлением, что существенно сказывается на стоимости конечного продукта.

Целлюлазные гены (эндо- и экзоглюканаза,  $\beta$ -глюкозидаза, целлюлобихидролаза, целлобиза) клонировали и экспрессировали в *E. coli* или другие микроорганизмы и получали новые штаммы с полезными свойствами. Так, *S. cerevisiae* и *Z. mobilis*, эффективно преобразующие в этанол простые сахара, после введения им целлюлозных генов могли превращать целлюлозу непосредственно в этанол.

Целлюлазы возможно использовать для промышленной биопереработки бумажных отходов в этанол. Для этого отходы частично расщепляли целлюлазами при 45 °С, затем, не удаляя целлюлаз, проводят ферментацию высвободившейся глюкозы *S. cerevisiae* при 37 °С. Этот подход позволяет получить 400 л этанола из 1 т бумажных отходов, используя его в качестве топлива, экономя, примерно, 16% бензина.

Созданы штаммы *Lactobacillus plantarum*, способствующие более эффективному образованию силоса из сельскохозяйственных культур, которые содержат много крахмала, например люцерны.

*Белок одноклеточных организмов (БОО)* – этот термин принят для белковых продуктов, синтезируемых монокультурой *Methylophilus methylotrophus* (в качестве основного субстрата эти бактерии используют метан) на некоторых видах биомассы (целлюлозные отходы, продукты переработки нефти). Предполагалось, что БОО можно использовать в качестве пищевых добавок или корма для скота благодаря высокому содержанию метионина, лизина, витаминов, микроэлементов. Производство БОО оказалось экономически нецелесообразным по причинам высокой стоимости получаемых продуктов, сомнительного вкусового качества и токсичности. Для того чтобы разработать экономичный процесс производства БОО из отходов, необходимо изучить кинетику роста, метаболизма, возможность генетического манипулирования и безопасность многих микроорганизмов.

### 11.3. Основные санитарные и экологические требования к производству биопрепаратов

Продукция биопредприятий на всех этапах – от исследования и лабораторных испытаний до производства и упаковки конечного продукта

– требует строгих правил к качеству, чистоте, безопасности лекарственных препаратов.

Производство стерильных препаратов особо точно регулируется национальными руководствами и Правилами производства и контроля качества лекарственных средств *good manufacturing practice for medicinal products (GMP) ГОСТ Р 52249-2004*.

Предприятия медицинской и микробиологической промышленности классифицируют согласно международному стандарту ИСО 14694–1 «Классификация чистых помещений и чистых зон загрязнениями», 1998 (от ИОС–1 до ИОС–9 – класс чистоты ПДК). Этой классификации соответствует российский стандарт ГОСТ Р 50766-95 «Чистые помещения. Классификация. Методы аттестации. Основные требования». Стандарт отличается только тем, что вместо ИСО указано обозначение Р (русский), в скобках – класс чистоты по американскому стандарту.

Каждое биопроизводство должно обеспечить защиту:

- сырья, промежуточных и конечных продуктов от любого загрязнения;
- персонала от субстанций, с которыми они работают;
- окружающей среды от веществ, которые при отсутствии соответствующих мер и контроля могут потоком воздуха выйти наружу с биопредприятия.

При неосторожной работе с рекомбинантными штаммами не исключено их попадание в окружающую среду, где они могут вызвать неконтролируемые мутации не только у микроорганизмов, но и у других видов живых существ. Это требует от персонала, занятого в разработке и реализации биотехнологических процессов с использованием приемов генной инженерии, большей ответственности и производственной дисциплины.

Перед окончательным удалением из установки все рекомбинантные микроорганизмы должны быть инактивированы в соответствии с определенными инструкциями. Отработанную культуральную среду тщательно проверяют на наличие в ней жизнеспособных микроорганизмов, чтобы исключить их попадание в окружающую среду.

Серьезные экологические проблемы возникают в связи с защитой водоемов от сточных вод, образующихся в больших объемах при биотехнологическом процессе. Основа очистки сточных вод и защиты от них водоемов – дорогостоящие специальные очистные сооружения, а также замкнутые системы водооборота. Перед спуском в сточных вод в очистные сооружения отработанные нативные растворы подвергают

предварительно УФ-облучению с одновременным введением окислителя, что позволяет разрушить высокомолекулярные органические соединения с образованием низкомолекулярных веществ, поддающихся биологическому окислению в системе очистных сооружений. В «часы пика» предпочтительно эпизодическое использование коммерческих препаратов – генно-инженерных штаммов-деструкторов, например бактерий рода *Pseudomonas*, в плаزمиды которых имеются гены окислительных ферментов. Постоянное присутствие штаммов-деструкторов в промышленных стоках считается малоэффективным по причине малой стабильности плазмид. Затем идут следующие этапы очистки:

- *первичная обработка* (удаление легко отделяющихся загрязнений – крупных, легко осаждающихся частиц, масляных плёнок);
- *вторичная обработка* (удаление суспендированных твёрдых частиц, как правило, органической природы; для этой цели используют биологическое окисление – аэрацию);
- *третичная обработка* (полное отделение всех оставшихся примесей методами электродиализа, обратного осмоса, фильтрации, адсорбции).

Используют биологические фильтры, но предпочтительны биологические окислительные пруды с природным комплексом микроорганизмов (активный ил), напоминающие естественные водные экосистемы, где в процессе фотосинтеза водоросли выделяют кислород, поддерживая аэробный режим, который необходим для бактерий, утилизирующих органические загрязняющие вещества. При этом чётко отслеживается баланс роста и продуктивности бактерий различных групп.

Важной задачей защиты окружающей среды является сокращение выбросов вредных веществ в атмосферу. Ее решение связано с глубокой очисткой дымовых газов с исключением рассеивания в атмосфере конечного продукта.

Рациональное решение проблемы защиты окружающей среды должно базироваться на современных принципах разработки биотехнологических производств, основанных на безотходной или малоотходной технологии. Это наиболее прогрессивный путь решения экологических проблем, в том числе в области медицинской биотехнологии.

## ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ИТОГОВОЙ АТТЕСТАЦИИ

**001. Возникновение геномики как научной дисциплины стало возможным после:**

- а) установления структуры ДНК;
- б) создания концепции гена;
- в) дифференциации регуляторных и структурных участков гена;
- г) полного секвенирования генома у ряда организмов.

**002. Существенность гена у патогенного организма – кодируемый геном продукт необходим для:**

- а) размножения клетки;
- б) поддержания жизнедеятельности;
- в) инвазии в ткани;
- г) инактивации антимикробного вещества.

**003. Гены house keeping у патогенного микроорганизма экспрессируются:**

- а) в инфицированном организме хозяина;
- б) всегда;
- в) только на искусственных питательных средах;
- г) под влиянием индукторов.

**004. Протеомика характеризует состояние микробного патогена:**

- а) по ферментативной активности;
- б) по скорости роста;
- в) по экспрессии отдельных белков;
- г) по нахождению на конкретной стадии ростового цикла.

**005. Для получения протопластов из клеток грибов используется:**

- а) лизоцим;
- б) трипсин;
- в) улиточный фермент;
- г) пепсин.

**006. За образованием протопластов из микробных клеток можно следить с помощью методов:**

- а) вискозиметрии;
- б) колориметрии;
- в) фазово-контрастной микроскопии;
- г) электронной микроскопии.

007. Для получения протопластов из бактериальных клеток используется:

- а) лизоцим;
- б) улиточный фермент;
- в) трипсин;
- г) папаин.

008. Объединение геномов клеток разных видов и родов возможно при соматической гибридизации:

- а) только в природных условиях;
- б) только в искусственных условиях;
- в) в природных и искусственных условиях.

009. Высокая стабильность протопластов достигается при хранении:

- а) на холоде;
- б) в гипертонической среде;
- в) в среде с добавлением антибиотиков;
- г) в анаэробных условиях.

010. Полиэтиленгликоль (ПЭГ), вносимый в суспензию протопластов:

- а) способствует их слиянию;
- б) предотвращает их слияние;
- в) повышает стабильность суспензии;
- г) предотвращает микробное заражение.

011. Для протопластирования наиболее подходят суспензионные культуры:

- а) в лаг-фазе;
- б) в фазе ускоренного роста;
- в) в логарифмической фазе;
- г) в фазе замедленного роста;
- д) в стационарной фазе;
- е) в фазе отмирания.

012. Гибридизация протопластов возможна, если клетки исходных растений обладают:

- а) половой совместимостью;
- б) половой несовместимостью;
- в) совместимость не имеет существенного значения.

013. Преимуществами генно-инженерного инсулина являются:

- а) высокая активность;
- б) меньшая аллергенность;

- в) меньшая токсичность;
- г) большая стабильность.

014. Преимущества получения видоспецифических для человека белков путем микробиологического синтеза:

- а) простота оборудования;
- б) экономичность;
- в) отсутствие дефицитного сырья;
- г) снятие этических проблем.

015. Разработанная технология получения рекомбинантного эритропозтина основана на экспрессии гена:

- а) в клетках бактерии;
- б) в клетках дрожжей;
- в) в клетках растений;
- г) в культуре животных клеток.

016. Особенностью пептидных факторов и роста тканей являются:

- а) тканевая специфичность;
- б) видовая специфичность;
- в) образование железами внутренней секреции;
- г) образование вне желез внутренней секреции.

017. Преимущество RIA перед определением инсулина по палению концентрации глюкозы в кровь животных:

- а) меньшая стоимость анализа;
- б) ненужность дефицитных реагентов;
- в) легкость освоения;
- г) в отсутствии влияния на результаты анализа других белков;
- д) продолжительность времени анализа.

018. При оценке качества генно-инженерного инсулина требуется уделять особенно больше внимания тесту на:

- а) стерильность;
- б) токсичность;
- в) аллергенность;
- г) пирогенность.

019. Особое преимущество полусинтетических производных эритромицина, азитро-, рокситро-, кларитромицина перед природным антибиотиком обусловлено:

- а) меньшей токсичностью;
- б) бактерицидностью;
- в) активностью против внутриклеточно локализованных паразитов;

г) действием на грибы.

**020. Антибиотики с самопротированным проникновением в клетку патогена:**

- а) бета-лактамы;
- б) аминогликозиды;
- в) макролиды;
- г) гликопептиды.

**021. Появление множественной резистентности опухолей к противоопухолевым агентам обусловлено:**

- а) непроницаемостью мембраны;
- б) ферментативной активацией;
- в) уменьшением сродства внутриклеточных мишеней;
- г) активным выбросом.

**022. Практическое значение полусинтетического аминогликозида амикацина обусловлено:**

- а) активностью против анаэробных патогенов;
- б) отсутствием нефротоксичности;
- в) устойчивостью к защитным ферментам у бактерий, инактивирующим другие аминогликозиды;
- г) активностью против патогенных грибов.

**023. Действие полиенов – нистатина и амфотерицина В на грибы, но не на бактерии объясняется:**

- а) особенностями рибосом у грибов;
- б) наличием митохондрий;
- в) наличием хитина в клеточной стенке;
- г) наличием эргостерина в мембране.

**024. Фунгицидность полиенов нистатина и амфотерицина В обусловлена:**

- а) взаимодействием с ДНК;
- б) активацией литических ферментов;
- в) формированием в мембране водных каналов и потерей клеткой низкомолекулярных метаболитов и неорганических ионов;
- г) подавлением систем электронного транспорта.

**025. Защита продуцентов аминогликозидов от собственного антибиотика:**

- а) низкое сродство рибосом;
- б) активный выброс;
- в) временная ферментативная инактивация;
- г) компартментация.

**026. Сигнальная трансдукция – это:**

- а) передача сигнала от клеточной мембраны на геном;
- б) инициация белкового синтеза;
- в) посттрансляционные изменения белка;
- г) выделение литических ферментов.

**027. Из вторичных метаболитов микроорганизмов ингибитором сигнальной трансдукции является:**

- а) стрептомицин;
- б) нистатин;
- в) циклоспорил А;
- г) эритромицин.

**028. Трансферазы осуществляют:**

- а) катализ окислительно-восстановительных реакций;
- б) перенос функциональных групп на молекулу воды;
- в) катализ реакций присоединения по двойным связям;
- г) катализ реакций переноса функциональных групп на субстрат.

**029. Цефалоспорины четвертого поколения, устойчивый к бета-лактамазам грамотрицательных бактерий:**

- а) цефалексин;
- б) цефазолин;
- в) цефпиром;
- г) цефаклор.

**030. Цефалоспорины четвертого поколения, устойчивый к бета-лактамазам грамположительных бактерий:**

- а) цефазолин;
- б) цефтриаксон;
- в) цефалоридин;
- г) цефепим.

**031. Пенициллинацилаза используется:**

- а) при проверке заводских серий пенициллина на стерильность;
- б) при оценке эффективности пенициллиновых структур против резистентных бактерий;
- в) при получении полусинтетических пенициллинов;
- г) при снятии аллергических реакций на пенициллин.

**032. Пенициллинацилаза катализирует:**

- а) расщепление бета-лактамного кольца;
- б) расщепление тиазолидинового кольца;
- в) отщепление бокового радикала при С6;
- г) деметилирование тиазолидинового кольца.

**033. Моноклональные антитела получают в производстве:**

- а) при фракционировании антител организмов;
- б) фракционированием лимфоцитов;
- в) с помощью гибридов;
- г) химическим синтезом.

**034. Мишенью для физических и химических мутагенов в клетке биообъектов являются:**

- а) ДНК;
- б) ДНК-полимераза;
- в) РНК-полимераза;
- г) рибосома;
- д) информационная РНК.

**035. Активный ил, применяемый при очистке стоков биотехнологических производств, – это:**

- а) сорбент;
- б) смесь сорбентов;
- в) смесь микроорганизмов, полученных генно-инженерными методами;
- г) природный комплекс микроорганизмов.

**036. При очистке промышленных стоков в «часы пик» применяют штаммы-деструкторы:**

- а) природные микроорганизмы;
- б) постоянные компоненты активного ила;
- в) стабильные генно-инженерные штаммы;
- г) не стабильные генно-инженерные штаммы.

**037. Постоянное присутствие штаммов-деструкторов в аэротенках малоэффективно; периодическое внесение их коммерческих препаратов вызвано:**

- а) слабой скоростью их размножения;
- б) их вытеснением представителями микрофлоры активного ила;
- в) потерей плазмид, где локализованы гены окислительных ферментов;
- г) проблемами техники безопасности.

**038. Функцией феромонов является:**

- а) антимикробная активность;
- б) противовирусная активность;
- в) изменение поведения организма, имеющего специфический рецептор;
- г) терморегулирующая активность;

д) противоопухолевая активность.

**039. Выделение и очистка продуктов биосинтеза и оргсинтеза имеют принципиальные отличия на стадиях процесса:**

- а) всех;
- б) конечных;
- в) первых;
- г) принципиальных различий нет.

**040. Основное преимущество ферментативной биоконверсии стероидов перед химической трансформацией состоит:**

- а) в доступности реагентов;
- б) в избирательности воздействия на определенные функциональные группы стероида;
- в) в сокращении времени процесса;
- г) в получении принципиально новых соединений.

**041. Увеличение выхода целевого продукта при биотрансформации стероида достигается:**

- а) при увеличении интенсивности перемешивания;
- б) при увеличении интенсивности аэрации;
- в) при повышении температуры ферментации;
- г) при исключении микробной контаминации;
- д) при увеличении концентрации стероидного субстрата в ферментационной среде;
- е) при целенаправленном изменении химической структуры стероидного субстрата.

**042. Директором (главным инженером) фармацевтического предприятия должен являться, согласно требованиям GMP:**

- а) инженер-экономист;
- б) юрист;
- в) провизор;
- г) врач.

**043. Правила GMP предусматривают производство в отдельных помещениях и на отдельном оборудовании:**

- а) пенициллинов;
- б) аминогликозидов;
- в) тетрациклинов;
- г) макролидов;
- д) полиенов.

**044. Свойство бетагалактамов, из-за которого их следует, согласно GMP, нарабатывать в отдельных помещениях:**

- а) общая токсичность;
- б) хроническая токсичность;
- в) эмбриотоксичность;
- г) аллергенность.

**045. GLP регламентирует:**

- а) лабораторные исследования;
- б) планирование поисковых работ;
- в) набор тестов при предклинических испытаниях;
- г) методы математической обработки данных.

**046. Согласно GCP в обязанности этических комитетов входят:**

- а) контроль за санитарным состоянием лечебно-профилактических учреждений;
- б) защита прав больных, на которых испытываются новые лекарственные препараты;
- в) утверждение назначаемых режимов лечения;
- г) контроль за соблюдением внутреннего распорядка.

**047. Причина невозможности непосредственной экспрессии гена человека в клетке прокариот:**

- а) высокая концентрация нуклеаз;
- б) невозможность репликации плазмид;
- в) отсутствие транскрипции;
- г) невозможность сплайсинга.

**048. Прямой перенос чужеродной ДНК в протопласты возможен с помощью:**

- а) микроинъекции;
- б) трансформации;
- в) упаковки в липосомы;
- г) культивирования протопластов на соответствующих питательных средах.

**049. Субстратами рестриктаз, используемых генным инженером, являются:**

- а) гомополисахариды;
- б) гетерополисахариды;
- в) нуклеиновые кислоты;
- г) белки.

**050. «Ген-маркер» необходим в генетической инженерии:**

- а) для включения вектора в клетки хозяина;

б) для отбора колоний, образуемых клетками, в которые проник вектор;

- в) для включения «рабочего гена» в вектор;
- г) для повышения стабильности вектора.

**051. Понятие «липкие концы» применительно к генетической инженерии отражает:**

- а) комплементарность нуклеотидных последовательностей;
- б) взаимодействие нуклеиновых кислот и гистонов;
- в) реагирование друг с другом SH-групп с образованием дисульфидных связей;
- г) гидрофобное взаимодействие липидов.

**052. Поиск новых рестриктаз для использования в генетической инженерии объясняется:**

- а) различиями в каталитической активности;
- б) различным местом воздействия на субстрат;
- в) видоспецифичностью;
- г) высокой стоимостью.

**053. Успехи генетической инженерии в области создания рекомбинантных белков больше, чем в создании рекомбинантных антибиотиков. Это объясняется:**

- а) более простой структурой белков;
- б) трудностью подбора меток хозяев для биосинтеза антибиотиков;
- в) большим количеством структурных генов, включенных в биосинтез антибиотиков;
- г) проблемами безопасности производственного процесса.

**054. Фермент лигаза используется в генетической инженерии, так как:**

- а) скрепляет вектор с оболочкой клетки хозяина;
- б) катализирует включение вектора в хромосому клеток хозяина;
- в) катализирует ковалентное связывание углеводно-фосфорной цепи ДНК гена с ДНК вектора;
- г) катализирует замыкание пептидных мостиков в пептидогликане клеточной стенки.

**055. Биотехнологу «ген-маркер» необходим:**

- а) для повышения активности рекомбинанта;
- б) для образования компетентных клеток хозяина;
- в) для модификации места взаимодействия рестриктаз с субстратом;
- г) для отбора рекомбинантов.



**056. Ослабление ограничений на использование в промышленности микроорганизмов-рекомбинантов, продуцирующих гормоны человека, стало возможным благодаря:**

- а) совершенствованию методов изоляции генно-инженерных рекомбинантов от окружающей среды;
- б) повышению квалификации персонала, работающего с рекомбинантами;
- в) установленной экспериментально слабой жизнеспособности рекомбинанта;
- г) экспериментальному подтверждению обязательной потери чужеродных генов.

**057. Вектор на основе плазмиды предпочтительней вектора на основе фаговой ДНК благодаря:**

- а) большому размеру;
- б) меньшей токсичности;
- в) большей частоты включения;
- г) отсутствию лизиса клетки хозяина.

**058. Активирование нерастворимого носителя в случае иммобилизации фермента необходимо:**

- а) для усиления включения фермента в гель;
- б) для повышения сорбции фермента;
- в) для повышения активности фермента;
- г) для образования ковалентной связи.

**059. Иммобилизация индивидуальных ферментов ограничивается таким обстоятельством, как:**

- а) высокая лабильность фермента;
- б) наличие у фермента кофермента;
- в) наличие у фермента субъединиц;
- г) принадлежность фермента к гидролазам.

**060. Иммобилизация целых клеток продуцентов лекарственных веществ нерациональна в случае:**

- а) высокой лабильности целевого продукта (лекарственного вещества);
- б) использования целевого продукта только в инъекционной форме;
- в) внутриклеточной локализации целевого продукта;
- г) высокой гидрофильности целевого продукта.

**061. Иммобилизация клеток продуцентов целесообразна в случае, если целевой продукт:**

- а) растворим в воде;

- б) нерастворим в воде;
- в) локализован внутри клетки;
- г) им является биомасса клеток.

**062. Целями иммобилизации ферментов в биотехнологическом производстве являются:**

- а) повышение удельной активности;
- б) повышение стабильности;
- в) расширение субстратного спектра;
- г) многократное использование.

**063. Целевой белковый продукт локализован внутри иммобилизованной клетки. Добиться его выделения, не нарушая системы, можно:**

- а) усилив системы активного выброса;
- б) ослабив барьерные функции мембраны;
- в) присоединив к белку лидерную последовательность от внешнего белка;
- г) повысив скорость синтеза белка.

**064. Колоночный биореактор для иммобилизации целых клеток должен отличаться от реактора для иммобилизации ферментов:**

- а) большим диаметром колонки;
- б) отводом газов;
- в) более быстрым движением растворителя;
- г) формой частиц нерастворимого носителя.

**065. Технология, основанная на иммобилизации биообъекта, уменьшает наличие в лекарственном препарате следующих примесей:**

- а) следов тяжелых металлов;
- б) белков;
- в) механических частиц;
- г) следов органических растворителей.

**066. Экономическое преимущество биотехнологического производства, основанного на иммобилизованных биообъектах, перед традиционным обусловлено:**

- а) меньшими затратами труда;
- б) более дешевым сырьем;
- в) многократным использованием биообъекта;
- г) ускорением производственного процесса.

**067. Биосинтез антибиотиков, используемых как лекарственные вещества, усиливается и наступает раньше на средах:**

- а) богатых источниками азота;
- б) богатых источниками углерода;
- в) богатых источниками фосфора;
- г) бедных питательными веществами.

**068. Регулируемая ферментация в процессе биосинтеза достигается при способе:**

- а) периодическом;
- б) непрерывном;
- в) отъемно-доливном;
- г) полупериодическом.

**069. Ретроингибирование конечным продуктом при биосинтезе биологически активных веществ – это:**

- а) подавление последнего фермента в метаболической цепи;
- б) подавление начального фермента и метаболической цепи;
- в) подавление всех ферментов в метаболической цепи.

**070. Термин «мультиферментный комплекс» означает:**

- а) комплекс ферментных белков, выделяемый из клетки путем экстракции и осаждения;
- б) комплекс ферментов клеточной мембраны;
- в) комплекс ферментов, катализирующих синтез первичного или вторичного метаболита;
- г) комплекс экзо- и эндопротеаз.

**071. Путем поликетидного синтеза происходит сборка молекулы:**

- а) тетрациклина;
- б) пенициллина;
- в) стрептомицина;
- г) циклоспорина.

**072. Комплексный компонент питательной среды, резко повышающий производительность ферментации при производстве пенициллина:**

- а) соевая мука;
- б) гороховая мука;
- в) кукурузный экстракт;
- г) хлопковая мука.

**073. Предшественник пенициллина, резко повышающий его выход при добавлении в среду:**

- а) бета-диметилцистеин;

- б) валин;
- в) фенилуксусная кислота;
- г) альфа-аминоадипиновая кислота.

**074. Предшественник при биосинтезе пенициллина добавляют:**

- а) в начале ферментации;
- б) на вторые-третьи сутки после начала ферментации;
- в) каждые сутки в течение 5-суточного процесса.

**075. Технологический воздух для биотехнологического производства стерилизуют:**

- а) нагреванием;
- б) фильтрованием;
- в) облучением.

**076. Борьба с фаговой инфекцией в цехах ферментации антибиотического производства наиболее рациональна путем:**

- а) ужесточения контроля за стерилизацией технологического воздуха;
- б) ужесточения контроля за стерилизацией питательной среды;
- в) получения и использования фагоустойчивых штаммов биообъекта;
- г) ужесточения контроля за стерилизацией оборудования.

**077. Преимущество растительного сырья, получаемого при выращивании культур клеток перед сырьем, получаемым из плантационных или дикорастущих растений:**

- а) большая концентрация целевого продукта;
- б) меньшая стоимость;
- в) стандартность;
- г) более простое извлечение целевого продукта.

**078. Ауксины – термин, под которым объединяются специфические стимуляторы роста:**

- а) растительных тканей;
- б) актиномицетов;
- в) животных тканей;
- г) эубактерий.

**079. Превращение карденолида дигитоксина в менее токсичный дигоксин (12-гидроксилирование) осуществляется культурой клеток:**

- а) *Acremonium chrysogenum*;
- б) *Saccharomyces cerevisiae*;
- в) *Digitalis lanata*;
- г) *Tolypocladium inflatum*.

**080. Причины высокой эффективности антибиотических препаратов «уназин» и «аугментин» заключаются:**

- а) в невысокой токсичности I (по сравнению с ампициллином и амоксициллином);
- б) в невысокой стоимости;
- в) в действии на резистентные к бета-лактамам штаммы бактерий;
- г) в пролонгации эффекта.

**081. Какое свойство нового бета-лактаманного антибиотика наиболее ценно при лечении бактериальных осложнений у больных с ВИЧ-инфекцией:**

- а) устойчивость к бета-лактамазам;
- б) слабая токсичность;
- в) связывание с ПСБ 2;
- г) пролонгированная циркуляция.

**082. Для проверки какого качества серийного инъекционного препарата пенициллина используется в медицинской промышленности пенициллиназа (бета-лактамаза):**

- а) токсичности;
- б) прозрачности;
- в) стерильности;
- г) пирогенности.

**083. Антибиотикотолерантность патогена обусловлена:**

- а) разрушением антибиотика;
- б) активным выбросом;
- в) низким содержанием автолизина;
- г) отсутствием мишени для антибиотика.

**084. Микробактерии – возбудители современной туберкулезной инфекции – устойчивы к химиотерапии вследствие:**

- а) компенсаторных мутаций;
- б) медленного роста;
- в) внутриклеточной локализации;
- г) ослабления иммунитета организма хозяина.

**085. Мониторинг (применительно к лекарству):**

- а) введение в организм;
- б) выделение;
- в) выявление в тканях;
- г) контроль динамики изменения концентрации в биожидкости организма.

**086. Скрининг (лекарств):**

- а) совершенствование путем химической трансформации;
- б) совершенствование путем биотрансформации;
- в) поиск и отбор («просеивание») природных структур;
- г) полный химический синтез.

**087. Таргет:**

- а) сайт на поверхности клетки;
- б) промежуточная мишень внутри клетки;
- в) конечная внутриклеточная мишень;
- г) функциональная группа макромолекулы.

## КРАТКИЙ СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ, используемых в биотехнологии

(за основу взят список по Б. Глику, Дж. Пастернаку)

**Адаптор.** 1. Синтетический двухцепочечный олигонуклеотид с одним тупым концом и одним липким концом. После пришивания адаптора тупым концом к ДНК-мишени последнюю можно встраивать в подходящий вектор, используя приобретенный ею липкий конец. 2. Синтетический одноцепочечный олигонуклеотид, у которого после самогибридизации появляются липкие концы и внутренний сайт для рестрицирующей эндонуклеазы. Когда адаптор встраивают в клонирующий вектор, у вектора появляется новый сайт рестрикции.

**Аденин.** Пуриновое основание, комплементарное тимину и урацилу. Одно из азотистых оснований, входящих в состав ДНК и РНК.

**Активатор.** 1. Вещество, стимулирующее транскрипцию специфического гена и оперона. 2. Белок, связывающийся с опероном и ускоряющий транскрипцию; используется также название «активаторный белок».

**Актин.** Белок мышечных волокон; входит в состав актомиозина — основного сократительного мышечного белка.

**Алель.** Одна из двух (или нескольких) альтернативных структурных форм гена.

**Алlostерическая регуляция.** Регуляция активности фермента, осуществляемая эффекторной молекулой, которая связывается с участком в молекуле фермента, удаленным от активного центра.

**Альгинат.** Полисахарид, синтезируемый различными водорослями и бактериями; состоит из остатков  $\beta$ -D-маннуроната и  $\alpha$ -L-гулулоната.

**Альтернативный сплайсинг.** Соединение экзонов данного гена в разных комбинациях с образованием различающихся зрелых молекул мРНК.

**Аминоацил-тРНК.** Молекула тРНК, к 3'-концу которой присоединена специфическая аминокислота.

**Аминоацильный сайт, А-сайт.** Участок рибосомы, связывающий аминокислоту — тРНК в процессе трансляции.

**Аминокислота.** Мономерная единица («строительный блок») белковых молекул.

**Ампликон.** Плазмидный вектор вируса простого герпеса типа 1.

**Анаэробные микроорганизмы.** Микроорганизмы, растущие в отсутствие кислорода.

**Антибиотик.** Вещество, синтезируемое одним микроорганизмом и оказывающее ингибирующее действие на другие микроорганизмы и раковые клетки.

**Антиген.** Вещество, воспринимаемое организмом как чужеродное и вызывающее специфический иммунный ответ — выработку антител.

**Антикодон.** Триплет нуклеотидов в молекуле тРНК, комплементарный нуклеотидам специфического кодона в молекуле мРНК.

**Антипараллельная ориентация.** Противоположная направленность ( $5' \rightarrow 3'$  и  $3' \rightarrow 5'$ ) цепей в двухцепочечных молекулах нуклеиновых кислот.

**«Антисмысловая» цепь.** 1. Транскрибируемая (кодирующая) цепь в молекуле хромосомной ДНК. 2. Одна из нитей в двухцепочечной молекуле ДНК, нуклеотидная последовательность которой комплементарна таковой у соответствующей мРНК.

**Антисыворотка.** Жидкая составляющая крови, содержащая антитела.

**Антитело.** Белок (иммуноглобулин), синтезируемый В-лимфоцитами в ответ на попадание в организм различных антигенов и специфически с ними взаимодействующий.

**Антифризный белок.** Богатый аланином белок, вырабатываемый в печени некоторых водных организмов и предотвращающий замерзание плазмы крови. Обнаружен также в клетках некоторых насекомых, растений, бактерий, где он регулирует образование кристаллов льда при низких температурах.

**Аптамер.** Синтетический полинуклеотид, связывающийся с белком, в норме не взаимодействующим с нуклеиновыми кислотами.

**Аттенуированная (ослабленная) вакцина.** Вакцина, приготовленная с использованием ослабленных тем или иным образом микроорганизмов.

**Аутологичные клетки.** Клетки, взятые от данного организма, культивированные, возможно, генетически измененные и вновь введенные в организм-донор.

**Аутосома.** Любая хромосома, не являющаяся половой. В соматических клетках человека присутствуют 22 пары аутосом и одна пара половых хромосом.

**Аутосомное наследование.** Несцепленное с полом наследование какого-либо признака.

**Ацилпереносящий белок.** Низкомолекулярный белок, компонент более крупного комплекса, участвующего в биосинтезе жирных кислот или поликетидов.

**Аэробные микроорганизмы.** Микроорганизмы, растущие только в присутствии кислорода.

**Бакмида.** Челночный вектор на основе генома АсМNPV, способный существовать в клетках *E. coli* и клетках насекомых.

**Бактериофаг.** Вирус, инфицирующий бактерии.

**Бактериоцин.** Вещество, синтезируемое одним микроорганизмом и убивающее клетки другого микроорганизма.

**Баллистическая трансфекция.** Введение ДНК в растительные и животные клетки или органеллы с помощью вольфрамовых или золотых шариков. ДНК осаждают, покрывают ею шарики и «обстреливают» ими клетки.

**G-белки.** Мембранные белки, активизирующиеся после взаимодействия с GTP. Участвуют в передаче сигнала от клеточных рецепторов к ферментам на внутренней поверхности мембран.

**Белки теплового шока.** Белки, синтезируемые в ответ на резкое повышение температуры.

**Бетаин.** Низкомолекулярное соединение, служащее донором метильной группы при биосинтезе метионина.

**Библиотека кДНК.** Коллекция клонов кДНК, синтезируемых *in vitro* на матрицах мРНК, происходящих из одной ткани или клеточной популяции.

**Бинарная векторная система.** Двухплазмидная система *Agrobacterium*, предназначенная для переноса участка тДНК, несущего клонированные гены в растительные клетки. Гены вирулентности локализованы на одной плазмиде, а встроенный участок тДНК — на другой.

**Бинарное деление.** Прямое, не связанное с половым процессом деление прокариотической клетки на примерно одинаковые по размерам дочерние клетки.

**Биодеградация.** Разрушение загрязняющих веществ, попавших в окружающую среду, с помощью живых микроорганизмов.

**Биоконтроль.** Процесс, в котором используется живые организмы для ограничения роста и развития патогенных микроорганизмов.

**Биомаркер.** Биологический признак, позволяющий судить о прогрессировании патологического процесса или об эффективности лечения.

**Биомасса.** 1. Клеточная масса, образующаяся в результате жизнедеятельности живых организмов. 2. Органическое вещество, которое может использоваться как источник энергии или химических соединений.

**Биореактор, ферментер.** Устройство, в котором протекают биохимические реакции при участии живых микроорганизмов, клеточных экстрактов или ферментов. Часто этот термин относится к сосуду, в котором растут микроорганизмы.

**Блоттинг.** Перенос разделенных молекул из одной среды (например, геля) на твердый носитель (бумагу, нетроцеллюлозный фильтр).

**Брошь, пробел.** Отсутствие одного или нескольких нуклеотидов в одной из цепей двухцепочечной ДНК.

**Вакцинация.** Введение в организм антигена с тем, чтобы индуцировать в нем выработку антител к возможному инфицирующему агенту.

**Варибельные домены.** Участки полипептидных цепей антитела, имеющие неодинаковую аминокислотную последовательность у молекул разных антител; отвечают за специфичность последних.

**Вектор.** Самореплицирующаяся молекула ДНК (например, бактериальная плаزمид), используемая в генной инженерии для переноса генов от организма-донора в организм-реципиент, а также для клонирования нуклеотидных последовательностей.

**Вестерн-блоттинг.** Перенос белковых молекул, разделенных с помощью гель-электрофореза, на твердую подложку.

**Вирион.** Вирусная частица.

**Вирулентность.** Характеристика патогенности микроорганизма.

**Вирус-помощник.** Вирулентный штамм вируса, в присутствии которого дефектный вирус может размножаться в клетке-хозяине.

**Время генерации.** Время, за которое в популяции одноклеточных организмов удваивается число клеток; называется также временем удвоения.

**Вставка.** Сегмент ДНК, встроенный в клонирующий вектор.

**Вторичный метаболит.** Вещество, не являющееся обязательным для роста или функционирования клетки, но синтезирующееся в стационарной фазе (обычно участвует в защите клеток или микроорганизмов от тех или иных воздействий).

**Гамета.** Репродуктивная гаплоидная клетка многоклеточного организма.

**Гаплоидный.** Термин, характеризующий организм (клетку), у которого имеется один набор хромосом.

**Ген.** Транскрибируемый участок хромосомы, кодирующий функциональный белок либо тРНК или рРНК.

**Ген «самоубийства», «суицидальный» ген.** Ген, вызывающий при определенных условиях гибель собственной клетки.

**Генетический код.** Система записи генетической информации в виде последовательности нуклеотидов, в которой каждые три нуклеотида, составляющие кодон, кодирует одну аминокислоту. Состоит из 64 кодонов, кодирующих все 20 аминокислот и три терминирующих кодона.

**Ген-кандидат.** Структурный ген в геноме человека, мутация в котором предположительно является причиной конкретного наследственного заболевания.

**Ген-мишень.** 1. Клонированный ген. 2. Ген, подвергаемый специфическому воздействию. 3. Ген, интересующий исследователя.

**Генная иммунизация.** Индукция у организма иммунного ответа без введения антигена, путем включения в клетки гена, кодирующего белок-антиген.

**Генная терапия ex vivo.** Введение гена (или генов) в изолированные клетки больного. После культивирования и трансформации клетки вводят в организм больного с помощью трансфузии, инфузии или инъекции. Эта процедура позволяет устранять генетические дефекты.

**Генная терапия in vivo.** Введение гена (генов) непосредственно в ткань или орган с целью устранения генетического нарушения.

**Геном.** Совокупность генов гаплоидного набора хромосом данного организма.

**Геномная библиотека, банк генов.** Набор клонированных фрагментов ДНК, в совокупности составляющих индивидуальный (групповой, видовой) геном. Если речь идет о крупном геноме (млекопитающие), то получают хромосомоспецифичные библиотеки.

**Генотип.** Генетическая конструкция организма, набор всех его аллелей (альтернативных форм).

**Гетерозигота.** Организм, в геноме которого имеются одна или несколько пар различающихся аллелей.

**Гибридный белок, химерный белок.** Продукт клонированных совместно двух или более кодирующих последовательностей из разных генов; представляет собой одну полипептидную цепь.

**Гибридный ген.** Ген, состоящий из частей двух или нескольких генов и экспрессирующийся как единое целое с образованием гибридного (химерного) белка.

**Гибридома.** Гибридная клеточная линия, полученная при слиянии нормальных антителообразующих клеток (лимфоцитов) и миеломных клеток. Обладает способностью к неограниченному росту и синтезу моноклональных антител.

**Гомологичные.** Происходящие из одного источника или имеющие сходную структуру или эволюционное происхождение.

**Гомомерный белок.** Белок, состоящий из двух или более идентичных полипептидных цепей (субъединиц).

**Группа несовместимости.** Группа плазмид, представители которой могут сосуществовать в одной клетке.

**Группа совместимости.** Группа плазмид, члены которой не способны сосуществовать в одной бактериальной клетке.

**Гуанин.** Пуриновое основание, комплементарное цитозину; одно из четырех азотистых оснований, входящих в состав ДНК и РНК.

**Гуморальный иммунный ответ.** Синтез антител В-клетками иммунной системы в ответ на присутствие в организме чужеродных антигенов.

**Дегалогенирование.** Отщепление атома галогена (хлора, иода, брома, фтора), обычно при биодегградации.

**Дезоксирибоза.** Пятиуглеродный моносахарид, входящий в состав ДНК.

**Дезоксирибонуклеаза I, ДНКаз I.** Фермент, расщепляющий двухцепочечную ДНК. Используется для очистки препаратов РНК и бесклеточных экстрактов.

**Дезоксирибонуклеиновая кислота, ДНК.** Полимер, состоящий из дезоксирибонуклеотидов; видоспецифичный носитель генетической информации.

**Делеция.** Выпадение участка хромосомы из ее внутренней области.

**Денатурация.** 1. Расхождение цепей двухцепочечной молекулы ДНК или РНК. 2. Нарушение нативной конформации биологических макромолекул в результате разрушения нековалентных (водородных) связей.

**Диплоид.** Организм, клетки которого содержат два гомологичных набора хромосом.

**Дисульфидная связь.** Ковалентная связь между двумя атомами серы, входящими в молекулы цистеина; стабилизирует третичную структуру полипептидных цепей.

**Дитиотрейтол.** Низкомолекулярный тиолсодержащий восстанавливающий агент. Добавляется в буферные растворы в низкой концентрации для предотвращения окисления сульфгидрильных групп в белках. В высоких концентрациях используется для восстановления дисульфидных связей.

**ДНК-зонд.** Фрагмент ДНК, меченый тем или иным образом и использующийся для гибридизации со специфическим участком в молекуле ДНК. Позволяет идентифицировать комплементарные ему нуклеотидные последовательности.

**ДНК-лигаза.** Фермент, катализирующий образование фосфорно-диэфирной связи между 3'-гидроксильной группой и 5'-фосфатом соседних нуклеотидов в месте одноцепочечного разрыва молекулы ДНК.

**ДНК-полимераза.** Фермент, катализирующий синтез полинуклеотидной цепи из отдельных нуклеотидов с использованием другой цепи в качестве матрицы и ДНК-затравки со свободной 3'-ОН-группой.

**Додецилсульфат натрия.** Анионный детергент, использующийся для денатурации белков.

**Домен.** Участок полипептидной цепи, выполняющий определенную функцию (например, цитоплазматический домен, трансмембранный домен и т.д.).

**Емкость вектора.** Максимальный размер участка ДНК, который может быть клонирован в данном векторе.

**Енолаза.** Фермент, катализирующий превращение 2-фосфоглицерата в фосфоенолпируват.

**Енолредуктаза.** Фермент, участвующий в синтезе поликетидных антибиотиков.

**Заместительная терапия.** Введение в организм метаболитов, кофакторов, гормонов, восполняющих их дефицит, обусловленный генетическим дефектом.

**Зонд.** 1. Соединение, меченое тем или иным способом и использующееся для выявления родственных биохимических молекул в сложном образце. 2. Олигонуклеотид, использующийся для выявления комплементарных последовательностей с помощью гибридизации.

**Иммунотерапия.** Использование антитела или химерного белка, содержащего сайт связывания антитела, для лечения больного или облегчения его состояния.

**Иммунный ответ.** Совокупность физиологических процессов в организме, индуцируемых при попадании в него чужеродных антигенов.

**Иммуоаффинная хроматография.** Метод очистки, при котором фиксированное на матрице антитело связывает специфический белок, присутствующий в сложной смеси других белков.

**Иммунологический анализ.** Метод, основанный на способности антитела узнавать специфический компонент в биологическом образце.

**Иммуносупрессия.** Потеря способности иммунной системы организма к иммунному ответу на тот или иной антиген.

**Иммунотоксин.** Химерный белок, состоящий из двух доменов, один из которых обладает свойством антитела, другой – токсина. Первый домен обеспечивает связывание химерного белка со специфической молекулой или клеткой, второй инактивирует молекулу-мишень или убивает клетку.

**Ингибирование конечным продуктом.** Ингибирование фермента метаболитом – конечным продуктом метаболического пути.

**Индолил-3-уксусная кислота.** Растительный гормон, относящийся к классу ауксинов, стимулирующий рост растений.

**Индуктор.** Небольшая молекула, связывающаяся с регуляторным белком – репрессором, что приводит к дерепрессии соответствующих генов.

**Индукция.** Дерепрессия гена или группы генов под действием индуктора.

**Инициация.** Начало синтеза биополимера.

**Иницирующий кодон.** Сигнал инициации трансляции.

**Иницирующий комплекс.** Структура, необходимая для инициации синтеза полипептидной цепи рибосомами.

**Интеграция.** Встраивание чужеродной ДНК (обычно с помощью гомологичной рекомбинации) в хромосому хозяйской клетки.

**Интегрирующий вектор.** Вектор, специально сконструированный для того, чтобы с его помощью можно было встраивать (интегрировать) клонированную ДНК в геном клетки-хозяина.

**Интерлейкин-2.** Лимфокин, секретируемый некоторыми Т-лимфоцитами и стимулирующий пролиферацию Т-клеток.

**Инtron.** Транскрибируемый участок гена, не содержащий кодонов и вырезаемый из первичного транскрипта в ходе процессинга с образованием функциональной РНК.

**Ионный канал.** Трансмембранный белок, облегчающий транспорт определенных ионов.

**Исключение.** Вырезание сегмента ДНК из хромосомы или клонирующего вектора, осуществляемое *in vivo* или *in vitro* с помощью специфического фермента.

**Искусственная бактериальная хромосома.** Векторная система на основе F-плазмиды *E. coli*, используемая для клонирования длинных последовательностей.

**Капсид.** Белковая оболочка вирусной частицы.

**Картирование генов.** Определение положения данного гена на хромосоме относительно других генов.

**V-клетки.** Лимфоциты из клеток костного мозга, продуцирующие антитела.

**Клеточная линия.** Группа клеток, поддерживаемая в культуре путем процессов.

**Клеточно-опосредованный (клеточный) иммунитет.** Иммунные реакции, инициируемые клетками, а не антигенами или другими гуморальными факторами.

**Клон.** Популяция клеток или молекул, идентичных одной родоначальной клетке или молекуле.

**Клонирование.** Совокупность процедур, использующихся для получения клонов.

**Клонирование генов.** Система методов, использующаяся для получения клонированных ДНК: выделение нужного гена из какого-либо организма, встраивание его в плазмиду (вектор), введение в клетку организма-хозяина, многократная репликация.

**Клонирующий вектор.** Молекула ДНК (плазмидная или вирусная ДНК), предназначенная для клонирования ДНК-мишени.

**Кодон.** Три соседних нуклеотида, кодирующих определенную аминокислоту. Всего существует 64 сочетания нуклеотидов в кодонах; 61 из них кодирует 20 аминокислот, 3 являются нонсенс-кодонами.

**Компетенция.** Способность бактериальных клеток воспринимать трансформирующую ДНК (обычно плазмиду).

**Комплемент.** Белковый комплекс сыворотки крови, один из составляющих врожденного иммунитета. Принимает участие в регуляции воспалительных процессов, активации фагоцитоза и литическом дейст-

вии на клеточные мембраны; активизируется взаимодействием с иммунным комплексом.

**Комплементарная ДНК, кДНК.** Молекула ДНК, синтезированная на РНК-матрице с участием РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы).

**Комплементарные нуклеотидные последовательности.** Поли-нуклеотидные последовательности, которые взаимодействуют между собой в соответствии с правилами спаривания оснований: аденин образует пару с тиминном (или урацилом), гуанин – с цитозином.

**Конститутивный синтез.** Постоянно происходящий в клетке или целом организме синтез РНК или какого-либо белка.

**Конформационный полиморфизм одноцепочечной ДНК.** Различие в конформации одноцепочечных ДНК, отличающихся одна от другой всего одним нуклеотидом. Анализируемые ДНК подвергаются денатурации. Денатурированные цепи принимают разную конформацию и при геле-электрофорезе мигрируют с разной скоростью.

**Конъюгативные плазмиды.** Плазмиды, способные передаваться от одной клетки другой во время конъюгации.

**Конъюгация.** Форма полового процесса. У бактерий – однонаправленный перенос ДНК из одной контактирующей клетки в другую.

**Кофактор.** Низкомолекулярное вещество, необходимое для протекания определенной ферментативной реакции.

**Коферментация.** Одновременный рост двух микроорганизмов в одном биореакторе.

**Ксилоза.** Пятиуглеродный сахар, основной компонент гемицеллюлозы.

**Культура.** Популяция клеток или микроорганизмов, выращиваемых в контролируемых условиях *in vitro*.

**Культуральная среда.** Твердая или жидкая среда, использующаяся для выращивания микроорганизмов *in vitro*.

**Лигирование.** Соединение двух молекул ДНК с помощью фосфодиэфирных связей; *in vitro* катализируется ферментом ДНК-лигазой.

**Лигноцеллюлоза.** Комплекс лигнина, гемицеллюлозы, целлюлозы, составляющий структурный каркас клеточной стенки растений.

**Лизис.** Разрушение клеточных стенок под действием ферментов, содержащихся в лизосомах, или других агентов.

**Линкер.** Синтетический олигонуклеотид, содержащий сайт рестрикции. Используется для соединения векторной и клонируемой ДНК, к



концам которого по методу сшивания тупых концов присоединены линкеры.

**Липаза.** Фермент, расщепляющий липиды.

**Липкие концы.** Взаимно комплементарные одноцепочечные участки ДНК, выступающие по концам двухцепочечной молекулы; образуются в результате ступенчатых разрезов двухцепочечных ДНК.

**Липополисахарид.** Соединение, содержащее липид, связанный с полисахаридом. Один из компонентов клеточной стенки бактерий.

**Липосома.** Пузырек, образуемый одно- или двухслойной мембраной, состоящей из липидных молекул. Гидрофобная часть этих молекул обращена внутрь пузырька, гидрофильная – наружу. Внутри пузырька могут находиться нуклеиновые кислоты, лекарственные и др. вещества, адресно доставляемые липосомой.

**Литический цикл.** Размножение вируса в клетке-хозяине, оканчивающееся лизисом клетки.

**Локус.** Место на хромосоме, где находится специфический ген.

**Макрофаг.** Крупный лейкоцит, обладающий способностью к фагоцитозу.

**Маркерный ген.** Ген с известной хромосомной локализацией, имеющий четкое фенотипическое проявление (устойчивость к антибиотику, ферментативная активность и т.д.).

**Маркерный пептид.** Участок гибридной белковой молекулы, облегчающий идентификацию или очистку белка.

**Матричная РНК, мРНК.** Молекула РНК, в которой заключена информация об аминокислотной последовательности определенной белковой молекулы.

**Матричная цепь.** Цепь ДНК или другой полинуклеотид, используемый ДНК-полимеразой в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи.

**Мезофильные микроорганизмы.** Организмы, способные расти при температуре от 20 до 50 °С; оптимальная температура роста 37 °С.

**Меристема.** Ткань растений, обладающая способностью к активному делению. У молодых растений обычно находится у кончиков корней и побегов.

**Метаболизм.** Совокупность физических и химических процессов, протекающих в организме и обеспечивающих его существование. Продукты метаболизма называются метаболитами.

**Метаболическая перегрузка.** Нарушение метаболизма организма-хозяина в результате введения в его геном и экспрессии чужеродной ДНК.

**Мицелий.** Вегетативное тело гриба, состоящее из тонких ветвящихся нитей.

**Мишень.** В самом широком смысле – биологический объект (ткань, молекула, клетка, микроорганизм), которая интересует исследователя.

**Молекулярная диагностика.** Выявление молекулярно-биологическими методами патогенного микроорганизма, специфического вещества или измененной нуклеотидной последовательности, ответственных за то или иное заболевание.

**Моноклональные антитела.** Однотипные антитела; строго специфичные в отношении одного эпитопа (антигенной детерминанты). Синтезируются гибридами – клеточными гибридами, полученными при слиянии нормальных антителообразующих клеток с миеломной опухолевой клеткой, способной к неограниченному росту. Некоторые миеломные клетки синтезируют моноклональные тела самостоятельно.

**Мутагенез.** Искусственное введение мутаций с помощью физических или химических агентов.

**Мутант.** Организм, измененный в результате мутации; как правило, отличается от исходной формы (дикого типа).

**Мутация.** Спонтанное или индуцированное изменение структуры гена.

**Нарушение комплементарности.** Наличие в двухцепочечной молекуле ДНК одной или нескольких пар некомплементарных оснований.

**Неомицинофосфотрансфераза.** Фермент, инактивирующий антибиотик неомицин и канамицин; используется как селективный маркер для трансгенных растений.

**Непрерывная ферментация.** Культивирование микроорганизмов при непрерывном добавлении в биореактор среды и выведении такого же объема суспензии.

**Нуклеаза SI.** Фермент, специфически деградирующий одноцепочечную ДНК.

**Нуклеозид.** Пуриновое или пиримидиновое азотистое основание, ковалентно связанное с пятиуглеродным сахаром (пентозой). Если сахаром является рибоза, то вещество называется рибонуклеозид, а если дезоксирибоза – дезоксирибонуклеозид.

**Нуклеотид.** Нуклеозид, к которому присоединена одна или более фосфатных групп, присоединение происходит по 5'-углеродному атому сахарного кольца. Нуклеозиды, связанные с рибозой называются рибонуклеозидмонофосфатами, рибонуклеозиддифосфатами или рибонуклеозидтрифосфатами. Для нуклеозидов, связанных с дезоксирибозой, соответствующие названия таковы: дезоксирибонуклеозидмоно-, ди-, и трифосфаты.

**N-конец.** Первая аминокислота (или несколько аминокислот) в белковой молекуле.

**Обратная транскриптаза.** РНК-зависимая ДНК-полимераза, использующая молекулу РНК в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи ДНК.

**Обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция.** Способ получения в большом количестве кДНК, состоящий из двух этапов. Вначале *in vitro* синтезируют кДНК, используя обратную транскриптазу, мРНК в качестве матрицы, затем кДНК амплифицируют полимеразной цепной реакцией (ПЦР).

**Олигонуклеотид, олигомер.** Короткий (6–10 нуклеотидов) сегмент одноцепочечной ДНК; обычно получают химическим путем.

**Онкоген.** Ген, экспрессия которого приводит к неконтролируемой пролиферации (трансформации) клеток.

**Оператор.** Участок ДНК, непосредственно примыкающий к структурному гену и регулирующий его транскрипцию при участии репрессора или активатора.

**Оперон.** Участок ДНК, содержащий несколько структурных генов, транскрибируемых с образованием одной полицистронной мРНК.

**Отжиг.** Процесс образования двухцепочечных молекул (ДНК–ДНК или ДНК–РНК) из одиночных полинуклеотидных комплементарных цепей.

**Пассивный иммунитет.** Форма иммунитета, возникающая при введении в организм сыворотки, содержащей антитела, выработанные другим организмом в результате активной иммунизации.

**Пептид.** Короткая цепочка аминокислот, соединенных пептидными связями.

**Пептидил-тРНК.** Молекула тРНК с присоединенной к ней растущей полипептидной цепью.

**Пептидная вакцина.** Короткая цепочка из аминокислот, индуцирующая образование антител к специфическому инфекционному агенту.

**Пептидная связь.** Ковалентная связь между свободной карбоксильной группой при  $\alpha$ -углеродном атоме одной аминокислоты и свободной карбоксильной группой при таком же атоме соседней аминокислоты в полимерной цепи.

**Первичная культура.** Культура клеток или тканей, взятых непосредственно от организма.

**Периодическая ферментация.** Культивирование микроорганизмов в течение ограниченного интервала времени. Свежую среду инокулируют посевным материалом и проводят культивирование в непрерывном режиме, не добавляя новых порций среды и не удаляя продуктов, пока процесс не завершится сам собой.

**Периодическая ферментация с добавлением субстрата.** Культивирование микроорганизмов в течение ограниченного интервала времени с периодическим добавлением субстрата и сбором продукта только по завершении процесса.

**Периплазматическое пространство.** Пространство между плазматической мембраной бактериальной клетки и наружной мембраной или клеточной стенкой.

**Пиримидины.** Один из двух типов азотистых оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот; к пиримидинам относятся тимин, цитозин, урацил. Второй тип оснований – пурины; к ним относятся аденин, гуанин.

**Плаزمид.** Внехромосомный генетический элемент, способный к длительному автономному существованию и репликации.

**Плазмидная несовместимость.** Механизм регуляции числа копий плазмид одного типа в бактериальной клетке. Обеспечивает невозможность внутриклеточного сосуществования плазмид, принадлежащих к одной группе совместимости.

**Пластида.** Органелла растительных клеток (например, хлоропласт). Многие пластиды имеют собственный геном.

**Поливалентная вакцина.** Вакцина, дающая иммунный ответ на несколько инфекционных агентов или на разные эпитопы одной молекулы.

**Поликетидсинтетаза.** Фермент, участвующий в биосинтезе поликетидных антибиотиков.

**Поликетидные антибиотики.** Класс антибиотиков, которые образуются в результате последовательной ферментативной конденсации карбоновых кислот (ацетата, пропионата и др.).

**Полилинкер.** Короткий участок ДНК, содержащий несколько уникальных сайтов узнавания для эндонуклеаз; в эти сайты встраивают чужеродную ДНК (осуществляют клонирование).

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР).** Метод амплификации специфического сегмента ДНК с помощью термостабильной ДНК-полимеразы с использованием олигонуклеотидных ДНК-зондов, комплементарных последовательностям противоположных цепей ДНК, фланкирующим амплифицируемый сегмент. Процесс состоит из серии циклически повторяющихся реакций: денатурации ДНК, отжига зондов, синтеза ДНК.

**Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов.** Вариабельность длины фрагментов ДНК, образующихся при ее расщеплении рестриктазами. Обусловлена мутационным изменением сайтов рестрикции или появлением новых сайтов. Обнаруживается при разделении фрагментов с помощью гель-электрофореза.

**Полиморфный сайт.** Участок хромосомы, представленный в популяции более, чем одним вариантом и встречающийся с частотой не менее 1%.

**Полинуклеотид.** Линейный полимер, состоящий из 20 и более нуклеотидов, соединенных друг с другом фосфодиэфирными связями. Полинуклеотидами являются, например, молекулы ДНК и РНК.

**Полипептид.** Линейный полимер, состоящий из аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Полипептидом является, например, белковая молекула.

**Полицистронная мРНК.** Молекула мРНК, кодирующая более одного белка. Образуется при транскрипции двух или более соседних генов, входящих в состав одного оперона.

**Посттрансляционные модификации.** Изменение структуры белковых молекул после завершения их синтеза рибосомами. К таким модификациям относятся: фосфорилирование, гликозилирование, окисление цистеина, отщепление сигнальных последовательностей и т.д.

**Праймер.** Короткий олигонуклеотид, который гибридизируется с матрицей и служит затравкой при ее копировании.

**Прокариоты.** Организмы, у которых нет ограниченных мембранами ядра и органелл. К прокариотам относятся все бактерии.

**Промотор.** Участок молекулы ДНК, с которым связывается РНК-полимераза, что сопровождается инициацией транскрипции соответствующих генов.

**Протеиназы, протеолитические ферменты.** Ферменты, расщепляющие пептидные связи в белковых молекулах.

**Протеолиз.** Ферментативное расщепление белков.

**Протопласт.** Бактериальная, дрожжевая или растительная клетка, стенка которой разрушена ферментативным или химическим путем.

**Процессинг.** Совокупность процессов образования зрелых молекул РНК и белков в клетке. Включает ряд последовательных расщеплений молекулы-предшественника эндонуклеазой или протеиназами.

**Психрофилы.** Микроорганизмы, способные расти при температуре 0–5 °С.

**Пурины.** Один из двух типов азотистых оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот; к пуринам относятся аденин и гуанин. Второй тип оснований – пиримидины; к ним относятся тимин, урацил, цитозин.

**Реактор с механическим перемешиванием.** Биореактор, в котором для равномерного распределения газа по всему объему используются мешалки.

**Регуляторный белок.** Белок, «включающий» или «выключающий» транскрипцию.

**Рекомбинантная ДНК.** Молекула ДНК, полученная объединением *in vitro* разнородных, вместе нигде в природе не существующих фрагментов ДНК.

**Рекомбинантная плазмида.** Плазмида, измененная методами генной инженерии. Состоит из участков разных плазмид либо содержит сегменты ДНК других организмов.

**Рекомбинантный белок.** Белок, кодируемый клонированной рекомбинантной ДНК.

**Ренатурация.** Воссоединение цепей двухцепочечной ДНК, разошедшихся при денатурации.

**Репликация.** Процесс самовоспроизведения (синтеза) ДНК.

**Репрессия.** Один из альтернативных (наряду с индукцией) механизмов регуляции генов. Состоит в подавлении транскрипции или трансляции путем связывания белка-репрессора с опероном.

**Репрессор.** Белок, связывающийся с оператором или промотором данного гена и блокирующий связывание с этими элементами ДНК-полимеразы.

**Рестриктаза, рестрицирующая эндонуклеаза.** Бактериальный фермент, расщепляющий двухцепочечную молекулу ДНК в специфических сайтах.

**Рестрикционная карта.** Диаграмма расположения на молекуле ДНК сайтов узнавания рестриктазами.

**Ретровирусы.** Группа РНК-содержащих вирусов, содержащих обратную транскриптазу; синтезированная на РНК-матрице двухцепочечная ДНК может встраиваться в хромосому инфицированной этим вирусом клетки.

**Рибоза.** Пятиуглеродный моносахарид; входит в состав РНК.

**Рибозим.** Молекула РНК, обладающая ферментативной активностью.

**Рибонуклеиновая кислота, РНК.** Нуклеиновая кислота, состоящая из рибонуклеотидов, у которых сахаром является рибоза, а одним из пиримидинов – урацил (вместо тимина).

**Рибосома.** Клеточная органелла, рибонуклеопротеидная частица, при участии которой осуществляется синтез белка (трансляция). Состоит из двух субчастиц, большой и малой.

**Рибосомная РНК, рРНК.** РНК, входящая в состав рибосом.

**РНК-полимераза.** Фермент, осуществляющий синтез РНК из рибонуклеозидтрифосфатов. Матрицей может служить ДНК или РНК, соответствующие РНК-полимеразы называют ДНК- и РНК-зависимыми.

**Сайт встраивания (клонирования).** Специфический участок векторной молекулы, в который встраивают фрагмент чужеродной ДНК.

**Сайт рестрикции.** Нуклеотидная последовательность в молекуле ДНК, узнаваемая рестриктазой.

**Самореплицирующийся элемент.** Внехромосомная молекула нуклеиновой кислоты, способная к независимой от хромосомной ДНК-репликации. Примером такого же элемента служит плазида.

**Секвенирующий гель.** Длинная пластина полиэламинидного геля, позволяющая проводить электрофоретическое разделение олиго- и полинуклеотидов, различающихся по длине всего на 1 нуклеотид.

**Секреция.** Выведение веществ из клетки во внешнюю среду.

**Сигма-фактор.** Бактериальный белок, обеспечивающий узнавание ДНК-полимеразой ее участка связывания в молекуле ДНК и инициацию транскрипции.

**Сигнальная последовательность.** Нуклеотидная последовательность в гене, служащая местом связывания белка (фактора транскрипции), который регулирует транскрипцию.

**Сигнальный пептид, сигнальная последовательность, лидерный пептид.** N-концевой участок белковой молекулы длиной 15–30 аминокислот, обеспечивающий секрецию белка. После секреции этот участок отщепляется от белковой молекулы.

**Симбиоз.** Сосуществование разных организмов, при котором каждый из них выполняет свои функции. В некоторых случаях взаимовыгодно.

**Система комплемента.** Серия последовательных процессов активации комплемента (сложного белкового комплекса сыворотки крови) и ферментативных реакций, запускаемая в ответ на образование комплекса антиген-антитело.

**Соматическая клетка.** Любая неполовая клетка многоклеточного организма.

**Сплайсинг.** Вырезание из предшественника мРНК интронов и ковалентное соединение экзонов с образованием зрелых молекул мРНК.

**Стационарное состояние.** Состояние непрерывного процесса ферментации, при котором число клеток, удаляемых из ферментера и поступающих в него, одинаково.

**Стволовые клетки.** Митотически активные стволовые клетки, в результате деления которых в многоклеточном организме происходит замещение погибших клеток в многоклеточном организме.

**Структурный ген.** Ген, кодирующий какой-либо белок.

**Ступенчатый разрыв.** Разрезание двухцепочковой ДНК, при котором разрывы в комплементарных цепях располагаются не строго один напротив другого, а немного смещены.

**Субклонирование.** Перенос части уже клонированной молекулы ДНК в другой клонирующий вектор.

**Субстрат.** Вещество, превращение которого катализируется специфическим ферментом.

**Субъединичная вакцина.** Вакцина, содержащая лишь отдельные компоненты патогенного микроорганизма.

**Супрессия.** Восстановление утраченной генетической функции, обусловленное подавлением эффекта одной мутации под действием второй.

**Тандемный повтор.** Нуклеотидная последовательность, состоящая из нескольких одинаковых элементов, соединенных «голова к хвосту».

**Терминация.** Остановка синтеза макромолекулы.

**Терминирующий кодон.** Кодон, определяющий окончание (терминацию) синтеза полинуклеотидной цепи.

**Тимин.** Пиримидиновое основание; одно из четырех азотистых оснований, входящих в состав ДНК.

**Тканевой активатор плазминогена.** Белок, участвующий в разрушении сгустков крови.

**Т-клетки.** Лимфоциты, играющие ключевую роль в иммунном ответе.

***T<sub>H</sub>-лимфоциты, Т-хелперы.*** Т-лимфоциты, играющие основную роль в узнавании чужеродного антигена.

***Трансгенный организм.*** Организм, геном которого содержит чужеродный генетический материал, включенный методами генной инженерии.

***Трансгенез.*** Введение чужеродного гена в растительную или животную клетку и его передача в ряду поколений.

***Транскрипция.*** Процесс синтеза РНК, катализируемый РНК-полимеразой, в котором в качестве матрицы используется одна из цепей ДНК.

***Транслокация.*** 1. Хромосомная перестройка, заключающаяся в переносе участка хромосомы в новое положение на той же или на другой хромосоме или в переносе целой хромосомы на другую хромосому. 2. Перемещение молекулы мРНК во время трансляции на один кодон.

***Трансляция.*** Синтез полипептидной цепи рибосомой с использованием в качестве матрицы мРНК.

***Транпозаза.*** Фермент, участвующий в транспозиции (перемещении из одного сайта в другой) некоторых мобильных генетических элементов.

***Транспортная РНК, тРНК.*** Молекула РНК, выступающая в роли адаптора при специфическом переносе аминокислот к растущей полипептидной цепи в процессе трансляции.

***Трансфекция.*** Искусственное введение в эукариотические клетки изолированных молекул ДНК.

***Трансформация.*** 1. Перенос генетической информации в бактериальные клетки с участием плазмид или без них, но всегда – без участия вирусов. 2. Превращение нормальных клеток животных в опухолевые.

***Тупой конец.*** Конец двухцепочечной молекулы ДНК, у которого не выступает ни одна из цепей.

***Урацил.*** Пиримидиновое основание; одно из четырех азотистых оснований, входящих в состав РНК.

***Устойчивые клеточные линии.*** Культуры клеток, способные к неограниченному росту *in vitro*. Получаются из перевиваемых клеточных культур, часть клеток которых приобретают селективные преимущества и обладают повышенной скоростью роста.

***Фактор транскрипции.*** Белок, помогающий РНК-полимеразе пройти все этапы транскрипции и обеспечивающий избирательность этого процесса.

***Фенотип.*** Совокупность всех признаков особи, формирующаяся в процессе взаимодействия ее генотипа и внешней среды.

***Ферментация.*** В промышленной микробиологии – крупномасштабное культивирование микроорганизмов в специальных емкостях (ферментерах, биореакторах).

***Хромосома.*** Структура, основу которой составляет конденсированная молекула ДНК; носитель генетической информации. Хромосома способна к воспроизведению с сохранением структурно-функциональной индивидуальности в ряду поколений. У эукариот находится в ядре клетки, у прокариот – непосредственно в цитоплазме.

***Хромосомный сайт интеграции.*** Место в хромосоме, куда может встроиться чужеродная ДНК, часто без всяких последствий для организма-хозяина.

***Центрифугирование в градиенте плотности сахарозы.*** Метод разделения макромолекул по форме и размеру, основанный на различии их коэффициентов седиментации.

***Цитозин.*** Одно из четырех азотистых оснований, входящее в состав ДНК и РНК.

***Цитокинины.*** Растительные гормоны, индуцирующие деление клеток.

***Частота трансформации.*** Доля клеток в клеточной популяции, получивших чужеродную ДНК; выражается числом трансформантов к общему числу клеток.

***Челночный вектор.*** Плазмидная ДНК, способная реплицироваться в клетках двух разных типов (например, *E.coli* и клетках дрожжей).

***Штамм.*** Культура генетически однородных микроорганизмов.

***Экзогенная ДНК.*** ДНК, выделенная из организма-донора и встроившаяся в вектор или хромосомную ДНК организма-хозяина; называется также чужеродной и гетерологичной ДНК.

***Экзон.*** Участок гена, входящий в состав первичного транскрипта, который остается в нем после процессинга (вырезание интронов). Вместе с другими экзонами образует зрелую мРНК.

***Экспрессирующий вектор.*** Плазмидный вектор, сконструированный таким образом, чтобы клонированный ген экспрессировался только в определенной фазе клеточного цикла и только в течение определенного времени. Для этого в плазмиду встраивают сильный регулируемый промотор.

***Экспрессия.*** Транскрипция и трансляция гена.

**Электропорация.** Образование пор в клеточных мембранах под действием электрического тока. Через эти поры в клетки проникает чужеродная ДНК.

**Электрофорез.** Метод разделения заряженных молекул (ДНК, РНК или белков), основанный на разной скорости их перемещения в электрическом поле.

**Элонгация.** Последовательное присоединение мономеров к полимерной цепи.

**Эндонуклеаза.** Фермент, гидролизующий внутренние фосфодиэфирные связи и расщепляющий молекулы ДНК и РНК. Эндонуклеазы участвуют в рекомбинации, репарации и рестрикции; в последнем случае называются рестриктазами (рестрицирующими эндонуклеазами).

**Эндотоксин.** Токсин, не выделяемый клеткой в окружающую среду, а входящий в состав клеточной стенки; многие эндотоксины вырабатываются грамотрицательными бактериями и вызывают воспаление.

**Эрлифтный биореактор.** Цилиндрический биореактор, в котором перемешивание осуществляется потоком газа, подаваемого снизу.

**Эукариоты.** Организмы, у которых: 1) имеется ядро, где содержатся хромосомы; 2) в цитоплазме присутствуют различные органеллы – митохондрии, хлоропласты и т.д. К эукариотам относятся животные, растения, грибы, некоторые водоросли.

**«Эффект свидетеля».** Уничтожение немодифицированных опухолевых клеток цитотоксичным продуктом, синтезируемым соседними генетически трансформированными клетками.

**Эффектор.** Небольшая молекула, связывающаяся с репрессором или ферментом и приводящая к их ингибированию или активации.

**Эффекторные клетки.** Клетки иммунной системы, разрушающие антигены.

#### Ответы на тестовые задания к итоговой аттестации

001-г	023-г	045-в	067-г
002-б	024-в	046-б	068-г
003-б	025-в	047-г	069-б
004-в	026-а	048-в	070-в
005-в	027-в	049-в	071-а
006-в	028-г	050-б	072-в
007-а	029-в	051-а	073-в
008-б	030-г	052-б	074-б
009-б	031-в	053-в	075-б
010-а	032-в	054-в	076-в
011-в	033-в	055-г	077-в
012-в	034-а	056-г	078-а
013-б	035-г	057-г	079-в
014-г	036-г	058-г	080-в
015-г	037-в	059-б	081-в
016-г	038-в	060-в	082-в
017-г	039-в	061-а	083-в
018-г	040-б	062-г	084-а
019-в	041-д	063-в	085-г
020-б	042-в	064-б	086-в
021-г	043-а	065-б	087-в
022-в	044-г	066-в	

## Список использованной литературы

1. Альбертс Б. Молекулярная биология клетки: Пер. с англ. / Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис. – М.: Мир, 1994. – Т. 1. – 515 с.
2. Барзашка-Попова С.Н. Коррекция микрофлоры кишечника при дисбактериозе с помощью лактобацилл / С.Н. Барзашка-Попова: Автореф. дис. ... к.б.н. – М., 1990. – 22 с.
3. Белявская В.А. Перспективы создания рекомбинантных штаммов бацилл для конструирования новых пробиотиков / В.А. Белявская: Автореф. дис. ... к.б.н. – Киев, 1992. – 41 с.
4. Биотехнология: Учебное пособие для вузов / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: 1987.
5. Блохина И.Н., Леванова Г.Ф. Традиционная классификация и геносистематика бактерий рода *Lactobacillus* // Микробиология, эпидемиология, иммунология. – 1995. – № 4. – С. 19–23.
6. Бертрам Г. Базисная клиническая фармакология / Г. Бертрам, Гатцунг – М.: Бином, СПб.: Невский Диалект, 1998. – Т. 1. – 609 с.; – Т. 2. – 669 с.
7. Вакула В.А. Биотехнология, что это такое. – М.: Молодая гвардия, 1989. – 32 с.
8. Васканий И.А., Мельникова В.А. Процессы культивирования. – М.: 1987.
9. Вудворд Дж. Имобилизованные клетки и ферменты: Пер. с англ. – М.: Мир, 1988. – 215 с.
10. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М., Мир, 2002. – 589 с.
11. Государственный реестр лекарственных средств / Под ред. А.В. Катлинского и др. – М., 2002. – Т. 1. – 1316 с.
12. Дзегиленко Н.Б., Властихина Е.М. Тромболитики и антикоагулянты, получаемые методом биотехнологии за рубежом. Обзорная информация. Хим.-фарм. пром. – М., 1989. – Вып. 2. – 43 с.
13. Долинов К.Е. Основы технологии сухих биопрепаратов. – М., 1969. – 170 с.
14. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник. – М.: Изд-во МГУ, 1994. – 512 с.
15. Зорин Н.А. Получение препаратов  $\alpha_2$ -макроглобулина с заданными свойствами / Н.А. Зорин, Р.М. Зорина, В.Н. Зорина // Гематология и трансфузиология. – 2000. – Т. 45. – № 5. – С. 20–21.
16. Качура В.И. Способ высушивания молочнокислых бактерий // Виноделие и виноградарство СССР. – 1985. – № 2. – С. 49–50.
17. Коваленко Н.К., Касумова С.А. и др. Использование селекционированных штаммов молочнокислых бактерий для получения лечебно-профилактических продуктов // Микробиол. журн. – 1990. – № 8. – С. 45–49.
18. Лобанюк А.Г. Биотехнология микробных ферментов / А.Г. Лобанюк, Н.И. Астапович, Р.В. Михайлова. – Минск: Наука и техника, 1989. – 205 с.
19. Михайлов И.Б. Клиническая фармакология / И.Б. Михайлов. – СПб., 1998. – 473 с.
20. Навашин С.М., Сазыкин Ю.О. Перспективы современной биотехнологии в области антибиотиков. Биотехнология / Под ред. А.А. Баева. – М.: Наука, 1984. – 309 с.
21. Навашин С.М. Отечественному пенициллину 50 лет: история и прогнозы // Антибиотики и химиотерапия. – 1994. – Т. 39. – № 1. – С. 3.
22. Самуйленко А.Я., Рубан Е.А. Основы технологии производства ветеринарных биологических препаратов. – М., 2000. – Т. 1, 2.
23. Основы молекулярной медицины: В 2-х т. / Под ред. Дж. Джеймсона: Пер. с англ. – М.: Мир, 2002. – Т. 1. – 444 с.; Т. 2. – 346 с.
24. Петров В.Ф., Сафонова Г.М. Получение природных биологически активных препаратов – новое направление исследований НПО «Биомед» // Микробиология. – 1998. – № 2. – С. 95–97.
25. Промышленная технология лекарств: В 2-х т. / Под ред. В.И. Чуешова. – Харьков: НФАУ, МТК-книга, 2002. – Т. 1. – 557 с.; Т. 2. – 714 с.
26. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды: Пер. с англ. / А. Сассон. – М.: Мир, 1987. – 410 с.
27. Сингер М., Берг П. Гены и геномы: В 2-х т.: Пер. с англ. – М.: Мир, 2002. – Т. 1, 2.
28. Сорокулова И.Б., Белявская В.А. Рекомбинантные пробиотики: проблемы и перспективы использования в медицине и ветеринарии. // Вест. Рос. АМН. – 1997. – № 3. – С. 17–19.
29. Современная микробиология: В 2-х т. / Под ред. Г. Шлегеля: Пер. с англ. – М.: Мир, 2002. – Т. 1, 2.
30. Технология лекарственных форм: В 2-х т. / Под ред. Т.С. Кондратьевой, Л.А. Ивановой. – М.: Медицина, 1991. – Т. 1. – 496 с.; Т. 2. – 544 с.
31. Типовые тестовые задания для итоговой государственной аттестации выпускников высших медицинских и фармацевтических учебных заведений по специальности 040500 – фармация / Под ред. А.П. Арзамасцева, П.Ф. Литвицкого. – М.: ГОУ ВУНЦМЦ МЗ РФ, 2004. – 203 с.
32. Тюрин М.В. Антибиотики и микробиология человека и животных. – М., 1988. – С. 175–178.
33. Фармацевтическая микробиология / В.А. Галынкин, Н.А. Заикина, В.И. Кочеровец, Т.С. Потехина. – М.: Арнебия, 2003. – 252 с.
34. Шевелёва С.А. Антибиотики в продуктах питания. Новые аспекты проблемы // Вопросы питания. – 1994. – № 4. – С. 23–28.

*Серия «Высшее образование»*

**Татьяна Петровна Прищеп,  
Владимир Сергеевич Чучалин,  
Константин Леонардович Зайков,  
Людмила Карловна Михалева,  
Лидия Семеновна Белова**

## **Основы фармацевтической биотехнологии**

*Учебное пособие*

Редакторы *Т. Портнова  
А. Михайленко*

Макет обложки: *А. Пащенко*

Компьютерная верстка: *Л. Пермяков*

Сдано в набор 1.03.06.

Подписано в печать 1.05.06.

Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага типографская №2.

Печать офсетная. Гарнитура Times.

Тираж 4000 экз. Заказ № 171.

Издательство «Феникс»

344082, г. Ростов-на-Дону, пер. Халтуринский, 80.

Отпечатано с готовых диапозитивов в ЗАО «Книга».

344019, г. Ростов-на-Дону, ул. Советская, 57.

Качество печати соответствует предоставленным диапозитивам.