

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
УО «ВИТЕБСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
КАФЕДРА СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
С КУРСОМ ФАКУЛЬТЕТА ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ И
ПЕРЕПОДГОТОВКИ КАДРОВ**

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

ПОСОБИЕ

Под редакцией Д.В. Моисеева

Рекомендовано Учебно-методическим объединением по высшему медицинскому, фармацевтическому образованию в качестве пособия для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по специальности 1 – 79 01 08 «Фармация»

Витебск
2019

УДК 615.1: 574 (075.8)

ББК 52.82+28.087я73

М74

Рецензенты:

кафедра организации фармации УО «Белорусский государственный медицинский университет» (зав. кафедрой, доцент **О.В. Мушкина**);

В.М. Царенков – главный научный специалист фармацевтического предприятия ООО «Фармтехнология», «Заслуженный работник промышленности Республики Беларусь», доктор фармацевтических наук

М 74 Моисеев, Д.В., Лукашов, Р.И., Веремчук, О.А., Моисеева, А.М.
Фармацевтическая биотехнология : пособие / Д.В. Моисеев, Р.И. Лукашов, О.А. Веремчук, А.М. Моисеева // под ред. Д.В. Моисеева. – Витебск: ВГМУ, 2019. – 293 с.

ISBN 978-985-466-906-9

Данное пособие составлено на основании типовой программы по фармацевтической биотехнологии и предназначено для студентов ВУЗов, обучающихся по специальности «Фармация», слушателей факультета повышения квалификации, аспирантов.

Рекомендовано к изданию Учебно-методическим объединением по высшему медицинскому, фармацевтическому образованию в качестве пособия для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по специальности 1 – 79 01 08 «Фармация»

УДК 615.1: 574 (075.8)

ББК 52.82+28.087я73

ISBN 978-985-466-906-9

©УО «Витебский государственный
ордена Дружбы народов
медицинский университет», 2019
© Д.В. Моисеев, Р.И. Лукашов,
О.А. Веремчук, А.М. Моисеева, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
Список сокращений и условных обозначений.....	6
ЧАСТЬ I. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ.....	8
Глава 1. Биотехнология как наука. История развития.....	9
Глава 2. Особенности разработки и регистрации биотехнологических лекарственных средств.....	20
Глава 3. GMP на биотехнологическом производстве.....	36
Глава 4. Аппаратура для биотехнологического производства. Биореакторы.....	50
Глава 5. Питательные среды для культивирования. Регулирование ферментации.....	62
Глава 6. Методические подходы к выделению и очистке целевых продуктов биотехнологического производства.....	71
Глава 7. Экологическая и биологическая безопасность в биотехнологическом производстве.....	83
ЧАСТЬ II. ЧАСТНЫЕ ВОПРОСЫ БИОТЕХНОЛОГИИ. КЛЕТОЧНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ.....	87
Глава 8. Генная инженерия в фармацевтической биотехнологии.....	88
Глава 9. Культивирование изолированных клеток человека и животных.....	99
Глава 10. Получение лекарственных средств на основе цитокинов (интерфероны).....	105
Глава 11. Технология получения вакцин.....	115
Глава 12. Технология получения сывороток и препаратов моноклональных антител.....	129
Глава 13. Методы контроля качества лекарственных средств, полученных из клеток животного происхождения. Организации Республики Беларусь, занимающиеся производством и контролем качества биотехнологических лекарственных средств.....	143
Глава 14. Культивирование растительных клеток.....	152

ЧАСТЬ III. ЧАСТНЫЕ ВОПРОСЫ БИОТЕХНОЛОГИИ.

МИКРОБНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ.....	171
Глава 15. Молочнокислое брожение. Технология получения и стандартизация пробиотиков.....	172
Глава 16. Технология получения и стандартизация витаминов.....	187
Глава 17. Технология получения и стандартизация аминокислот, органических кислот и спиртов.....	199
Глава 18. Технология получения и стандартизация декстранов.....	219
Глава 19. Технология получения и стандартизация ферментов.....	230
Глава 20. Технология получения и стандартизация тромболитиков и антикоагулянтов.....	245
Глава 21. Технология получения и стандартизация стероидных гормонов и инсулина.....	254
Глава 22. Технология получения и стандартизация антибиотиков.....	271
Литература.....	290

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология – одна из важнейших современных научных дисциплин, необходимых провизору, работающему как в испытательных лабораториях фармацевтических и биотехнологических предприятий, выпускающих лекарственные средства, так и в аптеках. Знакомство с биотехнологией необходимо всем выпускникам медицинских вузов независимо от их специализации: биотехнологические методы все более интенсивно проникают в практику диагностики, профилактики и лечения различных заболеваний, современные же концепции биотехнологии способствуют формированию мировоззрения человека, адекватного стремительному течению научно-технического прогресса в современном мире.

Фармацевтическая биотехнология представляет собой одно из перспективных направлений. В частности, моноклональные антитела применяются в таргетной терапии и иммунопрофилактике населения. Микроорганизмы используются в получении таких важных классов соединений, как антибиотики, гормоны, витамины, ферменты и др. Благодаря достижениям генной инженерии наблюдается значительный прогресс в производстве рекомбинантных препаратов, вакцин, селективных аллергенов и реагентов для современных диагностических методов. Фармацевтическая биотехнология позволяет получать высокоэффективные препараты при минимальных затратах и максимальной защите окружающей среды.

Пособие «Фармацевтическая биотехнология» предназначено для студентов медицинских и фармацевтических вузов, обучающихся по специальности «Фармация». Он раскрывает основные механизмы биотехнологических процессов при получении ряда лекарственных и профилактических препаратов и знакомит студентов со способами их применения. Цикл нацелен на формирование ключевых компетенций, необходимых для эффективного решения профессиональных задач и организации профессиональной деятельности будущих специалистов-провизоров.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- 5,6-ДМБ – 5,6-диметилбензимидазол
6-АПК – 6-аминопенициланная кислота
А – аденин
АГ – антиген
АЕ – антитоксическая единица
АТ – антитело
АФИ – активный фармацевтический ингредиент
БАВ – биологически активное вещество
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
Г – гуанин
ГЖХ – газожидкостная хроматография
ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный
колониестимулирующий фактор
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
ИЛ – интерлейкин
ИНФ – интерферон
кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛС – лекарственное средство
ММ – молекулярная масса
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция
ОТД (СТД) – Общий технический документ (Common Technical
Documentation)
ПМ – посевной материал
ПФ – пентозофосфат
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РАТ – process analytical technologies
РИА – радиоммунологический анализ
РНК – рибонуклеиновая кислота
СО – стандартный образец
СОП – стандартная операционная процедура
Т – тимин

ТИФА – твердофазный иммуноферментный анализ
ТКП – технический кодекс установившейся практики
ТСХ – тонкослойная хроматография
Тх1 – Т-хелпер 1 типа
ФНО – фактор некроза опухоли
ФДФ – фруктозо-1,6-дифосфат
ФАД – флавинадениннуклеотид
ФМН – флавинмононуклеотид
Ц – цитозин
ЦПД – цитопатическое действие
ЦЭИЗ – Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
ЕМА – European Medicines Agency, Европейское Агентство по лекарственным средствам
GMP – Good Manufacturing Practice, Надлежащая производственная практика
HLA – Human Leucocyte Antigens, человеческие лейкоцитарные антигены
ICH – The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для человека
ISO – International Organisation for Standardization, Международная организация по стандартизации
R&D – Research and Development, научно-исследовательский
rt-PA – recombinant tissue plasminogen activator, рекомбинантный тканевый активатор плазминогена
TGF- β – transforming growth factor beta, трансформирующий ростовой фактор бета

ЧАСТЬ I.
ОБЩИЕ ВОПРОСЫ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ
БИОТЕХНОЛОГИИ

Глава 1

Биотехнология как наука. История развития

Вопросы для самоподготовки

1. Биотехнология и фармацевтическая биотехнология. Связь с другими науками.
2. Исторические этапы развития биотехнологии. Биотехнология в СССР и в Республике Беларусь.
3. Группы лекарственных средств, получаемых биотехнологическими методами. Отличия биотехнологического производства от производства синтетических лекарственных средств.
4. Основные биообъекты биотехнологии.

1.1 Биотехнология и фармацевтическая биотехнология. Связь с другими науками

Биотехнология – это совокупность технологических процессов, осуществляемых с помощью живых систем (клетки животных и растений, микроорганизмы) и их компонентов с целью получения полезных для человека продуктов.

Впервые термин «биотехнология» в 1917 году применил венгерский инженер *Карл Эреки*. До 1971 года термин «биотехнология» использовался, большей частью, в пищевой промышленности и сельском хозяйстве. С 1970 года ученые используют термин в применении к лабораторным методам, таким, как использование рекомбинантной ДНК и культур клеток, выращиваемых *in vitro*.

В фармацевтической биотехнологии конечным продуктом является фармацевтическая субстанция или лекарственное средство.

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

Таким образом, *фармацевтическая биотехнология* – учебная дисциплина, содержащая систематизированные научные знания о способах получения лекарственных средств и фармацевтических субстанций с помощью живых систем, а также методах контроля их качества.

Задачи биотехнологии и связь с другими науками

Использование научных достижений и практические успехи современной биотехнологии обеспечиваются фундаментальными исследованиями и реализуются на самом высоком уровне современной науки. Поэтому развитие биотехнологии и научные достижения теснейшим образом взаимосвязаны и зависят от комплекса знаний не только наук биологического профиля, но также и многих других (рисунок 1.1).

Задачи биотехнологии заключаются в создании:

- новых биологически активных веществ и лекарственных средств для эффективной профилактики, диагностики и лечения людей и животных;
- средств защиты растений от болезней и вредителей, бактериальных удобрений и регуляторов роста растений, новых высокопродуктивных и устойчивых к неблагоприятным факторам окружающей среды сортов сельскохозяйственных растений;
- ценных кормовых добавок и биологически активных веществ (кормового белка, аминокислот, ферментов, витаминов и т.п.) для применения в животноводстве для повышения продуктивности;
- новых технологий для получения ценных продуктов для использования в пищевой, химической, микробиологической, нефтеперерабатывающей и других отраслях промышленности;
- безотходных и экологически безопасных технологий утилизации и биоконверсии отходов для получения энергоносителей (биогаза), высококачественного органического удобрения, белковых и витаминных добавок.

Глава 1. БИОТЕХНОЛОГИЯ КАК НАУКА. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ



Рисунок 1.1 – База и продукты биотехнологии (по Б.Глику, Дж. Пастернаку)

Из представленных продуктов непосредственно к фармацевтическим продуктам относятся лекарственные средства и вакцины. Для успешного овладения фармацевтической биотехнологией как учебной дисциплиной будущему провизору необходимы знания по следующим разделам ранее изученных дисциплин.

Биология. Генная инженерия. Получение генетического материала. Введение генетического материала. Включение новых генов в генетический аппарат клетки.

Микробиология. Питание бактерий, источники углерода, азота и минеральных веществ. Факторы роста бактерий. Рост и размножение бактерий. Фазы размножения бактериальной популяции в жидкой и плотной питательных средах. Антитела (иммуноглобулины). Классы иммуноглобулинов, их основные характеристики. Моноклональные антитела, способы получения, значение. Характеристика современных вакцин: живых, убитых и химических вакцин, анатоксинов, ассоциированных вакцин, генноинженерных и синтетических вакцин. Государственный контроль качества вакцин и иммуноглобулинов. Иммуномодуляторы (интерфероны, интерлейкины).

Фармацевтическая химия. Нормативная документация, регламентирующая качество фармацевтических субстанций и лекарственных средств. Классификация антибиотиков по химической структуре, механизму и направленности действия, а также способам получения.

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

Промышленная технология лекарственных средств. Правила Надлежащей производственной практики. Процессы и аппараты промышленной технологии. Валидация процессов производства стерильных и нестерильных лекарственных средств. Порядок подготовки воды для фармацевтических целей. Аттестация чистых помещений и систем водоподготовки.

1.2 Исторические этапы развития биотехнологии. Биотехнология в СССР и Республике Беларусь

В развитии биотехнологии выделяют несколько исторических этапов:

- Исторические времена – производство продуктов и напитков на основе микробиологической ферментации.
- С конца 19 века – производство химических веществ (цитрат, ацетат) и растворителей (ацетон, этанол, бутанол, изопропанол).
- С 1940 года – синтез антибиотиков.
- С 1960 года – производство белков и пептидов.
- С 1980 года – синтез стероидных гормонов.
- С 2000 года – промышленное производство моноклональных антител.

Развитие биотехнологии в СССР

В СССР успешно развивалась биотехнология антибиотиков, и к 1988 году СССР занимал 2-е место в мире по их производству после США. Продуктами микробиологической промышленности являются антибиотики, аминокислоты и нуклеозиды, ферменты, биологические средства для борьбы с насекомыми (инсектициды), кормовой белок, витамины, этиловый и бутиловый спирты, ацетон, полисахариды, бактерии-азотфиксаторы, бактерии-биодegradанты вредных веществ и т.д. Разработка методов генной инженерии позволила наладить микробиологическое производство ценных белков человека и сельскохозяйственных животных (интерферон, гормон роста и т.д.). В СССР первые работы с рекомбинантными ДНК были начаты в 70-х гг. прошлого столетия. Центром отечественной генной инженерии являлась Москва (Институт молекулярной биологии, Институт биоорганической

Глава 1. БИОТЕХНОЛОГИЯ КАК НАУКА. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ

химии, Институт вирусологии). Под руководством академика *А.А. Баева* были созданы бактериальные штаммы продуценты интерферона, инсулина, гормона роста человека; проведены клинические испытания препаратов. Большие исследования в области генной инженерии в первой половине 80-х гг. были проведены в Новосибирске и других регионах. Вопросами совершенствования промышленных микроорганизмов традиционно занимаются микробиологи-селекционеры. Многолетняя селекция штаммов-продуцентов пенициллина позволила поднять активность от 100 до 40 000 ед/мл и более. Задача создания высокопродуктивных штаммов намного упрощается, если селекционер имеет достаточно знаний о путях биосинтеза того или иного метаболита и имеются способы генетического обмена у исследуемого микроорганизма, позволяющие собрать в одном штамме все полезные мутации и элиминировать все вредные. Развитие метаболической инженерии, расшифровка молекулярных механизмов репликации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), транскрипции и трансляции, регуляции активности и экспрессии генов дали возможность на современном этапе развития биотехнологии сознательно конструировать штаммы микроорганизмов с заданными свойствами. Применение названных подходов в сочетании с применением классической селекции и составляет суть современной селекции микроорганизмов, участвующих в том или ином биотехнологическом процессе.

Развитие биотехнологии в Республике Беларусь

В Республике Беларусь планируется создать несколько сортов растений, в том числе трансгенных, разработать методы ДНК-диагностики заболеваний человека, получить рекомбинатные формы микроорганизмов. Программой предусмотрено и техническое перевооружение биологической отрасли промышленности. Так, планируется модернизировать 15 микробиологических производств, осуществить полное переоснащение Новополоцкого завода белково-витаминных концентратов и Бобруйского гидролизного завода. Также намечено построить два новых завода и создать три биотехнологических селекционных животноводческих центра. В 2002 году наше государство приняло решение о присоединении к Картахенскому протоколу по биобезопасности – международному документу, который регулирует ввоз и вывоз генно-инженерных организмов. Тогда был разработан проект Закона Республики Беларусь о безопасности генно-инженерной деятельности. В первом чтении он уже

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

принят в Палате представителей Национального собрания. В 2005 году постановлением Совета Министров Республики Беларусь была принята программа по развитию генно-инженерной биотехнологии для нужд медицины и сельского хозяйства. В рамках ее должны осуществиться более трех десятков научных проектов по созданию генно-инженерных организмов. В настоящее время ученые работают в рамках проекта международной технической помощи, финансируемого программой ООН по окружающей среде и Глобальным экологическим фондом.

Особенностью научных разработок в области биотехнологий в Республике Беларусь является их направленность на внедрение. Разработана государственная программа «Биотехнологии», которая пролонгирована на 2016–2020 гг. Концепция программы одобрена правительством. Структурно программа состоит из 6 подпрограмм: геномные технологии, клеточные технологии, микробные технологии, биотехнологии для агропромышленного комплекса, медицинские биотехнологии, подготовка кадров. Данная программа является органичным продолжением уже начатых работ в данной области с 2010 года. Планируется создание 12 новых предприятий и модернизация 10 производственных участков предприятий, как за счет собственных средств, так и за счет госбюджета. В программе представлены 95 новых технологий, которые уже подтверждены проектами. Цель данной программы – разработка и усвоение новых видов биотехнологических продуктов и услуг 5 и 6 технологических укладов, развитие рынка биотехнологических продуктов и услуг республики в соответствии с мировыми тенденциями. Большой поддержкой для реализации данной программы должно стать создание национального биотехнологического парка «БелБиоград» – особой экономической зоны со специальным налоговым режимом, где будут реализовываться проекты в сфере биотехнологий, фармации, наносистемной техники.

Перспективные направления развития биотехнологии:

- генная инженерия (гормоны для человека, вакцины, трансгенные растения и животные);
- получение первичных и вторичных метаболитов (аминокислоты, витамины, интерфероны, вакцины, антибиотики и др.);
- инженерная энзимология (ферменты, биосенсоры и биочипы);

Глава 1. БИОТЕХНОЛОГИЯ КАК НАУКА. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ

- клеточная и тканевая инженерия растений (каллусные и суспензионные культуры растений);
- экологическая биотехнология (утилизация твердых, жидких и газообразных отходов).

1.3 Группы лекарственных средств, получаемых биотехнологическими методами. Отличия биотехнологического производства от производства синтетических лекарственных средств

Основные группы лекарственных средств и фармацевтических субстанций, получаемые биотехнологическими методами:

- антибиотики (пенициллины, макролиды, тетрациклины, стрептомицин);
- гормоны (инсулин, стероидные гормоны, соматотропин);
- моноклональные антитела;
- цитокины (интерфероны);
- вакцины нового поколения;
- пробиотики (лактобактерин, бифидумбактерин);
- сыворотки (против яда змей, насекомых);
- каллусные культуры растений (суспензионная культура клеток женьшеня);
- ферменты (стрептокиназа, амилаза, липаза, протеаза) и их блокаторы;
- витамины (В₂, В₁₂, D₃);
- аминокислоты (лизин, триптофан);
- декстраны (плазмозамещающие растворы);
- спирты (этанол);
- пыльцевые аллергены;
- низкомолекулярные гепарины;
- стволовые клетки.

Отличия биотехнологических процессов от производства синтетических лекарственных средств

По сравнению с химической технологией биотехнология имеет ряд следующих основных *преимуществ*:

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

1. Возможность получения специфичных и уникальных природных веществ, часть из которых (например, белки, ДНК) затруднительно получать путем химического синтеза.

2. Проведение биотехнологических процессов при относительно невысоких температурах и давлениях.

3. Микроорганизмы имеют значительно более высокие скорости роста и накопления клеточной массы, чем другие организмы. Например, с помощью микроорганизмов в ферментере объемом 300 м³ за сутки можно выработать 1 т белка (365 т/год). Чтобы такое же количество белка в год выработать с помощью крупного рогатого скота, нужно иметь стадо 30 000 голов. Если же использовать для получения такой скорости производства белка бобовые растения, например горох, то потребуются иметь поле гороха площадью 5400 га.

4. В качестве сырья в процессах биотехнологии можно использовать дешевые отходы сельского хозяйства и промышленности.

5. Биотехнологические процессы по сравнению с химическими обычно более экологичны, имеют меньше вредных отходов, близки к протекающим в природе естественным процессам.

6. Как правило, технология и аппаратура в биотехнологических производствах более просты и дешевы.

Лидерами биотехнологии считаются сегодня США и Япония, накопившие многолетний опыт биотехнологий для сельского хозяйства, фармацевтической, пищевой и химической промышленности. Прочное положение в производстве ферментных препаратов, аминокислот, белка, лекарственных средств занимают страны Западной Европы (Германия, Франция, Великобритания, Швейцария), Китай, Индия, а также Россия. Эти страны характеризуются мощным потенциалом техники и технологии, интенсивными фундаментальными и прикладными исследованиями в различных областях биотехнологии.

1.4 Основные биообъекты биотехнологии

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

В производстве лекарственных средств используются следующие биообъекты:

- макроорганизмы животного и растительного происхождения;

Глава 1. БИОТЕХНОЛОГИЯ КАК НАУКА. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ

- грибы, бактерии, вирусы, культуры клеток эукариот, биологические макромолекулы с информационной (ДНК или рибонуклеиновая кислота (РНК)) или функциональной активностью (ферменты).

Биотехнологические объекты находятся на разных ступенях организации:

- а) субклеточные структуры (вирусы, плазмиды, ДНК митохондрий и хлоропластов, ядерная ДНК);
- б) бактерии и цианобактерии;
- в) грибы;
- г) водоросли;
- д) простейшие;
- е) культуры клеток растений и животных;
- ж) растения – низшие (анабена-азолла) и высшие – рясковые.

ДНК, плазмиды и вирусы

Основным объектом генной инженерии является молекула ДНК – полимерная двухцепочечная молекула, построенная по принципу комплементарности. Молекула ДНК образована двумя полинуклеотидными цепями, спирально закрученными друг около друга и вместе вокруг воображаемой оси, т.е. представляет собой двойную спираль.

Молекулы ДНК представляют собой генетическую информацию, важной единицей которой являются гены – элементарные носители, кодирующие информацию о синтезе одного определенного продукта. Поэтому каждый ген характеризуется строго определенной последовательностью нуклеотидов. Большая часть генов содержит информацию о строении белков. Однако, кроме хромосом бактерии содержат большое количество очень маленьких кольцевых молекул ДНК – **плазмид**. Одна из наиболее часто употребляемых плазмид для клонирования рВR 322 создана на основе плазмид природного происхождения, выделенных из *E. coli*. Эта плазида содержит гены устойчивости к двум антибиотикам: ампициллину и тетрациклину.

Вирусы являются одними из главных кандидатов на роль векторов для введения чужеродной ДНК. При вирусной инфекции каждая клетка может получить большое число копий чужеродного гена. ДНК можно встраивать так, чтобы она находилась под контролем сильных вирусных промоторов, что обеспечит высокий уровень экспрессии гена, и его

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

продукты будут более доступны для исследования. В генной инженерии часто используют 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты. Этот промотор не обладает видовой специфичностью и активен не только в клетках крестоцветных, но и в клетках растений других семейств. Вирус должен быть жизнеспособным после рекомбинирования его ДНК. Легче всего вирусы вводятся в бактерии. Недостатком вирусов как векторов является их небольшая емкость. Кроме того, вирусы заражают небольшой круг хозяев.

Бактерии и цианобактерии

Микроорганизмов, синтезирующих продукты или осуществляющих реакции, полезные для человека, несколько сотен видов. Биотехнологические функции бактерий разнообразны. Бактерии используются при производстве:

- пищевых продуктов, например, уксуса (*Gluconobacter suboxidans*), молочнокислых напитков (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*) и др.;
- микробных инсектицидов (*Bacillus thuringiensis*);
- белка (*Methylomonas*);
- витаминов (*Clostridium* - рибофлавин);
- растворителей и органических кислот;
- биогаза и фотоводорода.

К молочнокислым бактериям относятся представители родов *Lactobacillus*, *Leuconostoc* и *Streptococcus*, которые не образуют спор, грамположительны и нечувствительны к кислороду. Гетероферментативные молочнокислые бактерии рода *Leuconostoc* превращают углеводы в молочную кислоту, этанол и углекислый газ. Гомоферментативные молочнокислые бактерии рода *Streptococcus* продуцируют только молочную кислоту, а брожение, осуществляемое представителями рода *Lactobacillus*, позволяет получить наряду с молочной кислотой ряд разнообразных продуктов.

К бактериям рода *Corynebacterium*, неподвижные грамположительные клетки которых не образуют эндоспор, относятся патогенные (*C. diphtheriae*, *C. tuberculosis*) и непатогенные почвенные виды, имеющие промышленное значение. *C. glutamicum* служит источником лизина. Коринебактерии, хотя и считаются факультативными анаэробами, лучше растут аэробно.

Глава 1. БИОТЕХНОЛОГИЯ КАК НАУКА. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ

Широко используется такое свойство некоторых бактерий, как диазотрофность, то есть способность к фиксации атмосферного азота.

Микробные клетки могут использоваться для трансформации веществ.

Бактерии широко используются в генноинженерных манипуляциях при создании геномных клонотек, введении генов в растительные клетки (агробактерии).

Производственные штаммы микроорганизмов должны соответствовать определенным требованиям: способность к росту на дешевых питательных средах, высокая скорость роста и образования целевого продукта, минимальное образование побочных продуктов, стабильность продуцента в отношении производственных свойств, безвредность продуцента и целевого продукта для человека и окружающей среды. В связи с этим все микроорганизмы, используемые в промышленности проходят длительные испытания на безвредность для людей, животных и окружающей среды. Важным свойством продуцента является устойчивость к инфекции и фагоустойчивость.

Глава 2

Особенности разработки и регистрации биотехнологических лекарственных средств

Вопросы для самоподготовки

1. Терминология Закона Республики Беларусь «О лекарственных средствах».
2. Оригинальное лекарственное средство, биоаналог. Эквивалентность и ее виды.
3. Основные этапы разработки биотехнологических лекарственных средств. Научно-исследовательские (R&D) подразделения биотехнологических компаний.
4. Этапы государственной регистрации лекарственных средств.
5. Структура регистрационного досье на лекарственное средство.

2.1 Терминология Закона Республики Беларусь «О лекарственных средствах»

В Законе Республики Беларусь «О лекарственных средствах» от 20.07.2006 №161-З : в ред. от 29.06.2016 № 386-З используются следующие термины:

Лекарственное средство (ЛС) - вещество или комбинация нескольких веществ природного, синтетического или биотехнологического происхождения, обладающие фармакологической активностью и в определенной лекарственной форме применяемые для медицинской профилактики, диагностики, лечения и медицинской реабилитации пациентов, предотвращения беременности путем внутреннего или внешнего применения.

Глава 2. ОСОБЕННОСТИ РАЗРАБОТКИ И РЕГИСТРАЦИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Оригинальное лекарственное средство– лекарственное средство, отличающееся от всех ранее зарегистрированных лекарственных средств фармакологически активным веществом или комбинацией таких веществ, допустимая безопасность и эффективность которых подтверждены результатами доклинических исследований и клинических испытаний.

Генерическое лекарственное средство– лекарственное средство, содержащее те же фармацевтическую субстанцию или комбинацию фармацевтических субстанций в той же лекарственной форме, что и оригинальное лекарственное средство, эквивалентное оригинальному лекарственному средству и терапевтически взаимозаменяемое с ним.

Биологическое лекарственное средство– лекарственное средство, полученное или выделенное из биологического источника, а также синтезированное методами биотехнологии.

Биотехнологическое лекарственное средство– биологическое лекарственное средство, произведенное путем биотехнологических процессов с применением технологии рекомбинантной дезоксирибонуклеиновой кислоты, технологии контролируемой экспрессии генов, кодирующих выработку биологически активных белков, методов гибридизации и моноклональных антител и других биотехнологических процессов.

Иммунобиологическое лекарственное средство– биологическое лекарственное средство, предназначенное для иммунобиологической профилактики, диагностики и лечения, а также биологическое лекарственное средство, полученное путем переработки неклеточной части крови, оказывающее лечебный и профилактический эффект через иммунную систему.

Биологически аналогичное лекарственное средство (биоаналог, биосимилар) – биологическое лекарственное средство, аналогичное по безопасности, эффективности и качеству оригинальному лекарственному средству в такой же лекарственной форме.

2.2 Оригинальное лекарственное средство, биоаналог. Эквивалентность и ее виды

Большинство биотехнологических лекарственных средств – это значительно более крупные по размеру и сложные по составу молекулы,

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

нежели синтезируемые химическим путем низкомолекулярные препараты; для их производства используют живые организмы, а сам процесс производства оказывает существенное влияние на их ключевые характеристики и свойства. Биотехнологические лекарственные средства отличаются большим разнообразием: от инновационных препаратов для лечения хронических заболеваний (рак, сахарный диабет и ревматоидный артрит) и острых заболеваний (инфаркт миокарда и инсульт). В отличие от биотехнологических, низкомолекулярные препараты получают путем поэтапного химического синтеза, при этом существенно меньший размер и более простая структура молекулы позволяют точно охарактеризовать продукт и упрощают их воспроизведение.

Процесс регистрации генериков сегодня является сокращенной процедурой. Достаточно доказать их биоэквивалентность по сравнению с оригинальным лекарственным средством. Однако при прохождении регистрации высокомолекулярных биоподобных лекарственных средств возникает ряд осложнений. Количество сравниваемых фармакологических показателей у них значительно превышает идентичные оценки характеристик генериков, но намного меньше по сравнению с оригинальными биотехнологическими ЛС.

Производство биотехнологических ЛС – это очень сложный и высокотехнологичный процесс. В то время как воспроизводство синтезированных химическим путем низкомолекулярных препаратов близко к абсолютному, синтезируемые живыми клеточными системами биотехнологические ЛС характеризуются микрогетерогенностью: это означает, что конечный продукт следует понимать, как смесь белковых молекул. Само происхождение, а также степень гетерогенности сильно зависят от процесса производства – незначительные изменения в этом процессе могут привести к существенным изменениям состава конечного продукта, что неизбежно повлечет за собой и клинические последствия. Часто употребляемая в связи с биотехнологическими ЛС фраза «процесс определяет продукт» как раз отражает значимость процесса производства для достижения идентичности всех партий произведенного продукта. Ввиду сложного строения молекулы и характерного профиля примесей биотехнологические ЛС могут индуцировать синтез антител и провоцировать иммунные и аллергические реакции.

Как только эксклюзивное право на производство и патентная защита определенного оригинального (инновационного) биотехнологического ЛС истекает, становится возможной регистрация и продажа *подобных*

Глава 2. ОСОБЕННОСТИ РАЗРАБОТКИ И РЕГИСТРАЦИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

биологических аналогичных ЛС, или *биосимиляров (биоаналогов)*, то есть генериков существующего оригинального биотехнологического ЛС. Но биоаналоги не то же самое, что и генерики, которые состоят из более простых активных субстанций, идентичность которых референтной молекуле может быть легко продемонстрирована. Из-за сложной природы биопрепаратов регистрация биоаналогов требует создания специализированных регуляторных подходов и специфических стандартов разработки и экспертизы, которые соответствовали бы их уникальной природе. Ряд региональных и национальных регуляторных органов уже начали принимать законодательства и внедрять руководства, необходимые для регулирования обращения биотехнологических ЛС. Например, в 2005 г. Европейское Агентство по лекарственным средствам (European Medicines Agency, далее ЕМА) ввело в действие первые регуляторные требования специально для регистрации биосимиляров. Несколькими годами позже, в 2009 г., Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) разработала Руководство, которое послужило основой для разработки и экспертизы подобных биотерапевтических препаратов. В используемых рекомендациях и руководствах содержится полезная информация для понимания уникальных характеристик биоподобных препаратов и их существенных отличий от воспроизведенных низкомолекулярных лекарственных средств (генериков), синтезируемых химическим путем.

ЕМА утверждает, что *биосимиляр* – это биологический лекарственный препарат, который содержит версию активного вещества уже зарегистрированного оригинального биологического лекарственного препарата (референтный лекарственный препарат).

Биосимиляр демонстрирует подобие референтному лекарственному препарату по параметрам качества, биологической активности, безопасности и эффективности, что основано на всестороннем исследовании сопоставимости.

Высокая степень подобия определяется в специфических исследованиях сопоставимости, определенных ВОЗ как «сравнение биотерапевтического препарата с зарегистрированным оригинальным препаратом по принципу «один к одному», с целью установить подобие по качеству, безопасности и эффективности». Целью этого исследования биоподобия является демонстрация того, что оба ЛС подобны на уровне конечного продукта, следовательно, пациент может рассчитывать на сравнимую клиническую эффективность двух препаратов.

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

Эквивалентность лекарственных средств, ее виды

Фармацевтическая эквивалентность – лекарственные средства являются фармацевтически эквивалентными, если они содержат одинаковое количество одного и того же активного вещества (или веществ) в одной и той же лекарственной форме, соответствуют одним и тем же сопоставимым стандартам и применяются одинаковым способом. Однако, фармацевтическая эквивалентность не обязательно предполагает биологическую или терапевтическую эквивалентность, так как различия в наполнителях и/или в процессе производства могут приводить к различиям в эффективности препарата.

Биологическая эквивалентность (биоэквивалентность) – два лекарственных средства биологически эквивалентны, если они фармацевтически эквивалентны или они фармацевтически альтернативны и их биологические доступности (скорость и степень доступности), после приема в одной и той же молярной дозе, похожи до такой степени, что можно предполагать, что их терапевтические эффекты и показатели безопасности будут по существу одинаковыми.

Терапевтическая эквивалентность – лекарственное средство является терапевтически эквивалентным другому лекарственному средству, если оно фармацевтически эквивалентно ему, и после приема в одной и той же молярной дозе его клиническое воздействие с точки зрения и эффективности, и безопасности будет по существу одинаковым средству, эффективность и безопасность которого установлена, о чем свидетельствуют данные соответствующих исследований (биоэквивалентности, фармакодинамические, клинические или исследования *in vitro*).

2.3 Основные этапы разработки биотехнологических лекарственных средств

Основные этапы разработки биотехнологического ЛС

На **первом этапе** разработчик определяется с направлением исследования (экономически выгоднее разрабатывать линейку близких по терапевтическому действию средств) и составляется план исследований.

Далее на **втором этапе** в лабораторных условиях получают продуцент-мутант (грибы, бактерии, вирусы, культуры клеток эукариот,

Глава 2. ОСОБЕННОСТИ РАЗРАБОТКИ И РЕГИСТРАЦИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

биологические макромолекулы с информационной ДНК или РНК), оптимизируются условия, обеспечивающие максимальный рост и получение целевого продукта.

На *третьем этапе* разрабатываются технология выделения и очистки конечного продукта, а также создается лекарственная форма, методики контроля качества (подготавливается нормативная документация по качеству).

На *четвертом этапе* проводят доклинические исследования.

Доклинические исследования включают две фазы и проводятся согласно Надлежащей лабораторной практике (ТКП 125-2008 (02040)) на животных *in vivo* или в культуре клеток животных или человека *in vitro*. Первая фаза включает изучение общетоксического действия (острая, подострая и хроническая токсичность) и специфической токсичности (иммунотоксичность и аллергенность, влияние на репродуктивную функцию и эмбриотоксичность, мутагенность и канцерогенность), а также силы и продолжительности фармакологического действия. Вторая фаза сфокусирована на исследовании фармакокинетики и фармакодинамики, повторном изучении токсичности (на другом виде животных). Также на данном этапе нарабатываются опытно-промышленные образцы ЛС, которые закладываются на хранение.

На *пятом этапе* проводятся клинические испытания согласно Надлежащей клинической практике (ТКП 184-2009 (02040)) на здоровых и больных добровольцах.

Клинические испытания включают четыре фазы.

Фаза 1 проводится на здоровых добровольцах (до 20 человек). Изучают фармакокинетику на людях. Устанавливают высшие суточные и высшие разовые дозы (для ЛС списка А), побочные эффекты. Дополнительные исследования могут быть проведены на животных с моделированием процессов заболеваний. Проводят патентование лекарственного средства.

Фаза 2 проводится на ограниченной группе больных добровольцев (до 100 человек). Проверяют эффективность и подбирают оптимальные терапевтические дозы. Испытывают краткосрочную безопасность для людей. Испытания проводят на базе 1 – 2 клиник.

Фаза 3 предполагает исследования на расширенной группе больных добровольцев (от 100 до нескольких тысяч человек). Испытания по эффективности и безопасности проводятся в нескольких клиниках

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

разными врачами в условиях, приближенных к клинической практике (разный пол, возраст, сопутствующие патологии и т.п.). Сравнивают с известной терапией. Устанавливают возможные лекарственные взаимодействия, проводят сбор данных по побочным реакциям.

Для оригинальных ЛС проводятся доклинические исследования и полный цикл (три фазы) клинических испытаний. Для биоаналогов – сокращенные доклинические испытания, 1-ая и 3-я фазы клинических испытаний. По согласованию с Национальным регулирующим органом (Министерство здравоохранения Республики Беларусь) объем клинических испытаний может быть сокращен или увеличен.

После успешного завершения всех испытаний на *шестом этапе* ЛС регистрируется в регуляторных органах (в Республике Беларусь РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» («ЦЭИЗ»)). Проводят контроль качества первых серий впервые произведенного биотехнологического ЛС. В рамках Надлежащей практики фармаконадзора происходит отслеживание всех побочных реакций поступившего на рынок ЛС (фаза 4 клинических испытаний – пострегистрационные исследования).

2.4 Научно-исследовательские (R&D) подразделения биотехнологических компаний

Практически все ведущие фармацевтические компании мира в большей или меньшей степени занимаются разработкой и выпуском биотехнологических лекарственных средств. Если прибыль, получаемую компаниями, условно принять за 100%, то инвестиции в собственные научно-исследовательские (Research and Development– R&D) разработки составят около 20%. То есть, при годовом объеме фармацевтического рынка около 1 трлн долларов, R&D-инвестиции составят 200 млрд долларов. По суммарным инвестициям сфера фармации и биотехнологий входит в тройку отраслей по финансированию научно-исследовательских разработок наравне со сферами производства оборудования и аппаратного обеспечения и автомобильной промышленностью. С 2005 по 2015 гг. фарминдустрия инвестировала более 1,2 трлн долларов в R&D. Разработка и продвижение оригинального лекарственного средства, которое войдет в топ-100 по объему продаж, обходится компании свыше 1 млрд долларов. При этом необходимо учитывать риски, что лекарственное средство может

Глава 2. ОСОБЕННОСТИ РАЗРАБОТКИ И РЕГИСТРАЦИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

и не «выстрелить» и не занять планируемую нишу на фармрынке. К лидерам на фармацевтическом рынке по объему R&D-инвестиций относятся следующие компании, работающие в сфере фармации и биотехнологий: «Novartis», «Roche», «Merck & Co.», «Pfizer», «Sanofi», «Johnson & Johnson», «GlaxoSmithKline», «Eli Lilly», «Astra Zeneca», «Bristol-Myers Squibb», «Abbott Laboratories», «Bayer», «Takeda Pharmaceuticals», «Boehringer Ingelheim», «Amgen».

В странах ЕАЭС основные инвестиции в R&D проводятся российскими производителями. Центр по разработке инновационных и импортозамещающих лекарственных препаратов «ХИМРАР» планирует разработать и освоить выпуск 5-10 отечественных инновационных препаратов и 20 импортозамещающих аналогов (140 млн долларов). ЗАО «Биокад» – научно-производственная компания, занимающаяся разработкой оригинальных и генерических лекарственных средств для лечения урологических, гинекологических, онкологических и неврологических заболеваний. Группа компаний «Биопроцесс» – научно-производственная компания, занимающаяся производством биотехнологических субстанций и конечных лекарственных форм. В настоящее время компания занимается как производством генериков, так и инновационными разработками.

Рассмотрим структуру R&D подразделений современной отечественной биотехнологической компании, имеющей полный цикл производства лекарственных средств.

Научно-исследовательские подразделения (Research and Development– R&D) – на примере БИОКАД (Россия).

Департамент молекулярной генетики и клеточных технологий.

Задачи:

- разработка моноклональных антител;
- конструирование векторов экспрессии;
- изучение стабильных линий-продуцентов белков и их культивирование в биореакторах.

Лаборатории:

- ✓ отдел рекомбинатных продуцентов;
- ✓ лаборатория генетики рекомбинантных продуцентов;
- ✓ лаборатория инженерии антител;
- ✓ лаборатория клеточной инженерии;
- ✓ лаборатория физиологии рекомбинантных продуцентов;

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

- ✓ лаборатория высокопроизводительных биотехнологических методов;
- ✓ лаборатория клеточных биотехнологий;
- ✓ лаборатория молекулярной генетики.

Департамент биохимии.

Задачи:

- проведение иммуноферментных исследований;
- выделение и очистка рекомбинатных белков.

Лаборатории:

- ✓ отдел биохимии;
- ✓ лаборатория биохимии рекомбинатных микроорганизмов;
- ✓ лаборатория иммунохимии и гибридной технологии.

Департамент доклинических исследований.

Задачами являются проведение исследований на:

- общую токсичность;
- специфическую токсичность;
- биодоступность и биоэквивалентность;
- исследования фармакокинетики.

Лаборатории:

- ✓ лаборатория экспериментальной биологии;
- ✓ отдел доклинических испытаний ЛС.

Департамент разработки лекарственных средств, методов контроля и технологического трансфера.

Задачи:

- разработка состава и технологии готовых ЛС;
- разработка методов контроля качества ЛС;
- выделение и очистка целевых продуктов;
- масштабирование технологических процессов.

Лаборатории:

- ✓ лаборатория аналитических методов;
- ✓ лаборатория физико-химических методов исследования;
- ✓ опытно-промышленный биотехнологический отдел;
- ✓ лаборатория твердых лекарственных форм.

Глава 2. ОСОБЕННОСТИ РАЗРАБОТКИ И РЕГИСТРАЦИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

По уровню своей профессиональной подготовки специалист с высшим фармацевтическим образованием может претендовать на работу либо в департаменте разработки лекарственных средств, методов контроля и технологического трансфера, либо в департаменте доклинических исследований. Работа по конструированию рекомбинантных продуцентов, обеспечению условий их воспроизведения, выделения и очистки белков, требует университетского биологического образования.

2.5 Этапы государственной регистрации лекарственных средств

Государственную регистрацию лекарственных средств осуществляет Министерство здравоохранения Республики Беларусь. Предварительные технические работы, предшествующие государственной регистрации:

- первичная экспертиза документов, необходимых для осуществления государственной регистрации;
- инспектирование промышленного производства лекарственного средства на соответствие требованиям Надлежащей производственной практики;
- апробация методик контроля качества лекарственного средства (осуществляется в Лаборатории фармакопейного и фармацевтического анализа РУП «ЦЭИЗ»), а также анализа качества лекарственного средства при проведении государственными организациями здравоохранения его клинических испытаний;
- специализированная экспертиза документов, необходимых для осуществления государственной регистрации (документы по эффективности и безопасности ЛС рассматривают в Республиканской клинико-фармакологической лаборатории РУП «ЦЭИЗ»);
- испытания по изучению биодоступности (биоэквивалентности) генерического лекарственного средства, назначаемых Министерством здравоохранения;
- клинические испытания лекарственного средства, назначаемых Министерством здравоохранения.

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

Данный комплекс предварительных технических работ осуществляется РУП «ЦЭИЗ».

Этапы процедуры государственной регистрации ЛС

Заявителем после прохождения комплекса предварительных технических работ при наличии положительного заключения РУП «ЦЭИЗ» о соответствии лекарственного средства требованиям безопасности, эффективности и качества, содержащего результаты экспертиз, инспектирования, испытаний и других предусмотренных исследований представляется в Министерство здравоохранения регистрационное досье, включающее документы, необходимые для проведения процедуры государственной регистрации лекарственных средств.

По результатам рассмотрения документов, представленных заявителем, Министерством здравоохранения принимается решение о государственной регистрации лекарственного средства или решение об отказе в государственной регистрации лекарственного средства с указанием причин отказа. Принятое решение оформляется приказом названного Министерства.

Заявитель письменно уведомляется Министерством здравоохранения о принятом решении и необходимости уплаты в соответствии с законодательством государственной пошлины.

После получения письменного уведомления о государственной регистрации лекарственного средства заявителем уплачивается государственная пошлина за государственную регистрацию лекарственного средства.

РУП «ЦЭИЗ» вносит сведения о лекарственном средстве в Государственный реестр лекарственных средств Республики Беларусь с выдачей заявителю в установленном порядке регистрационного удостоверения с указанием в нем заявленной цены лекарственного средства.

На лекарственное средство, впервые регистрируемое в Республике Беларусь, выдается регистрационное удостоверение сроком действия пять лет. По истечении срока действия регистрационного удостоверения лекарственное средство должно пройти процедуру подтверждения государственной регистрации. При подтверждении государственной регистрации на лекарственное средство выдается бессрочное регистрационное удостоверение.

2.6 Структура регистрационного досье на лекарственное средство

Регистрационное досье на биотехнологическое ЛС в формате ОТД (Общего технического документа) = CTD (Common Technical Documentation) содержит пять модулей: «Административная информация»; «Резюме CTD»; «Качество»; «Отчеты о доклинических исследованиях»; «Отчеты о клинических испытаниях».

Модуль 1. Административная информация включает пункты: «Общее содержание», «Форма заявления», «Краткая характеристика лекарственного средства, маркировка и листок-вкладыш в упаковку», «Информация об экспертах, проводивших экспертизу по качеству, по доклиническим данным, по клиническим данным», а также сертификаты соответствия GMP (Надлежащей производственной практике), сертификат фармацевтического продукта, сертификат регистрации лекарственного средства в стране производителя и лицензия на производство. Указывается перечень стран, где уже зарегистрировано ЛС, с указанием даты первой регистрации. Прилагаются копии регистрационных свидетельств из указанных стран. В приложении приводится оценка опасности ЛС для окружающей среды.

В модуле 2 «Резюме CTD» приводится содержание модулей 2, 3, 4, 5; а также «Введение в CTD», «Общее резюме по качеству», «Доклинический обзор и резюме по фармакологическим, фармакокинетическим и токсикологическим данным в текстовом виде и в виде таблиц»; «Клинический обзор и резюме биофармацевтических исследований и связанных с ними аналитических методов, исследований по клинической фармакологии, по клинической эффективности, по клинической безопасности, копии использованных литературных источников, короткие обзоры индивидуальных испытаний».

В модуле 3 «Качество» для лекарственных средств приводится «Описание и состав лекарственного средства»; «Фармацевтическая разработка: составные вещества лекарственного средства (фармацевтическая субстанция, вспомогательные вещества), лекарственный продукт (разработка состава, излишки, физико-химические и биологические свойства), разработка производственного процесса (система упаковка/укупорка, микробиологические характеристики,

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

совместимость)»; «Производство: производитель, состав на серию, описание производственного процесса и контроля процесса, контроль критических этапов и промежуточной продукции, валидация процесса и/или его оценка»; «Контроль вспомогательных веществ: спецификации, аналитические методики, валидация аналитических методик, обоснование спецификаций, вспомогательные вещества человеческого и животного происхождения, новые вспомогательные вещества»; «Контроль лекарственного средства: спецификации, аналитические методики, валидация аналитических методик, анализы серий, характеристика примесей»; «Стандартные образцы и вещества»; «Система упаковка/укупорка»; «Стабильность: резюме и вывод о стабильности, протокол пострегистрационного изучения стабильности и обязательство относительно стабильности, данные о стабильности». В дополнении к модулю указываются использованные технические средства и оборудование, оценка безопасности относительно посторонних микроорганизмов, новые вспомогательные вещества.

Модуль 4 «Отчеты о доклинических исследованиях» содержит отчеты об исследованиях по разделам «Фармакология: первичная и вторичная фармакодинамика, фармакология безопасности, фармакодинамические лекарственные взаимодействия»; «Фармакокинетика: аналитические методы и отчет относительно их валидации, всасывание, распределение, метаболизм, фармакокинетические лекарственные взаимодействия (доклинические)»; «Токсикология: токсичность при введении однократной дозы и при введении повторных доз, генотоксичность, канцерогенность, репродуктивная и онтогенетическая токсичность, местная переносимость, другие исследования токсичности».

Модуль 5 «Отчеты о клинических испытаниях» содержит «Перечень всех клинических испытаний в виде таблиц»; «Отчеты о клинических испытаниях, включающие отчеты о биофармацевтических исследованиях, об исследованиях, которые касаются исследования фармакокинетики при использовании биоматериалов человека, о фармакокинетических исследованиях у человека, о фармакодинамических исследованиях у человека, об исследовании эффективности и безопасности, о пострегистрационном опыте применения, а также образцы индивидуальных регистрационных форм и индивидуальные списки пациентов». В конце каждого модуля приводятся копии использованных литературных источников.

Глава 2. ОСОБЕННОСТИ РАЗРАБОТКИ И РЕГИСТРАЦИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Качество – соответствие ЛС требованиям нормативной документации. Для оригинального биотехнологического средства предоставляется полная информация по качеству в соответствии с модулем регистрационного досье «Качество». Как правило, биоаналог получают из отдельного и независимого главного банка клеток, хотя он и базируется на генной конструкции, кодирующей такую же аминокислотную последовательность, что и у оригинального биотехнологического ЛС, и производят его с применением независимого процесса и системы контроля. Для сопоставимости биоаналога производителю необходимо полностью охарактеризовать физико-химические и биологические свойства представляемого на регистрацию биоаналога в рамках сравнения по принципу «один к одному» с референтным (оригинальным) биотехнологическим ЛС.

Эффективность – характеристика степени положительного влияния лекарственного средства на предупреждение, течение или продолжительность заболевания, предотвращение беременности, восстановление нормальной жизнедеятельности организма человека и компенсацию его функциональных возможностей, нарушенных в результате заболевания.

Производитель биоаналога не обязан доказывать его пользу для пациента, так как это уже было сделано для оригинального средства наряду с исследованиями по подбору дозы. Программа целевого клинического исследования, однако, должна быть сформирована так, чтобы подтвердить высокую степень подобия биоаналога с референтным ЛС по параметрам безопасности и эффективности.

Поскольку определены факторы (например, одновременный прием других средств, сопутствующие заболевания, определенная дозировка, демографические характеристики и иммунный статус пациента) могут повлиять на обнаружение клинически значимых различий, то исследования нужно проводить на группе или группах пациентов, чувствительных к потенциальным различиям. Независимо от дизайна исследования, результаты, полученные в клинических исследованиях, определяют, можно ли биоаналог и референтное средство считать клинически подобными. Если выявляются клинически значимые различия, новый продукт не должен считаться подобным референтному ЛС, но может разрабатываться как отдельный продукт. Однако, следует отметить, что в некоторых случаях показание, наиболее чувствительное для

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

определения эффективности, не всегда является показанием, наиболее чувствительным для выявления разницы в иммуногенности.

Безопасность – положительная характеристика лекарственного средства, основанная на сравнительном анализе его эффективности и оценке риска причинения вреда жизни и здоровью человека

Доклиническая оценка, сравнивающая оригинал и биоаналог в релевантных моделях *in vitro* и, если требуется, *in vivo*, необходима до запуска любых клинических исследований на людях. Если доклинические данные приемлемы, можно начинать клинические исследования с целью собрать данные по безопасности биоаналога в обоснованной, релевантной популяции пациентов до получения регистрационного удостоверения. Учитывая, что в ходе клинических исследований некоторые редкие нежелательные явления могут оказаться невыявленными, для обеспечения безопасности пациентов требуются тщательный мониторинг клинической безопасности биоаналога и соответствующие пострегистрационные исследования. Потенциал биоаналога вызывать иммунные реакции следует оценивать еще в процессе разработки и до того, как он станет общедоступным для пациентов.

Глава 2. ОСОБЕННОСТИ РАЗРАБОТКИ И РЕГИСТРАЦИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Глава 3

Производство биотехнологических лекарственных средств в соответствии с GMP

Вопросы для самоподготовки

1. *GMP vs ISO.*
2. *Особенности GMP для биотехнологического производства.*
3. *Стадии биотехнологического производства.*
4. *Принципы производства биотехнологических лекарственных средств.*

3.1 GMP vs ISO

Одним из основных залогов качества ЛС является строгое соблюдение высоких стандартов его промышленного производства. Первый международный документ Всемирной организации здравоохранения, посвященный Правилам надлежащей производственной практики (*Good Manufacturing Practice – GMP*), появился в 1967 г. Стандарты GMP в подавляющем большинстве стран, в которых они введены, носят обязательный характер. Кроме стандартов GMP существуют стандарты Международной организации по стандартизации (*International Organisation for Standardization – ISO*). Данная организация является неправительственной и ее основная задача – содействие разработке повсеместно признаваемых стандартов в целях обеспечения международного обмена товарами и услугами. При этом был осуществлен переход от контроля качества готовой продукции к процедуре управления качеством (запланированное качество) в процессе производства. Первые стандарты ISO были опубликованы в 1987 году.

Глава 3. ПРОИЗВОДСТВО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В СООТВЕТСТВИИ С GMP

Основное отличие стандартов GMP и ISO заключается в следующем: стандарты GMP разрабатывались и разрабатываются только для фармацевтической продукции, в то время как стандарты ISO должны «обслуживать» все остальные отрасли, начиная с производства детских игрушек и заканчивая производством самолетов. Стандарты GMP не предполагают постоянного расширения ассортимента и внесения изменений в производство продукции. Допускаются только изменения, которые «не должны препятствовать прогрессу и внедрению новых методов производства», в правилах GMP не заложена идея постоянного улучшения производственного процесса и обновления ассортимента. Идеалом GMP является производство продукции в стабильных условиях. Это, в первую очередь, связано с необходимостью обеспечения однородности внутри серий ЛС и однородность между несколькими (в идеале — между всеми) его сериями. Стандарты же ISO подразумевают постоянное улучшение качества продукции.

Еще одно отличие заключается в том, что проверку предприятий на соответствие производства требованиям GMP может производить только национальный инспекторат GMP (В Республике Беларусь совместно МЗ РБ и Национальный орган по оценке соответствия). Общей системы выдачи сертификатов ISO не существует. Сертификация по системе ISO является добровольной, сама организация ISO не выдает сертификаты, и в каждой стране вопрос получения сертификатов решается по-разному, например, в Российской Федерации сертификаты могут выдавать неправительственные частные организации.

На территории Республики Беларусь в настоящее время действуют: технический кодекс установившейся практики – Надлежащая производственная практика (ТКП 030 (33050) 2017 года), устанавливающий требования к фармацевтическим субстанциям, к производству лекарственных средств (стерильных, биологических, ветеринарных, из растительного сырья, предназначенных для клинических испытаний и др.), а также к отбору проб исходного сырья и упаковочных материалов, к аттестации и валидации производства, контрольным и архивным образцам. В основу стандарта положены принципы и требования руководств по GMP Европейского Союза, Украины (2010 г.), Российской Федерации (2009 г.), а также рекомендации Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

лекарственных средств для человека (ICH) и Международной организации по стандартизации.

3.2 Особенности GMP для биотехнологического производства

В отличие от обычных лекарственных средств, которые производят с использованием химических и физических технологий с высокой степенью постоянства, производство биологических лекарственных средств связано с биологическими процессами и материалами, такими как культивирование клеток или экстракция веществ из живых организмов. Этим биологическим процессам присуща изменчивость, поэтому диапазон и характер сопутствующих продуктов варьирует. Более того, материалы, используемые в процессах культивирования, сами являются хорошей питательной средой для роста контаминирующих микроорганизмов. Термин «биотехнологический процесс» (биопроцесс) относится к использованию клеток или организмов, которые для производства активного фармацевтического ингредиента (АФИ) были получены или модифицированы с использованием рекомбинантной ДНК, гибридной или какой-либо другой технологии. АФИ, произведенные биотехнологическими методами, обычно представляют собой высокомолекулярные соединения, такие как белки и полипептиды, для которых в этом разделе приведены специфические требования. С использованием технологии рекомбинантной ДНК могут быть также произведены некоторые АФИ с низкими молекулярными массами, например антибиотики, аминокислоты, витамины и углеводы.

Получение АФИ и промежуточной продукции из культуры клеток или методом ферментации включает в себя такие биологические процессы, как культивирование клеток или экстракция и очистка веществ из живых организмов. Следует обратить внимание на то, что могут существовать и дополнительные стадии (например, физико-химическая модификация), которые являются частью технологического процесса. Используемое сырье (питательные среды, компоненты буфера) может обеспечивать возможность роста микробиологических загрязнений. В зависимости от природы, метода приготовления и целей использования АФИ или промежуточной продукции на определенных стадиях производства может потребоваться контроль биологической нагрузки, вирусного загрязнения и/или уровня эндотоксинов в такой продукции.

Глава 3. ПРОИЗВОДСТВО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В СООТВЕТСТВИИ С GMP

Для обеспечения качества АФИ и/или промежуточной продукции на всех стадиях производства должен быть установлен надлежащий контроль. Так как этот раздел начинается со стадии культивирования клеток/ферментации, предыдущие стадии (например, поддержание банка клеток) должны проводиться при наличии надлежащего внутрипроизводственного контроля. Настоящий раздел охватывает процесс культивирования/ферментации клеток с момента, когда из банка клеток поступает емкость с культурой клеток для использования в производстве.

Для сведения к минимуму риска контаминации следует использовать необходимое оборудование и проводить контроль окружающей среды. Критерии приемлемости для качества и периодичность проведения контроля окружающей среды зависят от стадии технологического процесса и условий производства (открытая, закрытая или изолированная система).

3.3 Стадии биотехнологического производства

Согласно GMP производство АФИ (активных фармацевтических ингредиентов) с использованием биотехнологических процессов (ферментация/культивирование клеток) подразделяется на несколько стадий:

- создание главного и рабочего банков клеток;
- поддержание рабочего банка клеток;
- культивирование клеток и/или ферментация;
- сбор, выделение и очистка продукции.

Банк клеток

Главный банк клеток (*master cell bank*) – полностью охарактеризованная культура клеток, распределенная в контейнеры за одну операцию, обрабатываемая вместе таким образом, чтобы обеспечить единообразие, и сохраняемая таким способом, чтобы обеспечить стабильность. Обычно главный банк клеток хранят при температуре минус 70 °С или ниже.

Рабочий банк клеток (*working cell bank*) – культура клеток, происходящая из главного банка клеток и предназначенная для подготовки клеточных культур, используемых в технологическом процессе. Обычно рабочий банк клеток хранится при температуре минус 70 °С или ниже.

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

Для приготовления рабочего банка клеток используется некоторое число контейнеров из главного банка клеток. Систему банка клеток валидируют в отношении количества пассажей или числа удвоений популяции после сверхдостижимого количества пассажей во время обычного технологического процесса.

Доступ к банкам клеток должен быть разрешен только персоналу, имеющему на это полномочия. Банки клеток должны храниться в специально разработанных условиях, обеспечивающих поддержание жизнеспособности и предотвращающих контаминацию клеток. Следует вести протоколы использования флаконов из банков клеток и условий их хранения. При необходимости банки клеток должны периодически проходить контроль пригодности их использования.

Культивирование клеток/ферментация

Закрытые или изолированные системы следует применять по возможности в тех случаях, когда необходимо добавлять клеточные субстраты, среды, буфер и газы в асептических условиях. Если посев в первоначальном сосуде, последующий перенос или добавление (сред, буферов) производятся в открытых сосудах, для снижения риска контаминации следует осуществлять контроль и соответствующие процедуры. Если микробная контаминация может повлиять на качество АФИ, то манипуляции с использованием открытых сосудов следует проводить в стерильных боксах или других устройствах, обеспечивающих контроль условий окружающей среды. При работе с культурами клеток персонал должен быть одет в специальную одежду и соблюдать специальные меры предосторожности. Следует проводить непрерывный контроль критических рабочих параметров, например температуры, рН, скорости перемешивания, добавления газов, давления, который позволяет гарантировать соответствие условий процесса, установленным параметрам. Следует также постоянно контролировать рост клеток, жизнеспособность (для биотехнологических процессов) и их продуктивность. В зависимости от типа процесса критические параметры могут изменяться, а в случае классической ферментации некоторые параметры можно не контролировать (например, жизнеспособность клеток). Оборудование, используемое для культивирования клеток, после окончания процесса должно быть очищено и стерилизовано. При необходимости оборудование для проведения ферментации следует очищать, подвергать санитарной обработке или стерилизовать. Должны быть разработаны документированные процедуры для выявления

Глава 3. ПРОИЗВОДСТВО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В СООТВЕТСТВИИ С GMP

контаминации и определения мер, которые необходимо предпринять. К ним относятся процедуры определения влияния контаминации на продукцию, методы очистки оборудования и приведение оборудования в состояние готовности для дальнейшего использования. Посторонние микроорганизмы, обнаруженные в ходе процесса ферментации, должны быть идентифицированы, а влияние их на качество продукции должно быть оценено. При решении вопроса о судьбе произведенной продукции результаты таких оценок должны приниматься во внимание. После очистки универсального (предназначенного для производства нескольких видов продукции) оборудования между циклами производства различной продукции может потребоваться проведение дополнительных испытаний с целью снижения риска перекрестной контаминации.

Сбор, выделение и очистка продукции

Стадии сбора как для удаления клеток или клеточных компонентов, так и для сбора клеточных компонентов после разрушения должны проводиться на оборудовании и в зонах, конструкция которых должна предусматривать сведение к минимуму риска контаминации.

После использования все оборудование должно быть должным образом очищено и подвергнуто санитарной обработке. Производство нескольких последовательных серий продукции без промежуточной очистки оборудования допускается только в том случае, если это не оказывает влияния на их качество. При использовании открытых систем очистка должна проводиться в условиях, обеспечивающих сохранение качества продукции. Если оборудование используется для производства нескольких видов продукции, могут применяться дополнительные виды контроля очистки, такие как использование отдельных хроматографических смол или проведение дополнительных испытаний.

3.4 Принципы производства биотехнологических лекарственных средств

Производство биологических лекарственных средств имеет определенные специфические черты, вытекающие из природы продукции и характера процессов. Характер производства, контроля и применения биологических лекарственных средств требует некоторых особых мер предосторожности.

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

Контроль биологических лекарственных средств, как правило, связан с биологическими методиками испытаний, которые более вариабельны, чем физико-химические определения. Поэтому в производстве биологических лекарственных средств большое значение имеет контроль в процессе производства.

Для того, чтобы обеспечить соблюдение требований GMP, предприятию необходимо иметь в наличии:

- обученный персонал, имеющий необходимую квалификацию;
- подходящие помещения, необходимое оборудование и правильное его обслуживание;
- соответствующие исходные материалы, контейнеры (первичные упаковки) и этикетки;
- документацию (утвержденные процедуры и инструкции в соответствии с фармацевтической системой качества);
- хранение продукции, исходных и упаковочных материалов.

Персонал

Весь персонал (включая сотрудников, проводящих очистку, техническое обслуживание и контроль качества), работающий в зонах, в которых производят биологические лекарственные средства, должен пройти дополнительное обучение, учитывающее специфику производимой продукции и работы с ней. Персоналу должна быть предоставлена соответствующая информация; он должен пройти подготовку по гигиене и микробиологии.

Лица, ответственные за технологический процесс и контроль качества, должны иметь адекватную подготовку по соответствующим научным дисциплинам, таким как бактериология, биология, биометрия, химия, медицина, фармация, фармакология, вирусология, иммунология и ветеринария, а также достаточный практический опыт, позволяющий им управлять тем процессом, к которому они имеют отношение.

Для гарантирования безопасности продукции должен быть принят во внимание иммунологический статус персонала. Все сотрудники, занятые в технологическом процессе, обслуживании, проведении испытаний и уходе за животными (включая инспекторов), при необходимости должны быть вакцинированы соответствующими специфическими вакцинами и должны проходить регулярные медицинские осмотры. Отдельно от очевидной проблемы риска для персонала подвергнуться влиянию инфицирующих агентов, действию сильных токсинов или аллергенов, необходимо предотвращать риск контаминации произведенной серии инфицирующими

Глава 3. ПРОИЗВОДСТВО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В СООТВЕТСТВИИ С GMP

агентами. Как правило, в производственные зоны не следует допускать посетителей.

Помещения и оборудование

Степень контроля окружающей среды в отношении контаминации частицами и микроорганизмами в производственных помещениях должна быть соответственной виду продукции и этапу технологического процесса с учетом уровня контаминации исходных материалов и риска для готовой продукции.

Риск перекрестной контаминации между биологическими лекарственными средствами, особенно на тех стадиях, когда используются живые организмы, может потребовать дополнительных мер предосторожности, касающихся технических средств и оборудования, таких как использование специально предназначенных технических средств и оборудования, производство на основании принципа проведения кампаний и применение закрытых систем. Уровень разделения, необходимый для предотвращения перекрестной контаминации, определяется природой продукции, а также используемым оборудованием.

Одновременное производство разных лекарственных средств в одной зоне с использованием закрытых систем биореакторов может быть допустимо только для моноклональных антител и лекарственных средств, производимых по технологии рекомбинантной ДНК.

Работу со стерильной продукцией необходимо вести в зонах с повышенным давлением, но в особых зонах в точках локализации патогенных микроорганизмов должно быть пониженное давление, применяемое в целях изоляции.

Если для работы в асептических условиях с патогенными микроорганизмами используются зоны с пониженным давлением или безопасные боксы, то они должны находиться внутри стерильной зоны с повышенным давлением.

В производственных зонах для фильтрации воздуха должны быть специальные установки; не допускается рециркуляция воздуха из зон, где работают с живыми патогенными организмами.

Расположение и планировка производственных зон и оборудования должны позволять проводить эффективную очистку и деконтаминацию (например, фумигацию). Адекватность процедур очистки и деконтаминации должна быть валидирована.

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

Оборудование, используемое для работы с живыми организмами, должно быть сконструировано так, чтобы поддерживать культуры в чистом виде; должна быть исключена контаминация от внешних источников во время работы.

Системы трубопроводов, вентиляей и вентиляционных фильтров необходимо конструировать надлежащим образом для облегчения очистки и стерилизации. Предпочтительно использование систем «очистка на месте» и «стерилизация на месте». Вентили на ферментационных сосудах должны быть приспособлены для полной стерилизации паром. Необходимо, чтобы воздушные фильтры были гидрофобными, а срок их службы был подтвержден валидацией.

Первичную изоляцию следует конструировать и испытывать так, чтобы можно было продемонстрировать отсутствие риска утечки. Стоки, которые могут содержать патогенные микроорганизмы, необходимо эффективно обеззараживать. Из-за вариабельности биологических лекарственных средств или процессов во время технологического процесса может возникнуть необходимость измерять или взвешивать некоторые добавки или ингредиенты (например, буферы). В этих случаях допускается хранение небольших запасов таких веществ в производственной зоне.

Животные могут использоваться для производства следующих биологических лекарственных средств: полиомиелитной вакцины (обезьяны), змеиных противоядий (лошади и козы), антирабических вакцин (кролики, мыши и хомяки) и сывороточного гонадотропина (лошади). Кроме того, животные могут быть также использованы при контроле качества многих сывороток и вакцин, например: коклюшной вакцины (мыши), пирогенности (кролики), БЦЖ вакцины (морские свинки). Помещения для животных, используемых при производстве и контроле биологических лекарственных средств, должны быть отделены от зон производства и контроля. Состояние здоровья животных, из которых получают исходные материалы, и тех, которых используют для контроля качества и испытаний на безопасность, необходимо контролировать и протоколировать. Персонал, работающий в таких зонах, должен быть обеспечен специальной одеждой и средствами для переодевания. При использовании обезьян для производства или контроля качества биологических лекарственных средств необходимо учитывать особые требования.

Исходные и упаковочные материалы

Закупка исходных материалов является важной операцией, в

Глава 3. ПРОИЗВОДСТВО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В СООТВЕТСТВИИ С GMP

которую должен быть вовлечен персонал, располагающий подробными и полными сведениями о поставщиках.

Исходные материалы следует закупать только у утвержденных поставщиков, указанных в соответствующей спецификации, и, по возможности, напрямую у производителя. Рекомендуется, чтобы спецификации, установленные производителем на исходные материалы, были обсуждены с поставщиками. Полезно, чтобы все аспекты производства и контроля исходных материалов в отношении требований к обращению, маркированию, упаковыванию, а также рекламаций и процедур отклонения были обсуждены между производителем и поставщиком.

В каждой поставке контейнеры следует контролировать на целостность упаковки и пломб, а также на соответствие сведений, указанных в накладной, этикетках поставщика.

Если одна поставка исходных материалов состоит из различных серий, то каждую серию необходимо рассматривать как отдельную в отношении отбора проб, проведения испытания и выдачи разрешения на использование.

Находящиеся в складской зоне исходные материалы должны быть соответствующим образом маркированы. Этикетки должны содержать, по крайней мере, следующую информацию: наименование продукции; номер серии, присвоенный при получении; статус содержимого (например: в карантине, на испытании, разрешено, забраковано); срок годности или дату повторного контроля. Если не используются полностью компьютеризированные системы хранения, то вышеуказанная информация обязательно должна содержаться на этикетке в разборчивой форме.

С помощью соответствующих процедур и мероприятий должна быть гарантирована идентичность содержимого каждого контейнера с исходными материалами. Контейнеры с нерасфасованной продукцией, из которых были отобраны пробы, должны быть идентифицированы. Следует использовать только те исходные материалы, которые разрешены отделом контроля качества и срок годности которых еще не истек.

Исходные материалы должны выдавать только назначенные лица в соответствии с документированной процедурой, чтобы гарантировать, что нужные исходные материалы точно отвешены или отмерены в чистую и надлежащим образом маркированную тару. Необходимо осуществлять независимую проверку каждого выданного вещества, а также его массы

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

или объема; эта проверка должна быть запротоколирована. Материалы, выданные для каждой серии, должны храниться в одном месте и быть отчетливо маркированы как таковые.

Закупке и контролю первичных и печатных упаковочных материалов, а также обращению с ним следует уделять такое же внимание, как и исходным материалам. Особое внимание следует уделять печатным материалам. Их следует хранить в достаточно безопасных условиях, исключающих доступ посторонних лиц. Разрезанные этикетки и другие разрозненные печатные материалы следует хранить и транспортировать отдельно в закрытой таре для предотвращения перепутывания. Упаковочные материалы следует выдавать для использования только уполномоченному на это персоналу в соответствии с утвержденной и документированной процедурой. Каждой поставке или серии печатного или первичного упаковочного материала должен быть присвоен специальный номер или идентификационный знак.

Просроченные или вышедшие из употребления первичные или печатные упаковочные материалы необходимо уничтожить, а факт уничтожения запротоколировать.

Документация

Надлежащая документация составляет важную часть системы обеспечения качества и является ключевым элементом для осуществления деятельности в соответствии с требованиями GMP. Различные виды используемой документации и носителей информации должны быть четко установлены в Системе управления качеством производителя.

Документация может существовать в разных формах, включая бумажные, электронные или фотографические носители информации. Главной целью системы документации должно быть создание, управление, контроль и запись всех действий, которые прямо или косвенно воздействуют на все аспекты качества лекарственных средств.

Документацию в соответствии с GMP можно подразделить на:

досье производственного участка – документ, в котором описана связанная с GMP деятельность производителя;

инструкции (указания или требования);

протоколы/отчеты.

Среди ***инструкций*** выделяют:

- спецификации – подробно описывают требования, которым должны соответствовать исходные и упаковочные материалы и

Глава 3. ПРОИЗВОДСТВО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В СООТВЕТСТВИИ С GMP

продукция, используемые или получаемые во время производства. Спецификации служат основой для оценки их качества. При необходимости спецификации на биологические исходные материалы должны быть дополнены документацией об источнике, происхождении, способе производства и применяемом контроле, особенно о микробиологическом контроле. Как правило, должны быть спецификации на промежуточную продукцию и на нерасфасованные биологические лекарственные средства;

- производственные рецептуры, технологические инструкции, инструкции по упаковыванию и методики испытаний: содержат подробное описание всех используемых исходных материалов, оборудования и компьютеризированных систем (если применимо) и инструкции по любой обработке, упаковыванию, отбору проб (образцов) и испытаниям. Используемые контроль в процессе производства (in-process controls) и РАТ (process analytical technologies) должны быть описаны, где применимо, вместе с критериями приемлемости;
- процедуры (известные также как стандартные операционные процедуры или СОПы) – содержат указания по выполнению конкретных операций;
- планы – содержат инструкции по выполнению и регистрации отдельных конкретных операций (например, план валидации);
- технические соглашения (договоры, контракты) – соглашения, заключенные между заказчиками и исполнителями относительно работ, которые выполняются сторонними организациями (аутсорсинг).

Протоколы/отчеты подразделяются на:

- протоколы (записи) – документы, подтверждающие выполнение различных действий для доказательства соответствия инструкциям, например, мероприятий, событий, исследований, а для произведенных серий – историю каждой серии продукции, включая ее реализацию. Протоколы включают исходные данные, используемые в других документах. В случае электронных записей определять, какие данные следует использовать в качестве исходных, должны

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

установленные пользователи. По крайней мере, все данные, на основании которых принимаются решения о качестве, должны быть определены как исходные данные;

- сертификат анализа/испытаний (аналитический лист) – документ, содержащий свод (итог) результатов испытаний образцов продукции или материалов с оценкой их соответствия установленной спецификации;
- отчеты – документы, сопровождающие выполнение конкретных заданий, проектов или исследований вместе с результатами, выводами и рекомендациями.

Хранение продукции, исходных и упаковочных материалов

Складские зоны должны быть достаточно вместительными, чтобы обеспечить упорядоченное хранение различных категорий материалов и продукции: исходных и упаковочных материалов, промежуточной, нерасфасованной и готовой продукции, а также материалов и продукции, находящихся в карантине, разрешенных для выпуска, забракованных, возвращенных или отозванных.

Складские зоны должны быть спроектированы или приспособлены для обеспечения надлежащих условий хранения. В частности, они должны быть чистыми и сухими, в них должна поддерживаться требуемая температура. Если требуются специальные условия хранения (например, температура, относительная влажность), то их следует обеспечивать, проверять и контролировать.

В местах приемки и отправки должна быть обеспечена защита материалов и продукции от воздействия погодных условий. Зоны приемки должны быть спроектированы и оборудованы так, чтобы тару с поступающей продукцией перед складированием при необходимости можно было очищать.

Если карантин обеспечивается только хранением продукции в отдельных зонах, то такие зоны должны быть ясно маркированы, а доступ туда разрешен только уполномоченному на это персоналу. Любая система, применяющаяся вместо физического карантина, должна обеспечивать равноценную безопасность.

Как правило, должна быть отдельная зона для отбора проб исходных материалов. Если отбор проб осуществляется в зоне хранения, то он должен проводиться таким образом, чтобы предотвратить контаминацию или перекрестную контаминацию.

Для хранения забракованных, отозванных или возвращенных

Глава 3. ПРОИЗВОДСТВО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В СООТВЕТСТВИИ С GMP

материалов или продукции должны быть предусмотрены отдельные зоны.

Сильнодействующие вещества, лекарственные средства списка «А», наркотические средства и психотропные вещества следует хранить в безопасных и защищенных зонах.

Поскольку печатные упаковочные материалы считаются критическими для подтверждения идентичности лекарственного средства, следует уделять особое внимание безопасному и надежному хранению этих материалов.

Глава 4

Аппаратура для биотехнологического производства. Биореакторы

Вопросы для самоподготовки

- 1. Технологический регламент производства лекарственных средств.*
- 2. Блок-схема биотехнологического производства.*
- 3. Подготовительные операции биотехнологического производства.*
- 4. Биореакторы (ферментеры). Обязка ферментера.*
- 5. Процесс ферментации. Способы ферментации.*

4.1 Технологический регламент производства лекарственных средств

Технологический регламент охватывает все аспекты технологического процесса, требования к качеству сырья, внутрипроизводственному контролю, контролю качества, безопасности труда, экологической безопасности, утилизации отходов. Технологический регламент, основной технологический документ, является частью организационно-распорядительной и организационно - технологической систем документации предприятия, а также системы менеджмента качества, поэтому при его разработке не нарушают соответствие между документами предприятия, разрешительной документацией и регистрационным досье, а также учитывают требования надзорных органов, нормативных и нормативно-правовых документов, действие которых распространяется на производство ЛС. Технологический регламент производства ЛС используют в качестве основного технологического документа:

Глава 4. АППАРАТУРА ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА. БИОРЕАКТОРЫ

- при проведении технологических процессов в серийном производстве;
- разработке исходных данных для проектирования или реконструкции промышленного производства;
- установлении технико-экономических нормативов, в том числе норм расхода сырья и материалов;
- разработке технологических инструкций, а также инструкций по технике безопасности, производственной санитарии и противопожарным мероприятиям;
- разработке и осуществлении мероприятий по утилизации отходов производства, обезвреживанию и очистке промышленных стоков и выбросов в атмосферу.

В зависимости от назначения технологические регламенты подразделяют на лабораторные, опытно-промышленные, пусковые, промышленные.

Серийный выпуск товарной продукции осуществляют на основе промышленного регламента, который оформляют после завершения периода освоения промышленного производства нового ЛС вместо пускового регламента. Промышленный регламент состоит из следующих разделов:

- характеристика продуцента (в этом разделе проекта дается родовое и видовое название культуры, а также номер штамма продуцента. При использовании в производстве селекционированного штамма указывают, с помощью каких методов селекции он получен. Приводится характеристика морфолого-культуральных признаков продуцента: форма и размер колоний, характер поверхности колоний, цвет субстратного и воздушного мицелия. При неоднородности популяционного состава культуры дается характеристика основного типа колоний, обладающего наибольшей активностью. Также необходимо указать срок хранения и количество генераций, которое выдерживает культура без потери биологической активности.);

- характеристика сырья, промежуточных продуктов, исходных и упаковочных материалов (в этом разделе приводится характеристика сырья и материалов, которые используются на проектируемых стадиях технологического процесса. Все данные представляются в виде таблицы из регламента соответствующего производства. В примечании указывается, на какой стадии технологического процесса используется данный вид сырья или материал);

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

- характеристика готового продукта (в этом разделе приводится название готового продукта проектируемого производства в соответствии с нормативно-техническим документом (ФСП, АНД, ТУ, ГОСТ, ОСТ), назначение, основные фармакологические свойства, сведения о показателях качества, физико-химических и биологических свойствах и другие информационные данные, необходимые для выполнения технологических расчетов);

- технологическая схема производства;
- аппаратная схема производства и спецификация оборудования;
- изложение технологического процесса;
- материальный баланс;
- переработка и обезвреживание отходов производства;
- контроль производства;
- безопасная эксплуатация производства;
- охрана окружающей среды;
- перечень производственных инструкций;
- технико-экономические нормативы;
- информационные материалы.

4.2 Блок-схема биотехнологического производства

Общая схема технологического процесса должна наглядно (графически в виде блок-схемы) отображать последовательность выполнения работ в данном производстве по стадиям и операциям с указанием основных точек поступления сырья и материалов, получения промежуточных продуктов, точек технологического контроля, мест образования отходов, сточных вод, выбросов в атмосферу, систем очистки и утилизации. На схеме рекомендуется выделять критические процессы. Общую технологическую схему производства представляют в виде блок-схемы. Различают технологические схемы *двух видов*:

- *технологическая блок-схема производства;*
- *технологические схемы отдельных стадий производства.*

В *технологической блок-схеме* должны быть отображены функциональная связь и сущность производственных процессов и их последовательность, а также указаны виды контроля на каждой стадии. Блок-схема составляется по стадиям технологического процесса с указанием мест образования промежуточных и конечных продуктов, а

Глава 4. АППАРАТУРА ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА. БИОРЕАКТОРЫ

также потерь целевого продукта. На схеме отображают места образования отходов, сточных вод, выбросов. Графически стадии производства изображают в прямоугольниках с указанием параметров контроля. Каждая стадия производства должна иметь индекс, название и порядковый номер (рисунок 4.1).

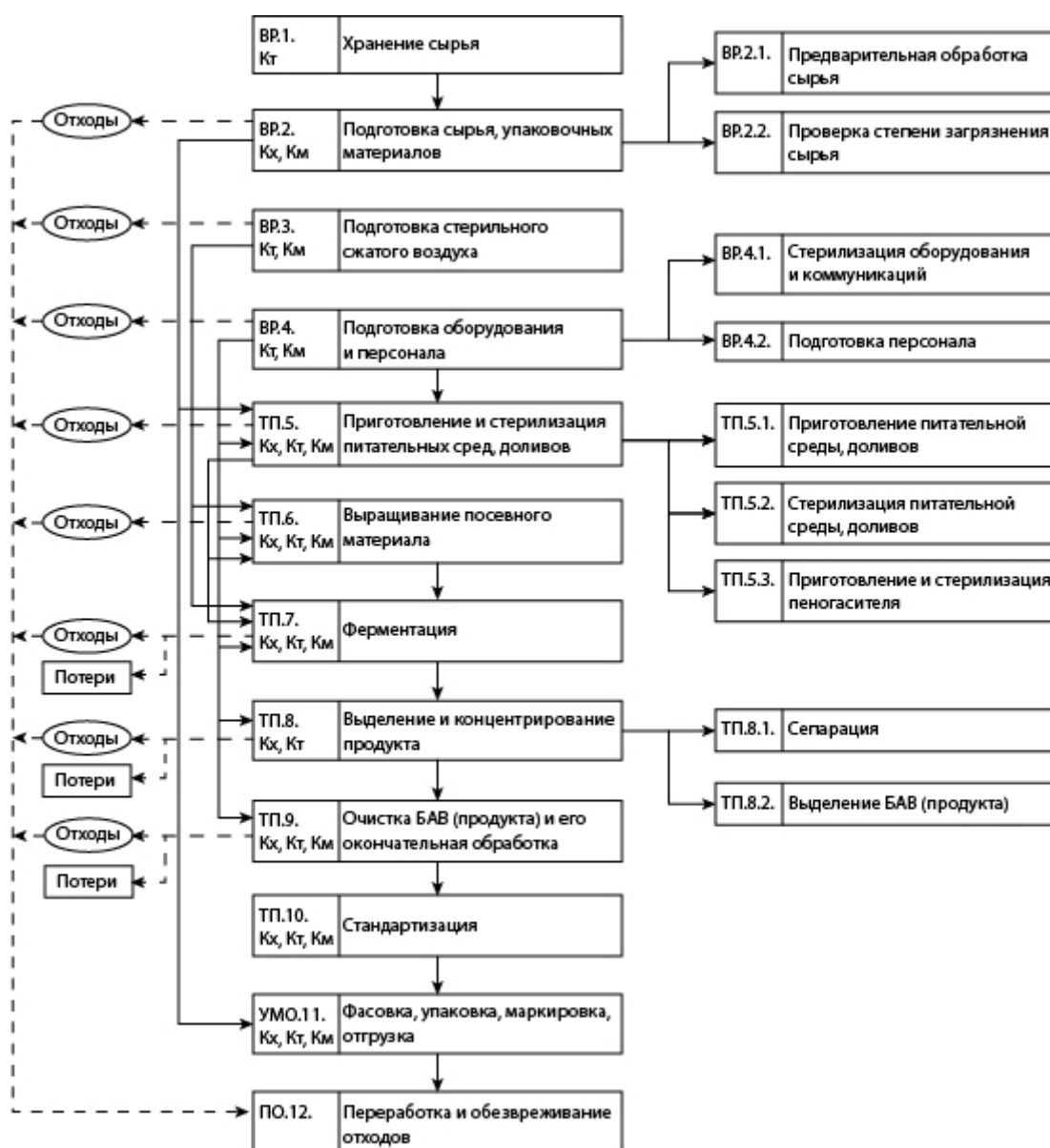


Рисунок 4.1 – Общая технологическая схема биотехнологического производства

В технологической схеме используются следующие условные обозначения стадий (индексы):

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

«ВР» – стадии вспомогательных работ;

«ТП» – стадии основного технологического процесса;

«ОБО» – стадии обезвреживания отходов;

«ОБВ» – стадии обезвреживания технологических и вентиляционных выбросов в атмосферу;

«УМО» – стадии упаковки, маркировки, отгрузки готового продукта;

«ПО» – стадии переработки и обезвреживания отходов.

Стадии по ходу технологического процесса имеют сквозную нумерацию независимо от их индекса. Стрелки, соединяющие элементы, демонстрируют последовательность выполнения и взаимосвязь стадий, а также направление движения материальных потоков.

Последовательность технологических операций представлена на рисунке 4.2:

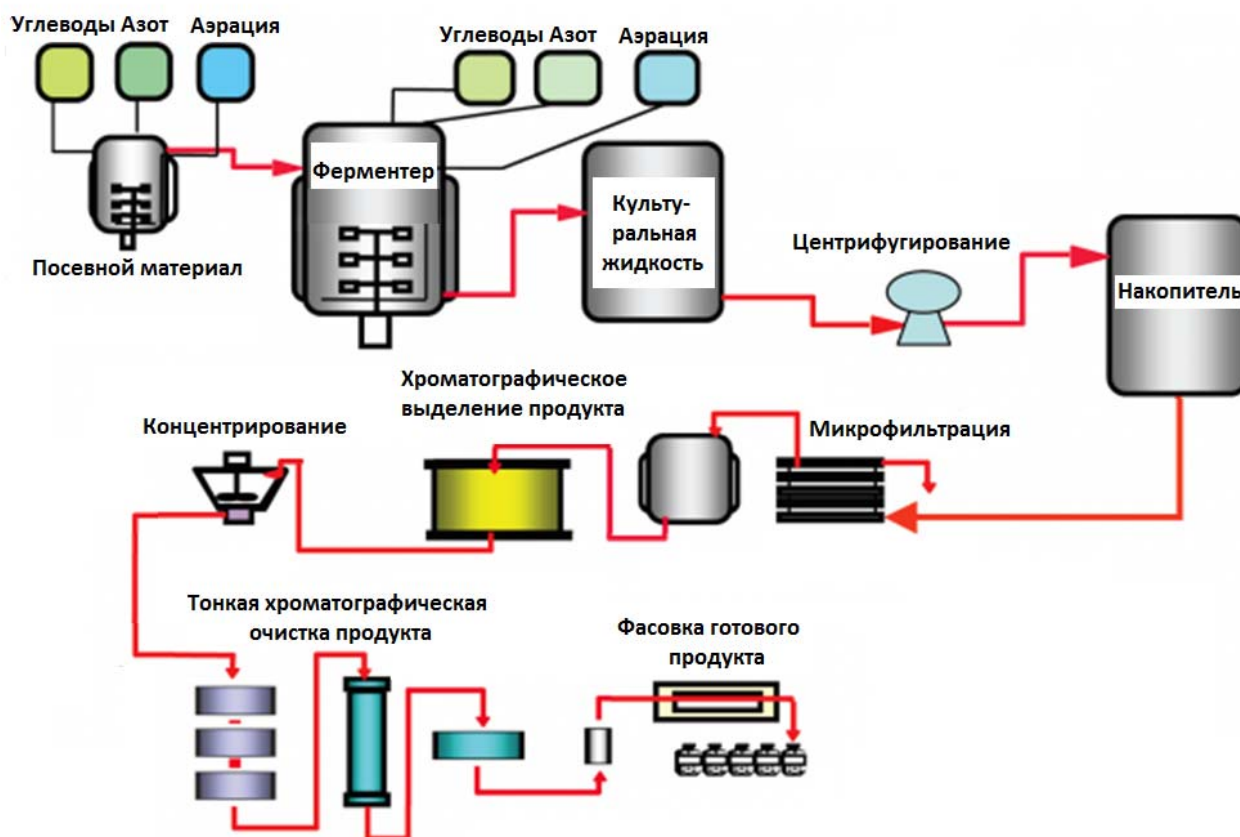


Рисунок 4.2 – Последовательность технологических операций

4.3 Подготовительные операции биотехнологического производства

Подготовка воздуха заключается в его стерилизации путем пропускания через мембранные фильтры с размером пор менее 0,45 мкм (стерилизующая фильтрация).

Подготовку воды проводят в 4 стадии: 1) удаление механических загрязнений на префилт্রে (пористое стекло, электрокоагуляция); 2) очистка от органических примесей на активированном угле; 3) деионизация с использованием анионитов и катионитов; 4) стерилизация на мембранных фильтрах с размером пор от 0,22 до 0,45 мкм.

Для стерилизации питательных сред используют периодическую (для некоторых термолабильных компонентов – витамины, гормоны) и непрерывную термическую стерилизацию под давлением и стерилизующую фильтрацию.

Перед работой ферментеры моют с применением моющих и дезинфицирующих средств и стерилизуют острым паром под давлением.

4.4 Биореакторы (ферментеры). Обвязка ферментера.

Биореактор – это аппарат для проведения ферментации и в тоже время – это техногенная экологическая ниша. Существует такое название как «обвязка ферментера», представляющая все основные рабочие узлы этого аппарата (рисунок 4.3):

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

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

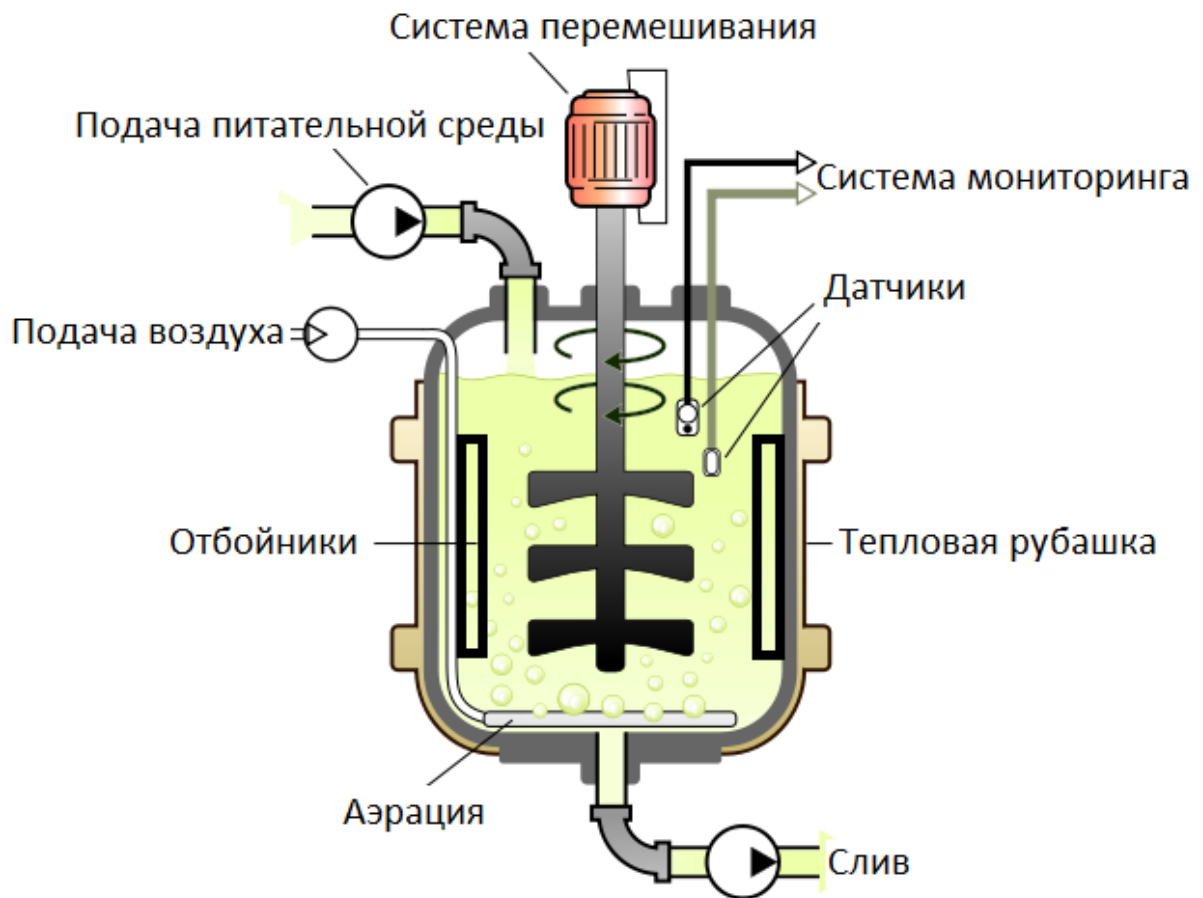


Рисунок 4.3 – Схема ферментера

Биореакторы классифицируются на твердофазные (среда плотная, вязкая или полужидкая) и жидкофазные (среда жидкая). Твердофазные реакторы подразделяются на биореактор типа лотка, биореактор типа вращающегося барабана, качающийся биореактор, биореактор с мешалкой, воздушный биореактор с псевдооживленным слоем.

Различают:

- биореакторы с механическим перемешиванием;
- барботажные колонны (для перемешивания через биореактор пропускают воздух);

- эрлифтные реакторы (перемешивание обеспечивается внутренней или внешней циркуляцией культуральной среды за счет потока воздуха. При этом между верхними и нижними слоями культуральной жидкости создается градиент плотности).

В биореакторах с механическим перемешиванием воздух подается под давлением через разбрызгиватель (кольцо с множеством маленьких

Глава 4. АППАРАТУРА ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА. БИОРЕАКТОРЫ

отверстий). При этом образуются мелкие пузырьки воздуха и за счет механического перемешивания (при помощи мешалок) обеспечивается их равномерное распределение (рисунок 4.4).

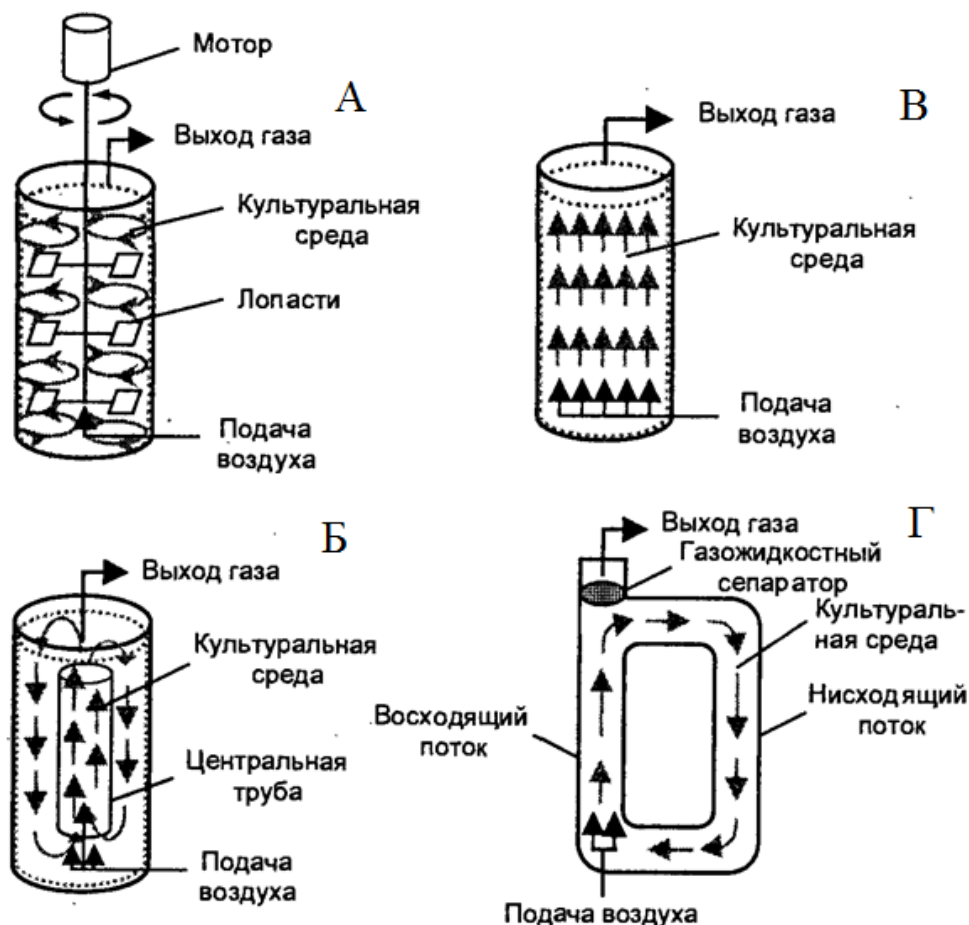


Рисунок 4.4 – Схемы реакторов различных типов: А – реактор с механическим перемешиванием, Б – эрлифтный реактор с внутренней циркуляцией, В – барботажная колонна, Г – эрлифтный реактор с внешней циркуляцией. Стрелками обозначено направление движения культуральной среды

В *барботажных колоннах* перемешивание происходит равномерно по всему объему восходящими потоками воздуха, что делает их более экономичными. Отсутствие мешалки предотвращает попадание в среду микроорганизмов. Не возникает сильных гидродинамических возмущений. Недостатки: по мере подъема мелкие пузырьки укрупняются, что делает их распределение неравномерным; сильное пенообразование.

В *эрлифтных биореакторах* воздух подают в нижнюю часть вертикального канала. Поднимаясь, воздух увлекает за собой жидкость к верхней части канала, где расположен газожидкостный сепаратор. Деаэрированная жидкость опускается по другому вертикальному каналу ко

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

дну биореактора и процесс повторяется. Существуют два типа: 1) с внутренней циркуляцией – имеется центральная труба, которая обеспечивает циркуляцию жидкости; 2) с внешней циркуляцией – среда проходит через отдельные независимые каналы.

4.5 Процесс ферментации. Способы ферментации

Каждый биотехнологический продукт получают по своей технологии, имеющей свои отличительные особенности, детали, свои способы организации производства. Однако во всех производствах, использующих биологические объекты, есть главная, продуктивная стадия – *стадия ферментации*.

Под *ферментацией* понимают любой процесс выращивания (культивирования) микроорганизмов в определенных условиях, в результате которого образуется целевой продукт.

Ферментация бывает *аэробная* и *анаэробная*.

Различают следующие виды аэробной ферментации: *поверхностная* и *глубинная*.

Технология выращивания микроорганизмов *поверхностным* способом довольно проста. Она заключается в том, что микроорганизмы культивируют на поверхности плотных, сыпучих или жидких питательных сред. Это периодический процесс.

Выращивание микроорганизмов *глубинным* способом происходит во всем объеме жидкой питательной среды в промышленных условиях в аппарате, который называется *ферментатором* (или *биореактором*), а в лабораторных условиях – в колбах на специальных качалках. Выращивание микроорганизмов глубинным способом может быть периодическим и непрерывным.

При *периодическом* способе глубинного культивирования в ферментатор (или ферментер) загружают сразу весь объем стерильной питательной среды и вносят посевной материал. Выращивание микроорганизмов проводят при оптимальных условиях в течение определенного времени, после чего процесс останавливают, сливают содержимое ферментатора и выделяют целевой продукт.

При *непрерывном* способе глубинного культивирования стерильная питательная среда непрерывно подается в ферментатор, в котором создаются оптимальные условия для роста микроорганизмов, а из

Глава 4. АППАРАТУРА ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА. БИОРЕАКТОРЫ

ферментатора также непрерывно вытекает культуральная жидкость, содержащая остатки питательной среды и клетки микроорганизмов.

Жидкость, которая образуется в процессе ферментации микроорганизмов и содержит целевой продукт, называется *культуральной жидкостью*.

Основная задача стадии ферментации – обеспечить максимально высокий синтез целевого продукта, что достигается соблюдением ряда условий.

Для успешного проведения процесса ферментации и достижения высокого уровня накопления продукта необходимо соблюдать определенные условия проведения процесса:

- приготовить качественную стерильную питательную среду;
- получить активный посевной материал;
- проводить процесс выращивания микроорганизмов в биореакторах специальной конструкции;
- не допускать загрязнения культуры-продуцента посторонними микроорганизмами, иными словами, обеспечить «стерильность» процесса ферментации;
- поддерживать необходимую температуру;
- соблюдать оптимальное значение рН среды и культуральной жидкости в процессе ферментации;
- обеспечивать культуру достаточным количеством кислорода;
- не допускать интенсивного вспенивания за счет использования этанола и поверхностно-активных веществ в качестве пеногасителей.

Культуры штаммов хранят на косом агаре при температуре 1–5°C; замороженными при минус 20°C или лиофилизированными в ампулах. Культуры клеток животных и человека хранят замороженными в специальной среде при минус 180°C.

Перед началом технологического процесса культуру берут из банка клеток и размножают в стерильных условиях в течение 24 ч на плотных или жидких средах. Вначале выращивают исходную культуру, затем пересевают ее в колбу, переносят в ферментер для посевного материала, а потом в промышленный ферментер. При этом контролируют жизнеспособность штаммов и их загрязненность другими микроорганизмами.

Процесс ферментации может быть условно разделен на **четыре** фазы (рисунок 4.5).

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

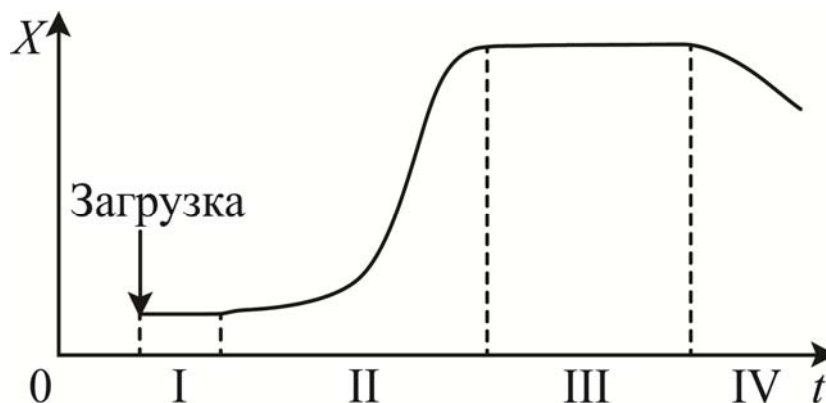


Рисунок 4.5 – Определение фаз ферментации по кривой роста биомассы в периодическом процессе

I – лаг-фаза; II – log-фаза; III – стационарная фаза; IV – фаза отмирания

В начале ферментации микроорганизмы некоторое время как бы приспосабливаются к новой среде. Эта фаза называется *лаг-фазой* и характеризуется низкой скоростью роста биомассы, низким потреблением питательных веществ.

Вторая фаза – *фаза экспоненциального роста*, или *log-фаза*, характеризуется интенсивным ростом культуры и быстрым потреблением всех питательных веществ среды с преимущественным использованием их в конструктивном обмене, т.е. в качестве пластического материала. При этом концентрация исходных веществ в среде резко снижается, некоторые вещества (например, минеральный фосфор) исчезают полностью, и в среде могут накапливаться продукты окислительного обмена, в частности, кислоты. В этот период происходит активная наработка первичных метаболитов.

В третьей фазе (*стационарная фаза*) в результате изменения состава среды и накопления биомассы меняется характер развития культуры. Рост культуры замедляется, затем прекращается. Начинается гибель клеток (автолиз). Потребление питательных веществ также замедляется. К концу ферментации углеводы, жиры и азотистые вещества используются почти полностью. Эта фаза характеризуется максимальным накоплением вторичных метаболитов, причем для каждого продукта существуют свои специфические условия, наличие которых в этот период способствует интенсивному образованию продукта, а отсутствие – снижению или даже полному прекращению биосинтеза.

Глава 4. АППАРАТУРА ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА. БИОРЕАКТОРЫ

Когда процессы автолиза начинают преобладать над ростом культуры, наступает *фаза отмирания*. Снижается концентрация жизнеспособных клеток, увеличивается выброс продуктов автолиза.

Глава 5

Питательные среды для культивирования микроорганизмов

Вопросы для самоподготовки

1. *Классификация питательных сред.*
2. *Источники углеводов.*
3. *Источники азота.*
4. *Источники минерального питания.*
5. *Среды для выращивания биообъектов.*

5.1 Классификация питательных сред

Получение любого биотехнологического продукта связано с выращиванием (культивированием) биологического объекта (микроорганизмов, клеток растений, животных) в питательной среде.

Компонентный состав питательной среды обеспечивает жизнедеятельность, рост и развитие биообъектов, эффективный синтез целевого продукта. Из питательной среды живая клетка получает необходимые вещества для роста (конструктивный метаболизм) и энергии (энергетический метаболизм).

Для получения продуктов биотехнологии в зависимости от биологического объекта и технологии производства используют различные питательные среды.

По составу компонентов питательные среды разделяют на три основные группы: на натуральные среды (состоящие из продуктов животного и растительного происхождения – мяса, костной муки, кормовых дрожжей, компонентов крови), синтетические (определенные химически чистые органические и неорганические соединения, взятые в точно указанных количествах), а также комбинированные среды.

Глава 5. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

По физическому состоянию среды подразделяются на три группы: плотные (добавляется агар-агар или желатин), жидкие и сыпучие.

Питательные среды должны содержать в легко усвояемом виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергетических потребностей. При культивировании ряда микроорганизмов в среды вносят факторы роста – витамины, некоторые аминокислоты, которые клетка не может синтезировать. Кроме этого в питательных средах должно строго соблюдаться значение рН и изотоничность. При культивировании большинства микроорганизмов и животных клеток оптимальна слабощелочная среда (рН 7,2–7,4). При нарушении изотоничности, возникает осмотический шок, приводящий к разрыву клеточной стенки или потере жизнеспособности клетки.

К базовым компонентам питательных сред относятся источники углерода, азота и минеральных соединений. К наиболее доступным источникам углерода относятся углеводы.

Получают питательные среды массо-объемным способом, при необходимости рассчитывают количество сухого вещества, которое нужно добавить к среде, или готовят долив. После приготовления среду стерилизуют, при невозможности – стерилизуют отдельные компоненты до смешивания. В ряде случаев сухие концентраты питательных сред разводят в необходимом количестве стерильной воды.

Большинство используемых питательных сред являются «именными». Среда Мурасиге–Скуга (MS0 или ЭмЭс-ноль)) – это питательная среда, используемая в лабораториях для выращивания растительных клеток. Эта среда была предложена физиологами растений *Тошио Мурасиге* и *Фольке К. Скугом* в 1962 году. При проведении экспериментов было установлено, что за счет варьирования количества минеральных веществ и органически связанного азота можно добиться существенно ускорения роста по сравнению с существовавшими составами. Данная среда и ее модификации – до сих пор наиболее часто используемая в лабораторной практике среда для экспериментов на культурах растительных клеток. Среда Мюллера–Хинтон (универсальная среда на основе мясо-пептонного бульона или агара используется для культивирования большинства микроорганизмов), среда Сабуро (культивирование грибов), среда Мозера–Рогоза–Шарпа (MRS) (культивирование лактобацилл), среда Эндо (определение лактазной активности микроорганизмов). Среда RPMI (англ. – Roswell Park Memorial Institutemedium) и ее модификации используются для выращивания

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

лимфоидных клеток человека. Среда содержит значительное количество фосфатов и может использоваться в CO₂-инкубаторах.

5.2 Источники углеводов

В биотехнологической промышленности широко используются чистые углеводы, а также природные и технические продукты, богатые углеводами. К ним относятся: глюкоза, зеленая патока, сахароза, меласса, лактоза, крахмал, кукурузная мука, пшеничная мука. Углеводы усваиваются клетками в виде моносахаров, поэтому для гидролиза олигосахаридов необходимы наличие ферментов-гидролаз.

Глюкоз (виноградный сахар). В фармацевтической промышленности для приготовления питательных сред используется техническая глюкоза. Она содержит не менее 99,5 % редуцирующих веществ в пересчете на сухое вещество, т.е. фактически представляет собой почти чистый углевод и является достаточно стандартным сырьем. Чаще используется в культивировании клеток животного происхождения.

Зеленая патока и гидрол. Представляет собой отход крахмало-паточного производства в виде густой сиропобразной непрозрачной жидкости коричневого цвета с характерным запахом. Этот продукт получают при первичной (зеленая патока) или вторичной (гидрол) кристаллизации гидратной глюкозы из растворов осахаренного крахмала. Зеленая патока и гидрол содержат 58–65% сухого вещества, 50–72 % в пересчете на сухую массу редуцирующих веществ (главным образом глюкозы), 7–20 % золы, 6–19 % NaCl, pH = 4...4,4. Кроме глюкозы в них присутствуют несбраживаемые сахара (около 18 % сухого вещества) и органические кислоты, а также содержатся фосфор, магний, железо в минимальных количествах. В связи с тем, что состав зеленой патоки и гидрола непостоянен, каждую партию проверяют в контрольных ферментациях на пригодность для биосинтеза.

Сахароза (свекловичный или тростниковый сахар). Представляет собой дисахарид, состоящий из глюкозы и фруктозы. В промышленности используется техническая сахароза, содержащая не менее 99,75 % сахарозы.

Лактоза (молочный сахар). Она содержится только в молоке и в других природных продуктах не обнаружена. Получают лактозу из молочной сыворотки, которая образуется при производстве сыров, творога

Глава 5. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

и казеина. Представляет собой дисахарид, состоящий из глюкозы и галактозы.

Крахмал. Один из наиболее распространенных запасных полисахаридов растений. Он интенсивно накапливается в результате фотосинтеза и откладывается в семенах, клубнях и других частях растений. Чаще всего крахмал получают из картофеля и кукурузы. Встречается также рисовый и пшеничный крахмал. Крахмал на 90–95 % состоит из полисахаридов, кроме того, в нем присутствуют минеральные вещества, жирные кислоты и белки (в незначительном количестве). Природный крахмал состоит из двух различных фракций, отличающихся по своему строению и свойствам. Примерно 20 % крахмала составляет *амилоза* и 80 % – *амилопектин*.

Амилоза – линейный полимер глюкозы. Она хорошо растворяется, в теплой воде, образуя растворы сравнительно невысокой вязкости. В молекуле амилозы остатки глюкозы последовательно связаны между собой α (1-4)-глюкозидными связями. Амилопектин с трудом растворяется в горячей воде, причем раствор получается коллоидным. Именно высокое содержание амилопектина в крахмале придает ему вязкость и клейкость. Амилопектин тоже представляет собой полимер глюкозы, но в его молекуле глюкозные остатки соединены не только α (1-4)-глюкозидными связями, но и имеют связи типа α (1-6). В среднем на 25 остатков глюкозы приходится одна α (1-6)-глюкозидная связь. Таким образом, в молекуле амилопектина глюкозные остатки образуют разветвленную структуру.

Если крахмал в воде постепенно нагревать, то он все сильнее набухает и, наконец, будет достигнута температура, при которой крахмал образует вязкий коллоидный раствор, называемый крахмальным клейстером. При этом происходит частичный гидролиз крахмала с образованием более простых сахаридов с меньшей степенью полимеризации, так называемых декстринов. В таком виде крахмал после клейстеризации легче подвергается воздействию ферментов микроорганизма-продуцента. Крахмал бывает растворимый и нерастворимый в воде. Растворимый крахмал при заваривании не образует коллоидного раствора, а остается практически прозрачным.

Кукурузная мука. Получают при размалывании зерен кукурузы. Она является самым дешевым продуктом из всех зерновых, и ее цена зависит лишь от степени помола зерна. В связи с этим различают *обойную* и *сортовую* кукурузную муку. Обойную муку получают при размалывании цельного зерна кукурузы с оболочкой, сортовая мука содержит только

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

размолотую крахмалистую часть зерна (без оболочки). Кукурузная мука содержит 67–70 % крахмала, около 10 % других углеводов (клетчатка, декстрин, растворимые углеводы), около 12 % белка, 4% жира, не более 15 % влаги и 0,9 % золы. Среди зольных элементов в наибольшем количестве присутствуют ионы калия, магния, натрия, кальция, железа, а также фосфаты, сульфаты и хлориды. Большое влияние на биосинтез, например, антибиотиков, оказывает степень измельченности кукурузной муки, ее дисперсность. Использование муки более мелкого помола с выходом при помоле 85 % позволяет повысить уровень антибиотикообразования на 12–24 %. В промышленных средах кукурузная мука часто заменяет крахмал, являясь более дешевым сырьем. Среда, в состав которых входит кукурузная мука, также предварительно заваривают для улучшения ассимиляции крахмала муки микроорганизмом-продуцентом.

В промышленности используют и пшеничную муку, которую получают при размалывании зерен пшеницы. По составу и применению пшеничная мука аналогична кукурузной муке.

Меласса. Отход сахарного производства. Представляет собой маточный раствор, образующийся при отделении кристаллов сахарозы на центрифуге при кристаллизации. По внешнему виду меласса – густая вязкая жидкость темно-коричневого цвета. Состав мелассы непостоянен, зависит от почвенных и климатических условий выращивания свеклы, технологии переработки, условий транспортировки и хранения мелассы. Нормальная меласса содержит 45–50 % сахарозы, 1,2–2,2 % общего азота, 6–10 % золы. В мелассной золе присутствует много калия, магния, кальция, но сравнительно мало фосфора. В мелассе содержится ряд аминокислот, органических кислот, витаминов группы В.

5.3 Источники азота

Источниками азотного питания для продуцентов служат различные вещества неорганического и органического (аминокислоты, белки, мочевины) происхождения. Различают общий азот (азот всех химических форм), аминный азот (азот свободных аминокислот) и белковый азот (азот аминокислот, входящих в состав белков). Источниками минерального (неорганического) азота чаще всего являются аммониевые соли азотной, серной и хлористоводородной кислот (амонийный азот) или нитраты

Глава 5. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

(нитратный азот). В качестве органического азота в промышленности наиболее широко применяются кукурузный экстракт и соевая мука.

Кукурузный экстракт. Отход производства крахмала из кукурузы. Это густая, непрозрачная, жидкая масса от светло-желтого до темно-коричневого цвета. При долгом стоянии масса уплотняется с образованием осадка. Поэтому перед употреблением кукурузный экстракт тщательно перемешивают.

Кукурузный экстракт – сложно стандартизируемое сырье. Его химический состав зависит от сорта кукурузы, условий выращивания, переработки, хранения, условий получения крахмала из зерен.

Общий состав кукурузного экстракта:

- общий азот: 6–8 %;
- аминный азот: 1–3 %;
- белковый азот: 0,8–2 %;
- углеводы: 0,1–10 %;
- органические кислоты: 15–20 %;
- зола: 20–24 %;
- вода: 45–55 %.

Кукурузный экстракт обладает буферными свойствами, в его составе присутствуют аминокислоты и органические кислоты, что придает ему в зависимости от содержания этих веществ основные или кислотные свойства.

В связи с этим при приготовлении питательных сред, содержащих кукурузный экстракт, его первым вместе с мелом (CaCO_3) кипятят при 100°C в течение 20–30 минут. Происходит реакция нейтрализации кислот, и кукурузный экстракт теряет свойство буферной емкости. Это позволяет в дальнейшем установить определенное значение pH в питательной среде.

Соевая мука. Получают при размалывании соевых бобов, а также соевого шрота и жмыха, остающихся после извлечения соевого масла. Соевая мука подразделяется на необезжиренную, полуобезжиренную и обезжиренную.

Необезжиренную муку получают после размола соевых бобов. *Полуобезжиренную* соевую муку получают после отжима соевого масла из зерна. Отжим, который называют жмыхом, размалывают и получают полуобезжиренную муку. Иногда жмых подвергают дополнительной обработке для доизвлечения остаточного масла. В результате получают шрот, при размалывании которого получают *обезжиренную* муку.

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

Кроме того, соевая мука бывает дезодорированная (обработанная паром) и недезодорированная. Обработка паром способствует инактивации ферментов сои, разрушающих белки, что улучшает сохранность соевой муки (до 1 года). Недезодорированная мука хранится 1,5–3 месяца.

Из основных компонентов соевой муки особое значение для процессов ферментации имеют азотистые вещества, представленные главным образом белками, на их долю приходится до 40 %. Кроме белков, в соевой муке содержится до 25 % углеводов, до 2,5 % органических кислот и 4–6 % золы.

На производстве при приготовлении питательных сред, содержащих соевую муку, предварительно готовят ее суспензию и заваривают. Заваривание суспензии проводят для облегчения утилизации соевой муки микроорганизмом, т.е. расщепления ее протеолитическими ферментами продуцента. Кроме того, после заваривания соевая мука равномерно (без комочков) распределяется по всему объему аппарата.

Соевая мука является очень пеногенным компонентом, вызывая сильное вспенивание культуральной жидкости в процессе ферментации. В процессе заваривания белки соевой муки частично денатурируются, что уменьшает способность ее к пенообразованию. Затем, для удаления летучих компонентов, способствующих пенообразованию, через заваренную муку продувают сжатый воздух.

5.4 Источники минерального питания

Минеральные компоненты (макро- и микроэлементы) играют важную роль в жизнедеятельности микроорганизмов. Многие из них входят в состав протоплазмы микробной клетки в качестве составных частей некоторых ферментов, другие элементы выступают в качестве компонентов, регулирующих осмотическое давление или изменяющих гидрофильность протоплазмы клеток.

Макроэлементы. (P, S, K, Na, Ca, Mg, Fe) выполняют важнейшие физиологические функции клетки: регулируют проницаемость клеточной мембраны, участвуют в переносе энергии, выполняют роль активаторов ряда ферментов и т.д. Самым важным из макроэлементов является фосфор, который необходим для жизнедеятельности всех микроорганизмов, т.к. входит в состав важнейших соединений клетки: нуклеопротеидов, нуклеиновых кислот, полифосфатов, фосфолипидов и т. д.

Глава 5. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

До 5% фосфора содержится в кукурузном экстракте, или фосфор добавляют в питательные среды в виде солей фосфорной кислоты.

Микроэлементы. (Cu, Zn, Mn, Mo, Co и др.) играют существенную роль в жизнедеятельности микроорганизмов, т.к. почти все процессы синтеза и превращения веществ осуществляются при помощи ферментов, в состав которых часто входят микроэлементы. Названные элементы обладают высокой каталитической активностью в процессах внутриклеточного обмена.

В состав питательных сред микроэлементы добавляют в виде солей неорганических кислот в очень незначительных количествах.

5.5 Среда для выращивания биообъектов

Для промышленного культивирования продуцентов биотехнологических продуктов обычно используют жидкие питательные среды, содержащие различные источники углерода, азота, набор минеральных солей.

Для каждого биообъекта изучают питательные потребности и создают свою индивидуальную композицию (пропись, рецептура) питательной среды.

При выращивании *микроорганизмов* используют, как правило, натуральные питательные среды, которые имеют простой состав, количество компонентов в них не более 8–15, но компоненты, особенно источники углерода (крахмал, кукурузная мука), добавляют в высоких концентрациях (5–10 %).

При культивировании *клеток растений* чаще используют синтетические среды с большим количеством ингредиентов (до 25). Эффективным источником углерода является глюкоза или сахароза, а источником азота – аммониевые соли неорганических кислот, мочевины и смесь аминокислот.

Обязательно в состав сред вводят различные микроэлементы, которые для удобства дозирования добавляют в виде концентрата, содержащего до 6–8 солей, причем обязательно марки «х.ч.», не содержащие примеси.

Важным и обязательным компонентом питательных сред для выращивания растительных клеток являются фитогормоны (ауксин, кинетин, индолуксусная и гиббереллиновая кислоты).

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

Потребности в питании у *клеток млекопитающих* намного сложнее, чем у прокариотических микроорганизмов. В связи с этим питательные среды для выращивания этого биообъекта сложнее по составу и содержат до 50–60 компонентов. Для синтеза белков им требуется смесь аминокислот, а для синтеза нуклеиновых кислот – пурины и пиримидины. Питательная среда, которая готовится на воде высокоочищенной, должна содержать глюкозу в качестве источника углерода и энергии, смесь витаминов и сбалансированную смесь минеральных веществ для поддержания нужного осмотического давления в клетках и оптимального рН среды (около 7,2). В среду необходимо добавлять также небольшое количество антибиотиков во избежание бактериального заражения. Кроме того, эта среда должна содержать 5–20 % сыворотки крови (человека или теленка), обеспечивающей клетку необходимыми гормонами и ростовыми факторами.

К ростовым веществам, специфичным для роста *клеток животных*, можно отнести: инсулин, глюкагон, простагландины E₁ и E₂, соматомедин С, гидрокортизон, прогестерон, эстрадиол, тестостерон и другие. Для оптимального роста культуры требуется температура, близкая к 37°C. При температуре ниже 36°C клетки делятся очень слабо или не делятся совсем, а выше 38°C – клетки погибают.

Глава 6

Методологические подходы к выделению и очистке биологически активных веществ

Вопросы для самоподготовки

1. *Разработка стратегии выделения целевых продуктов.*
2. *Методы выделения и концентрирования.*
3. *Особенности сушки биотехнологической продукции.*

6.1 Стратегия выделения целевых продуктов

Выделение и очистка продукта биотехнологического производства происходит на постферментативной стадии, для которой характерно низкое содержание целевого продукта и наличие большого количества примесей. Процесс выделения и очистки представляет собой ряд последовательных технологических операций, количество которых возрастает с повышением желаемой чистоты конечного продукта.

В зависимости от *типа* культуральной среды подходы к выделению целевого продукта могут варьировать (рисунок 6.1).

Если мы имеем дело с *плотной или сыпучей средой*, то для извлечения биологически активных веществ (БАВ) сперва необходимо провести гомогенизацию субстрата и продуцента с целью разрушения клеточных стенок и клеточных структур. Либо провести экстракцию (смыв) БАВ с плотной или сыпучей среды. Затем происходит выделение, концентрирование и очистка целевого продукта.

Если процесс ферментации происходил *на жидкой питательной среде*, то необходимо провести процесс сепарации. Далее поступают в зависимости от того, где накапливается целевой продукт: в биомассе или в культуральной жидкости.

Целевой продукт может представлять собой сами клетки

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

микроорганизмов, которые после отделения от культуральной жидкости необходимо дополнительно обработать (например, подвергнуть лиофильной сушке). Так получают готовые лекарственные средства – пробиотики.

В случае, если целевой продукт накапливается внутри клеток, необходимо проводить процесс дезинтеграции.

В культуральной жидкости после окончания процесса ферментации содержатся микроорганизмы, продукты их жизнедеятельности, остатки питательной среды, пеногаситель, растворимые и нерастворимые вещества. Если целевым продуктом биосинтеза являются метаболиты, растворенные в культуральной жидкости, то проводят выделение продукта, его концентрирование и последующую очистку.



Рисунок 6.1 – Стратегия выделения и очистки целевых продуктов в зависимости от типа питательной среды

Экстракцию БАВ (например, ферментов) с *поверхности питательных сред* проводят при помощи растворителей.

Для извлечения БАВ из *дрожжей или бактерий* необходимо подвергнуть механическому или автолитическому разрушению их клеточные стенки, обладающие высоким диффузионным сопротивлением.

Глава 6. МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ВЫДЕЛЕНИЮ И ОЧИСТКЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

На полноту экстрагирования БАВ из культур оказывают влияние многие факторы: температура, рН, длительность процесса, конструктивные особенности экстракционных аппаратов, природа извлекаемого БАВ, количество отобранного экстракта с единицы массы загруженной в аппарат культуры и т. д.

Для экстракции широко используются диффузионные батареи, состоящие из нескольких экстракторов.

Гомогенизацию (получение однородной массы, сопровождающееся разрушением клеточных структур) культур проводят при помощи ножевых, пестиковых гомогенизаторов, валковых или шаровых мельниц (для плотного материала), попеременного замораживания – оттаивания ткани (разрушается клеточная оболочка), ультразвуковой обработки, пресс-метода (замороженный материал пропускают через маленькие отверстия стального пресса под высоким давлением – «мясорубка») и метода «азотной бомбы», при котором микробные клетки сначала насыщают азотом под высоким давлением, затем резко сбрасывают давление, т.е. выделяющийся газообразный азот разрушает клетки.

За дезинтеграцией клеток следует **этап отделения фрагментов клеточных стенок**. Используют те же методы, что и при сепарации клеток: центрифугирование или фильтрацию. Однако применяют более высокоскоростные центрифуги и фильтры с меньшим диаметром пор (часто мембранные), чем при сепарации клеток. В большинстве биотехнологических процессов клеточные стенки отбрасывают, как балласт, но возможно и промышленное получение компонентов клеточных стенок как целевого продукта. Дальнейшее выделение целевого продукта из гомогенизата осуществляют при помощи общих методов выделения и концентрирования.

Если целевой продукт находится в культуральной жидкости, очищенной от биомассы, то проводят его выделение из культуральной жидкости и его концентрирование. Большинство целевых продуктов микробиологического синтеза нестабильны и подвержены влиянию различных факторов. Белки, например, исключительно чувствительны к нагреванию, изменению рН среды, к многим физическим и химическим воздействиям. Очень часто выделить целевой продукт с помощью одного метода практически невозможно. Поэтому применяют комбинацию нескольких методов.

При выборе метода выделения и концентрирования того или иного

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

продукта микробиологического синтеза необходимо учитывать следующие **факторы**:

1. Физико-химические свойства культуральной жидкости.
2. Свойства выделяемого продукта (термолабильность, стойкость к различным химическим агентам и др.).
3. Требования к конечной форме продукта (степень чистоты и степень концентрирования).
4. Технологические и технико-экономические показатели (выход продукта, производительность оборудования, необходимость дальнейшей обработки и др.).

6.2 Методы выделения и концентрирования

Все методы выделения продуктов микробиологического синтеза из культуральной жидкости делят на две группы:

1. Экстракция, ионный обмен, адсорбция, кристаллизация – если целевой продукт в растворе.
2. Осаждение, фильтрование, центрифугирование, сепарирование – если целевой продукт в виде твердой фазы.

Осаждение

Осаждение (седиментация) – это процесс расслоения дисперсных систем под действием силы тяжести и отделение дисперсной фазы в виде осадка.

Простейший случай седиментации – отстаивание – применяют в следующих случаях:

1. При диаметре частиц более 3 мкм, когда броуновское движение не оказывает существенного влияния на процесс отстаивания.
2. При выделении стабильных продуктов, когда фактор времени не имеет решающего значения.
3. При более низких, чем при других методах, затратах.
4. В особых случаях, когда необходимо разделить частицы на фракции по размеру или плотности на основании их различных скоростей осаждения.
5. Если необходимо предварительно разделить суспензию на две фракции – осадок и надосадочную жидкость, которые в дальнейшем можно обрабатывать на различном оборудовании.

Глава 6. МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ВЫДЕЛЕНИЮ И ОЧИСТКЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Скорость осаждения биомассы из культуральной жидкости невелика и составляет порядка $10^{-6} - 10^{-7}$ м/с.

Для ускорения процесса осаждения применяют:

1. Коагулянты – вещества, переводящие взвешенные частицы в агрегатно-неустойчивое состояние.

2. Флокулянты – вещества, способствующие разрушению коллоидных структур и образованию крупных хлопьев.

В качестве коагулянтов применяют обычно желатин, рыбный клей, казеин, в качестве флокулятов – метилцеллюлозу, пектин, альгинат натрия и др.

Центрифугирование

Центрифугирование – это разделение неоднородных систем под воздействием поля центробежных сил. Для центрифугирования применяют центрифуги различных конструкций. Разные типы центрифуг оценивают по так называемому фактору разделения, который показывает во сколько раз ускорение центробежного поля больше ускорения свободного падения g . У обычных центрифуг этот фактор составляет до 3500, а у суперцентрифуг выше – 5000–7000. Ультрацентрифуги могут иметь фактор разделения до 20 000. Центрифуги, имеющие высокий фактор разделения и оснащенные тарельчатым барабаном, называют сепараторами. В микробиологической промышленности сепараторы являются одним из самых распространенных типов центрифуг. Сепараторы позволяют сконцентрировать осадок до влажности 60–90 %.

В последние годы появились специальные герметичные сепараторы, позволяющие вести процесс сепарирования в автоматизированном режиме, оптимально подобранном для специфических условий конкретных культуральных жидкостей.

Области применения центрифугирования:

1. Выделение биомассы из культуральной жидкости (бактерии, грибы, дрожжи).

2. Отделение различных целевых продуктов микробиологического синтеза (антибиотики, ферменты, витамины и др.), переведенных предварительно в твердую фазу.

3. Разделение эмульсий, образующихся при экстракции.

Недостатки центрифугирования:

- сложность конструкции, высокая энергоемкость и стоимость;

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

- сложность эксплуатации (ненадежность, вибрация, шум, необходимость периодической разборки и мойки);
- воздействие на клетку центробежной силы, нагрев, трудность герметизации и обеспечения асептических условий ведения процесса.

Главные достоинства центрифугирования и сепарирования – высокая производительность и высокая степень концентрирования – позволяют успешно конкурировать с другими способами выделения и концентрирования как в промышленных, так и в лабораторных условиях.

Фильтрация

Фильтрация – это разделение твердой и жидкой фаз суспензии при пропускании ее через пористую перегородку. Конечная цель фильтрации – получение твердой или жидкой фазы (когда одна из них является отходом), а также одновременное получение твердой и жидкой фаз.

Фильтрация – гидродинамический процесс, скорость которого прямо пропорциональна разности давлений, создаваемой по обеим сторонам фильтровальной перегородки и обратно пропорциональна сопротивлению, испытываемому жидкостью при ее движении через поры перегородки и слой образовавшегося осадка.

На процесс фильтрации влияет ряд факторов, которые можно разделить на две группы:

1. Макрофакторы – разность давлений, толщина слоя осадка, вязкость жидкой фазы и др. Эти факторы заведомо известны и контролируются с помощью приборов.

2. Микрофакторы – размер и форма частиц осадка и пор фильтровальной перегородки, толщина двойного электрического слоя на поверхности частиц и др. Эти факторы менее изучены и их характеризуют лишь косвенными методами. Именно микрофакторы оказывают решающее влияние на процесс фильтрации и затрудняют его масштабирование.

При фильтрации культуральной жидкости образуются большей частью студенистые хлопьевидные или мелкозернистые осадки, обладающие большим сопротивлением. Средняя скорость фильтрации при этом составляет всего 50 л/м² в час.

Для увеличения скорости фильтрации обычно используют два приема:

1. Предварительная обработка суспензий.

Глава 6. МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ВЫДЕЛЕНИЮ И ОЧИСТКЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

2. Применение вспомогательных фильтровальных материалов.

Предварительная обработка культуральной жидкости позволяет более полно перевести целевой продукт в жидкую или твердую фазу, обеспечить лучшее разделение фаз и получить продукт, годный для дальнейшей очистки и выделения. В результате предварительной обработки происходит коагуляция взвешенных частиц.

Наиболее распространены следующие способы предварительной обработки:

1. Кислотная коагуляция (применяется для выделения антибиотиков, стойких к низким рН).

2. Обработка электролитами.

3. Тепловая коагуляция (возможна в тех случаях, когда продукт стоек к нагреванию до 70–80°C).

4. В качестве вспомогательных фильтровальных материалов используются фильтровальные порошки, которые вносят в фильтруемую жидкость как наполнители или предварительно наносят на рабочую поверхность фильтра в виде грунтового слоя.

Ультрафильтрация

В основе *ультрафильтрации* лежит использование мембран с диаметром пор от 0,001 до 0,1 мкм. Ультрафильтрация применяется для разделения клеток и молекул.

Мембранные методы разделения, применительно к биологическим суспензиям, обладают рядом преимуществ.

1. Концентрирование и очистка осуществляются без изменения агрегатного состояния и фазовых превращений.

2. Перерабатываемый продукт не подвергается тепловым и химическим воздействиям.

3. Механическое и аэродинамическое воздействие на биологический материал незначительно.

4. Легко обеспечиваются герметичность и асептические условия.

5. Аппаратурное оформление компактно по конструкции, отсутствуют движущиеся детали.

6. Процесс не обладает высокой энергоемкостью, в большинстве случаев энергия затрачивается только на перекачивание растворов.

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

Экстракция

Экстракция — процесс разделения смеси твердых и жидких веществ с помощью избирательных (селективных) растворителей (экстрагентов).

Физическая сущность экстракции состоит в переходе извлекаемого компонента из одной фазы (жидкой или твердой) в фазу жидкого экстрагента при их взаимном соприкосновении. Экстрагируемые компоненты переходят из исходного раствора в растворитель вследствие разности концентраций, поэтому данный процесс относится к числу диффузионных. Процесс экстракции проводится обычно в двухфазных системах: «твердое тело-жидкость» или «жидкость-жидкость».

Область применения экстракции: выделение и очистка антибиотиков, витаминов и аминокислот.

Преимущества метода:

1. Низкие затраты.
2. Высокая скорость экстракционных процессов.

Недостаток метода: использование вредных, взрывоопасных органических растворителей.

Хроматографические методы

Хроматографическое разделение БАВ используют в различных вариантах: гель-фильтрация, ионообменная хроматография, аффинная хроматография. Разделение веществ путем хроматографии основано на их неодинаковом распределении между двумя несмешивающимися фазами.

1. **Ионообменная хроматография**: колонка наполняется гранулами адсорбента, которые несут заряженные катионные (NH_4) или анионные (SO_4) группы, способные захватывать ионы противоположного заряда. Данный метод используется для выделения ионизированных веществ из жидкости, а также для очистки нейтральных соединений от примесей ионной природы.

2. **Метод «молекулярных сит», гель-хроматография, гель-фильтрация**. Виды хроматографии, основанные на разделении веществ с различной молекулярной массой и диаметром частиц. Адсорбент захватывает и удерживает, например, только низкомолекулярные соединения, пропуская соединения с более высокой молекулярной массой.

3. **Аффинная хроматография**. Метод базируется на задерживании комплекса, образующегося из компонента разделяемой смеси и лиганда, который фиксирован на частицах носителя (наполнителя колонки). При данном методе используются агенты, способные специфически связывать

Глава 6. МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ВЫДЕЛЕНИЮ И ОЧИСТКЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

какое-нибудь одно конкретное вещество. Например, фермент очищают на колонке, заполненной его субстратом или специфическим ингибитором. Весьма эффективный метод разделения и очистки белковых и небелковых веществ основан на взаимодействии антигенов и антител. Разработанный на основании таких взаимодействий способ получил название иммуноаффинной хроматографии и существенно повысил разрешающую способность при введении в практику использования моноклональных антител. Блестящей иллюстрацией его эффективности является высокая степень одноэтапной очистки человеческого интерферона (чистота повышается примерно в 500 раз). В аффинной хроматографии могут использоваться групповые лиганды, связывающие, например, группу сходных по структуре ферментов. Такими лигандами являются кофакторы ферментов или их аналоги. Могут применяться и еще менее специфичные лиганды, связывающие довольно обширные классы веществ; например, алкильные и арильные группы или лиганды, представляющие собой текстильные красители. Преимущество аффинной хроматографии состоит в том, что с ее помощью можно в одну стадию осуществить полную очистку продукта из сложной многокомпонентной смеси (культуральной жидкости, цельных клеточных экстрактов и т. п.), тогда как другие способы требуют многоэтапной очистки и сопряжены с большими затратами труда и времени. Однако метод имеет и ряд недостатков, в частности высокая цена материалов, используемых в аффинной хроматографии (например, веществ, применяемых в качестве лигандов), а также быстрое забивание колонки пропускаемыми веществами. Последнее заставляет использовать их в периодическом, а не в непрерывном режиме. После каждого выделения продукта колонки промывают и частицы заполняющего геля также подвергаются очистке. Помимо аффинной хроматографии (которая иногда называется еще аффинной адсорбцией в геле) в крупномасштабных биотехнологических процессах для очистки продуктов все шире применяют аффинную преципитацию и аффинное разделение. При аффинной преципитации лиганд соединяется с растворимым носителем и, после взаимодействия с соответствующим выделяемым соединением, образующийся комплекс по мере его формирования выпадает в осадок. Иногда ускорение выпадения преципитата достигается путем добавления электролитов. Аффинное разделение основано на использовании системы, состоящей из двух водорастворимых полимеров, один из которых несет специфические

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

лиганды, а другой обладает сродством к примесным компонентам. В качестве примера можно привести разделение нуклеиновых кислот и белков. Для полимера, соединяемого с лигандом, берется полиэтиленгликоль, а другим компонентом является декстран.

Электрофорез

Наряду с хроматографией перспективными методами разделения веществ при биотехнологических процессах являются электрофорез и его модификации. В этих методах разделяемая смесь помещается в мощное электрическое поле, обеспечивающее движение ионизированных компонентов смеси. Различие в электрофоретической подвижности позволяет пространственно разделить входящие в ее состав компоненты. Современные варианты электрофореза используют (как и хроматография) пластинки или колонки с образующими гель наполнителями (агароза, полиакриламид, сефароза, оксиапатит и др.). Модификацией метода электрофореза является изоэлектрическая фокусировка или электрофокусировка. В этом методе раствор, насыщающий гель, содержит соединение с кислотными группами. Под влиянием электрического поля кислотные группы буферного соединения меняют степень ионизации, создавая тем самым градиент рН в направлении электрического поля. Электрически заряженные компоненты разделяемой смеси, нанесенной на гель, мигрируют по направлению к электроду противоположного знака. Поскольку эти компоненты передвигаются по градиенту рН, то они постепенно теряют свои заряды и в зоне, где рН соответствует изоэлектрической точке (точке электронейтральности), их движение прекращается. Каждый компонент концентрируется (фокусируется) в определенной области геля.

Кристаллизация

Кристаллизация – это выделение твердой фазы в виде кристаллов, главным образом, из растворов и расплавов. Кристаллизация антибиотиков и других биологически активных веществ основана на резком уменьшении их растворимости в результате изменения температуры раствора (обычно понижения, но иногда, например, в случае эритромицина – повышения) или перевода их в другую плохо растворимую химическую форму. Последнее достигается изменением рН раствора или добавлением соответствующего реагента, часто с одновременным снижением температуры. Кристаллизация является не только способом получения

Глава 6. МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ВЫДЕЛЕНИЮ И ОЧИСТКЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

антибиотиков в твердом виде, но и очень эффективным средством очистки от сопутствующих примесей, что является существенным преимуществом по сравнению с некоторыми другими методами разделения. Метод кристаллизации нашел применение в технологии получения антибиотиков (тетрациклина, эритромицина и др.), витаминов, полисахаридов.

Упаривание

Упаривание – это процесс концентрирования жидких растворов путем частичного удаления растворителя испарением при нагревании жидкости. В ряде случаев упаренный раствор подвергают последующей кристаллизации. Концентрированные растворы и твердые вещества, получаемые в результате упаривания, легче и дешевле перерабатывать, хранить и транспортировать. Например, сушку в производстве антибиотиков осуществляют при температуре 60–70°C под вакуумом, следовательно, данный метод недопустим при переработке многих термолabileльных биологически активных веществ.

6.3 Сушка биотехнологической и фармацевтической продукции

Получаемая в конце цикла культуральная жидкость содержит от 0,1 до 5% сухих веществ. На последующих стадиях из нее извлекают полезные продукты (биомасса, антибиотики, ферменты, аминокислоты и другие вещества), которые затем превращаются в конечную товарную форму. Большинство продуктов биологического синтеза выпускаются в сухом виде с остаточной влажностью не более 5–12 %.

Удаление влаги и тепловое воздействие в ходе сушки биомассы ведут к существенным изменениям, влияющим на качество готового продукта. Наибольшие трудности возникают при необходимости сохранить такие термолabileльные объекты, как живые микроорганизмы (бактериальные препараты) или ферментные препараты. Основными причинами их термолabileльности являются денатурация белка и инактивация ферментов при тепловом воздействии, увеличение концентрации электролитов и токсичных веществ при удалении влаги, а также структурные и механические повреждения в процессе сушки.

По исходному агрегатному состоянию влаги различают следующие методы сушки: сушку из жидкого состояния, испарение из твердого

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

состояния, минуя жидкую фазу, – сублимацию.

Сушка культуральной жидкости или биомассы осуществляется контактным, конвективным и радиационным способом.

При *контактной сушке* тепло передается высушиваемому материалу через нагретые поверхности и испаряющаяся влага переходит в воздух. Для сушки продуктов биологического синтеза применяются одно- и двухвальцовые шкафные сушилки.

При *конвективной сушке* тепло, необходимое для процесса сушки, доставляется газообразным сушильным агентом, который играет роль теплоносителя и среды, в которую переходит влага из материала. Этот метод широко применяется для сушки продуктов биологического синтеза и, прежде всего, в пневматических, аэрофонтанных, распылительных сушилках и сушилках в кипящем слое.

Поскольку большинство продуктов биологического синтеза являются термолабильными веществами, то для их сушки применяются наиболее щадящие методы. При этом стремятся снизить температуру и время сушки. Для этих целей используют вакуум или сушку тонкодисперсного материала. Еще более выгодные условия для сушки термолабильных веществ создаются при сублимации.

Сублимационный метод сушки основан на удалении влаги из замороженного состояния, причем, влага переходит в газообразную фазу, минуя жидкую.

Характерными особенностями сублимации являются минимальные по сравнению с другими методами сушки изменения структуры высушиваемого материала и более низкие температуры высушивания. Поэтому сублимационная сушка применяется для особо термолабильных продуктов, например живых микроорганизмов, ферментов, некоторых антибиотиков.

Причиной гибели клеток может быть чрезмерное обезвоживание в процессе сублимационной сушки. Для защиты клеток от гибели при замораживании и последующем высушивании применяются специальные защитные среды, включающие глицерин, сахарозу, поливинилпирролидон и другие вещества, замедляющие образование внутриклеточного льда, уменьшающие концентрирование электролитов и защищающие клетки от грубого необратимого обезвоживания.

Глава 7

Биологическая и экологическая безопасность в биотехнологическом производстве

Вопросы для самоподготовки

1. *Понятие о биологической и экологической безопасности лекарственных средств.*
2. *Утилизация отходов биотехнологического производства.*

7.1 Понятие о биологической и экологической безопасности лекарственных средств

Биологическая безопасность – это сохранение живыми организмами своей биологической сущности, биологических качеств, системообразующих связей и характеристик, предотвращение широкомасштабной потери биологической целостности, которая может иметь место в результате:

- внедрения чужеродных форм жизни в сложившуюся экосистему;
- введения чуждых вирусных или трансгенных генов или прионов;
- бактериального загрязнения пищи;
- воздействия генной терапии, или инженерии, или вирусов на органы и ткани;
- загрязнения природных ресурсов (воды, почвы).

Биотехнологическое производство представляет определенную опасность, поскольку существует риск попадания биообъектов в окружающую среду. Основную опасность представляют микроорганизмы. Контроль в этом случае предусматривает:

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

1. Герметичность аппаратуры.

2. Стерилизацию ферментера и трубопроводов специальными веществами, не разъедающими металл, из которого изготовлена аппаратура.

3. Генетические методы: вставление дефекта в биообъект, т.е. уничтожается ген, обуславливающий образование фермента, синтезирующего какой-либо витамин или аминокислоту – при этом биообъект может размножаться только на определенной питательной среде, но при попадании в окружающую среду он гибнет (в окружающей среде нет для него жизненно важных питательных веществ, привычной для него питательной среды).

4. Физические методы, такие, как уменьшение атмосферного давления в ферментере на несколько миллиметров ртутного столба. В этом случае при нарушении герметичности не будет происходить выброс продуцента в атмосферу (согласно общим физическим законам разности давлений).

5. Методы, позволяющие обнаруживать так называемые «убежавшие» в окружающую среду микроорганизмы. В производственном цехе делают смывы и в них опускают зонды. Эти зонды имеют антитела к антигенам биообъекта, антитела связаны с железом, играющим роль метки. Если в смывах имеются клетки с антигенами, то они будут прилипать к зонду.

Экологическая безопасность – допустимый уровень негативного воздействия природных и антропогенных факторов экологической опасности на окружающую среду и человека. Экологическая безопасность является частью политики национальной безопасности Республики Беларусь. С целью обеспечения экологической безопасности осуществляется экологический мониторинг, который включает:

- нормирование воздействий на окружающую среду;
- контроль источников воздействия на окружающую среду;
- контроль качества компонентов окружающей среды;
- мониторинг экологических рисков;
- мониторинг индикаторов устойчивого развития.

Все эти мероприятия направлены на своевременное выявление нарушений и предупреждение возникновения неблагоприятных воздействий на окружающую среду.

7.2 Утилизация отходов биотехнологического производства

Способы предупреждения попадания продуцента в окружающую среду

Во-первых, после использования культуральной жидкости ее стерилизуют и только после этого смешивают со сточными водами. Во-вторых, в геноме многих продуцентов имеется дополнительная потребность в азоте, и они могут размножаться только на хороших питательных средах, поэтому при выходе из ферментера они уже размножаться не могут. В-третьих, продуцент делают капризным, т.е. зависимым от какого-либо вещества питательной среды, без которого он размножаться не может (например, это может быть также какая-либо витаминная добавка).

Отходы биотехнологического производства классифицируются в зависимости от физического состояния: твердые отходы (мицелий, биомассы продуцента), жидкие отходы (отходы от культуральной жидкости), газообразные отходы.

Уничтожение твердых отходов

Известно, что при отделении мицелия фильтрованием получают сотни тонн мицелия в год. В нем имеются и остатки целевого продукта. В настоящее время мицелий подсушивают и отвозят на городские свалки (самый примитивный путь утилизации). Помещают мицелий в грунтовые ямы на бетонный пол, перемешивают с почвой и оставляют на несколько лет – почвенные микроорганизмы перерабатывают мицелий (этот путь утилизации удобный, но не перспективный). Бетонный пол делают для того, чтобы после закладки мицелия дождевые воды не вымывали бы вещества из мицелия и они не попадали бы в грунтовые воды. Более современные пути утилизации:

1. Мицелий можно стерилизовать, перемешивать и добавлять в корм сельскохозяйственным животным.
2. Мицелий можно добавлять в строительные материалы (например, в кирпич) – при этом увеличивается его прочность (перспективный путь).
3. Из мицелия можно извлекать различные фракции и использовать для определенных целей (например, из продуцента

Часть 1. Общие вопросы фармацевтической биотехнологии

тетрациклина можно извлечь общую липидную фракцию и использовать ее как детергент).

Очистка жидких отходов (отходов культуральной жидкости)

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

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

Во внешнем воздухе имеется смесь микроорганизмов (биоценоз). Они окисляют органические вещества до CO_2 и H_2O , при этом количество органических веществ уменьшается на 80–90%. Из всех микроорганизмов, попавших вместе с воздухом из внешней среды, активно размножаются только те микроорганизмы, пищей для которых служат органические вещества, находящиеся в стоках. Эти микроорганизмы называют активным илом. Он состоит из нескольких десятков видов микроорганизмов, из них:

- 70 % относятся к роду *Pseudomonas*;
- 20 % относятся к роду *Bacterium* – спорообразующие грамположительные палочки;
- 10 % относятся к роду *Bacillus* и грамотрицательным коккам.

3-й этап. *Сточные воды из аэротенка подаются во второй отстойник.* Во втором отстойнике происходит осаждение активного ила. Часть ила из отстойника вновь подают в аэротенк, а часть высушивают и используют как удобрение.

4-й этап. *Сточные воды подаются на биофильтры.* Биофильтры составляют блок доочистки. Биофильтры – это пленки, расположенные перпендикулярно течению жидкости. В них вмонтированы штаммы-деструкторы (разрушители), полученные методом генной инженерии (они насыщены плазмидами и окислительными ферментами).

5-й этап. *Хлорирование.*

Ликвидация газообразных отходов

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

**ЧАСТЬ II.
ЧАСТНЫЕ ВОПРОСЫ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ
БИОТЕХНОЛОГИИ.
КЛЕТОЧНАЯ
БИОТЕХНОЛОГИЯ**

Глава 8

Генная инженерия в фармацевтической биотехнологии

Вопросы для самоподготовки

1. Основные понятия генной инженерии.
2. Ферменты, применяемые при конструировании рекомбинантных ДНК.
3. Основные этапы создания трансгенных организмов.

8.1 Основные понятия генной инженерии

Генная инженерия (или технология рекомбинантных ДНК) – это совокупность экспериментальных процедур, позволяющих осуществлять перенос генетического материала из одного организма в другой.

Основным носителем генетической информации являются молекулы ДНК. Впервые о нуклеиновых кислотах сообщил *Ф. Мишер* в 1869 г. Через 75 лет, в 1944 г., *О.Т. Эвери* с сотрудниками доказали, что именно молекула ДНК служит хранилищем наследственной информации. В 1953 г. *Д. Уотсон* и *Ф. Крик* создали модель структуры ДНК, а в 1966 г. *М. Ниренберг*, *С. Очоа* и *Х.-Г. Корана* расшифровали генетический код и выделили ферменты (лигазы и рестриктазы), участвующие в метаболизме нуклеиновых кислот.

ДНК представляет собой двойную нить, скрученную в спираль. Каждая нить состоит из последовательно соединенных нуклеотидов. Каждый нуклеотид ДНК содержит одно из четырех азотистых оснований: гуанин (Г), аденин (А) (пурины), тимин (Т) и цитозин (Ц) (пиримидины). Каждое азотистое основание связано с дезоксирибозой, к последней, в

Глава 8. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

свою очередь, присоединена фосфатная группа. Между собой соседние нуклеотиды соединены в цепи фосфодиэфирной связью, образованной 3'-гидроксильной (3'-ОН) и 5'-фосфатной группами (5'-PO₄). Это свойство обуславливает наличие полярности в ДНК, т.е. противоположной направленности, а именно 5'- и 3'-концов: 5'-концу одной нити соответствует 3'-конец второй нити. Вторичная структура ДНК образуется за счет возникновения между азотистыми основаниями соседних цепей водородных связей. При этом основания нуклеиновых кислот всегда взаимодействуют одинаково: адениновое основание всегда взаимодействует с тиминном, а цитозиновое основание всегда взаимодействует с гуанином. Таким образом, реализуется принцип комплементарности.

Индивидуальными генетическими элементами со строго специфичной нуклеотидной последовательностью, кодирующими функциональные белки или РНК, являются гены. Ген представляет собой последовательность нуклеотидов ДНК размером от нескольких сотен до миллиона пар нуклеотидов, в которых закодирована генетическая информация о первичной структуре белка (число и последовательность аминокислот). Для регулярного правильного считывания информации в гене должны присутствовать: кодон инициации, множество смысловых кодонов и кодон терминации. Три подряд расположенных нуклеотида представляют собой кодон, который и определяет, какая аминокислота будет располагаться в данной позиции в белке.

Для прокариот характерна относительно простая структура генов. Так, структурный ген бактерии, фага или вируса, как правило, контролирует одну ферментативную реакцию. Специфичным для прокариот является оперонная система организации нескольких генов. Оперон представляет собой участок генетического материала, состоящего из 1, 2 и более сцепленных структурных генов, которые кодируют белки (ферменты), осуществляющие последовательные этапы биосинтеза какого-либо метаболита. Гены одного оперона расположены в кольцевой хромосоме бактерии рядом и контролируют ферменты, осуществляющие последовательные или близкие реакции синтеза (лактозный, гистидиновый и др. опероны). Структура генов у бактериофагов и вирусов в основном схожа с бактериями, но более усложнена и сопряжена с геномом хозяев. Например, у фагов и вирусов обнаружено перекрывание генов, а полная

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

зависимость вирусов эукариот от метаболизма клетки-хозяина привела к появлению экзон-интронной структуры генов.

Эукариотические гены, в отличие от бактериальных, имеют прерывистое мозаичное строение. Кодировующие последовательности (экзоны) перемежаются с некодирующими (интронами). В результате структурные гены эукариот имеют более длинную нуклеотидную последовательность, чем соответствующая зрелая иРНК, последовательность нуклеотидов в которой соответствует экзонам.

В основе генной инженерии лежит целенаправленное конструирование искусственных генетических систем вне организма и их введение в живой организм с целью создания нового организма (или модификации существующего). Это предполагает, что часть генов можно с помощью специальных ферментов вырезать из молекулы ДНК одного организма (донорная ДНК) и перенести в другой, реципиентный, организм. Такой перенос генов называется трансгенозом, а организмы, в ДНК которых включены чужеродные гены, носят название трансгенных.

Используемые для переноса генетические конструкции носят название рекомбинантных ДНК. В их состав входят фрагмент донорной ДНК (клонированная ДНК) и векторная ДНК (вектор, который отвечает за перенесение и встраивание клонируемой ДНК). Рекомбинантные ДНК становятся составной частью генетического аппарата реципиентного организма и придают ему новые уникальные генетические, биохимические, а затем и физиологические свойства.

8.2 Ферменты, применяемые при конструировании рекомбинантных ДНК

Большинство ферментов, используемых в технологии рекомбинантных ДНК, выделяют из клеток бактерий и используют для «разрезания» и «сшивания» фрагментов ДНК как прокариотических, так и эукариотических клеток. Эти ферменты можно разделить на несколько групп:

- ферменты, с помощью которых «вырезают» фрагменты ДНК (*рестриктазы*);
- ферменты, синтезирующие ДНК на матрице ДНК (*ДНК-полимеразы*) или РНК (*обратные транскриптазы, ревертазы*);
- ферменты, соединяющие фрагменты ДНК (*лигазы*);

Глава 8. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

- ферменты, изменяющие строение концов фрагментов ДНК.

Рестриктазы (эндонуклеазы рестрикции) – ферменты, с помощью которых «вырезают» фрагменты ДНК. Самая первая рестриктаза Eco RI была выделена из *E. coli*. Эти высокоспецифичные ферменты узнают и расщепляют определенные последовательности азотистых оснований в молекуле ДНК (сайты рестрикции).

В результате действия рестриктаз, как правило, образуются фрагменты (рестрикты) ДНК с уступами, т.е. на концах одна цепь длиннее другой, что образует своеобразный «хвост». Такие концы (хвосты) получили название «липких» концов, т. к. они способны к самокомплементарности. В результате рестрикции также могут образовываться и «тупые» концы (рисунок 8.1).

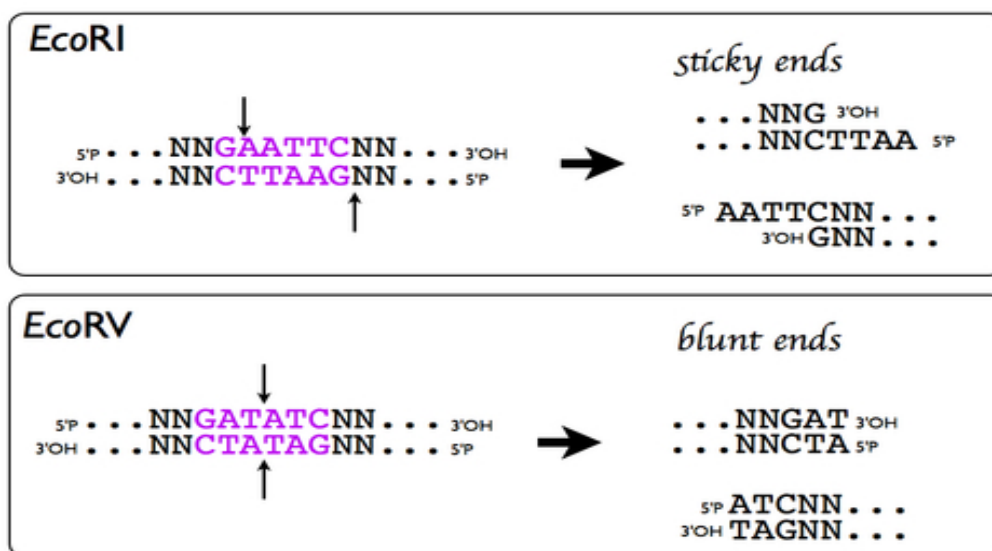


Рисунок 8.1 – «Разрезание» молекулы ДНК эндонуклеазами рестрикции с образованием «липких» и «тупых» концов

Обратные транскриптазы, ДНК-полимеразы – ферменты, синтезирующие ДНК на матрице ДНК. В генной инженерии часто используется ДНК-полимераза I, выделенная из клеток *E. coli* (Pol I). Фермент состоит из мономерной полипептидной цепи с молекулярной массой 103 кДа и имеет 3-х доменную структуру.

РНК-зависимая ДНК-полимераза (ревертаза) – это фермент, который используют для синтеза комплементарной цепи ДНК на базе мРНК.

Лигазы – ферменты, которые «сшивают» фрагменты ДНК за счет фосфодиэфирных связей, образующихся между 3'-гидроксильной

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

концевой группой одного фрагмента и 5'-фосфатной группой другого фрагмента. Из двух типов существующих лигаз для сшивки фрагментов ДНК обычно используют более универсальную лигазу фага T4, которая может соединять как «липкие», так и «тупые» концы. ДНК-лигазы необходимы в естественных условиях в процессах репарации и репликации ДНК.

К ферментам, *изменяющим строение концов фрагментов ДНК*, относится, например, щелочная фосфатаза, которая отщепляет от линейного фрагмента молекулы ДНК 5'-фосфатные группировки, что значительно снижает количество образующихся случайных, нежелательных комбинаций фрагментов ДНК. Нуклеаза Bal 31 – это фермент, неспецифически удаляющий нуклеотиды из последовательности ДНК. Он позволяет «подтупить» несимметричные концы ДНК, либо укоротить фрагменты ДНК, сближая их функционально значимые элементы.

8.3 Основные этапы создания трансгенных организмов

Процесс создания трансгенного организма достаточно сложен и часто требует индивидуального подхода. Однако в любом случае его можно подразделить на несколько общих этапов.

1. Получение (выделение) нужного гена (трансгена), намеченного для переноса.
2. Конструирование рекомбинантной ДНК (рекДНК).
3. Генетическая трансформация, т.е. перенос и включение рекДНК, содержащей трансген, в клетки реципиента.
4. Молекулярная селекция – отбор трансформантов, т.е. клонов, несущих рекДНК.

I этап. Ген может быть выделен из естественных источников (из подходящего генома) или из геномной библиотеки; синтезирован искусственно – химическим (по имеющейся последовательности нуклеотидов) или ферментативным (с использованием механизма обратной транскрипции) путем.

После проведения фрагментации (*рестрикции*) ДНК из смеси выделяют ДНК-фрагменты (*ДНК-рестрикты*). Для разделения ДНК-рестриктов прибегают к электрофорезу. Разделение основано на различии в размерах и константных отношениях электрический заряд-масса.

Глава 8. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Фрагменты в электрическом поле мигрируют в ходе электрофореза при частоте, зависящей от их размеров (массы). Чем больше (длиннее) фрагмент, тем медленнее он мигрирует в электрическом поле. Материалами, в которых проводят электрофорез, являются незаряженная агароза и полиакриламид. Для идентификации фрагментов используют этидий бромид, который окрашивает фрагменты ДНК. Результативность электрофореза очень высока, поскольку с его помощью могут быть разделены фрагменты, размеры которых составляют от 2 до 50 000 оснований. После электрофореза фрагменты смывают с агарозы при помощи подходящих методов.

Выделенные после электрофореза из агарозных гелей фрагменты ДНК можно предварительно подвергнуть секвенированию, т. е. определить в них нуклеотидную последовательность. Для этого используют химический и ферментативный методы секвенирования.

Химический метод основан на получении меченных радиоактивным фосфором (P^{32}) фрагментов и удалении из этих фрагментов одного из оснований с последующим учетом результатов радиоавтографии. Ферментативный метод основан на том, что в конец анализируемого фрагмента вводят нуклеотид, используемый затем в синтезе разных фрагментов *in vitro*, анализируемых на нуклеотидную последовательность электрофоретически. Для изучения специфических последовательностей нуклеотидов в молекуле ДНК используют также гибридизацию ДНК-ДНК, РНК-РНК, ДНК-РНК.

II этап. Фрагменты рекомбинантных ДНК и вектора, полученные после действия рестриктаз и содержащие определенные гены, «сшивают» одним из трех основных методов, в зависимости от того, какие концы имеют фрагменты – «тупые» или «липкие».

Сшивка по одноименным «липким» концам (рестриктазно–лигазный метод)

Этот метод является самым распространенным и популярным. Спаривание оснований происходит только между комплементарными последовательностями, поэтому ААТТ-концы, образуемые Eco RI, не будут спариваться, например, с АГЦТ-концами, образуемыми Hind III. Но любые два фрагмента (независимо от их происхождения), образовавшиеся под действием одной и той же рестриктазы, могут «слипаться» за счет образования водородных связей между односторонними участками,

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

состоящими из комплементарных нуклеотидов. Однако после такого спаривания полной целостности двойной спирали не восстановится, поскольку останутся два разрыва в фосфодиэфирном остове. Для его восстановления, то есть сшивания, или лигирования нитей используют фермент ДНК-лигазу (рисунок 8.2).

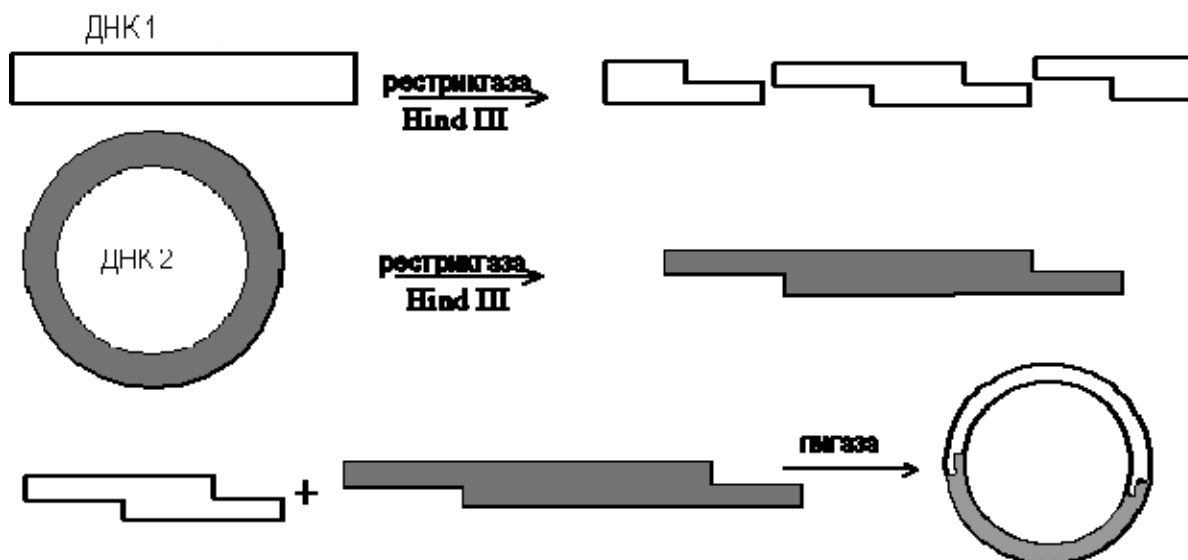


Рисунок 8.2 - Схема рестриктазно-лигазного метода

Сшивка по «тупым» концам (коннекторный метод)

«Тупые» концы могут быть соединены за счет действия *ДНК-лигазы*, если и фермент, и «тупые» концы присутствуют в реакционной смеси в высоких концентрациях. В этом случае реакция лигирования имеет свои особенности и ее эффективность ниже, чем при «сшивке» по «липким» концам.

Сшивка фрагментов с разноименными «липкими» концами

В ситуации, когда необходимо сшить фрагменты, образованные разными эндонуклеазами рестрикции, и имеющие разные, то есть некомплементарные друг другу «липкие» концы, применяют так называемые *линкеры* (или «переходники»).

Линкеры – это химически синтезированные олигонуклеотиды, представляющие собой сайты рестрикции или их комбинацию. Существуют большие наборы таких генных «переходников». Естественно, что при использовании линкеров должна учитываться необходимость соблюдения правил экспрессии генетической информации. Часто в середину линкера помещают какой-либо регуляторный генетический

Глава 8. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

элемент, например, промотор или участок, связанный с рибосомой. В этом случае линкеры обеспечивают не только объединение генов, но и обуславливают их экспрессию. Существуют линкеры «тупой конец - липкий конец».

При необходимости «липкие» концы можно превратить в «тупые». Это достигается либо отщеплением «липких» концов с помощью фермента – эндонуклеазы S1, которая разрушает только одноцепочечную ДНК, либо «липкие» концы «застраивают», то есть с помощью ДНК-полимеразы I на однонитевых «липких» концах синтезируют вторую нить.

III этап. Введение нового (рекомбинантного) гена в клетку можно провести двумя способами: используя вектор или путем прямого введения.

Вектор – молекула ДНК или РНК, способная переносить включенные в нее чужеродные гены в клетку, где эти молекулы реплицируются автономно или после интеграции с геномом (хромосомой). Не каждая молекула ДНК или РНК может быть вектором.

Векторы должны обладать определенными свойствами:

- способность к автономной репликации в клетке реципиента;
- наличие области, в которую возможно встраивание необходимого фрагмента ДНК; для этого вектор должен содержать один или более сайтов рестрикции;
- небольшой размер, так как при длине более 15 т.п.н. значительно снижается эффективность клонирования чужеродной ДНК;
- наличие маркерных генов, позволяющих отличить трансформированные клетки от исходных: это могут быть селективные (придающие клеткам устойчивость к антибиотикам, гербицидам) или репортерные (клетки удобно тестировать по изменению окраски продуктов этих генов) гены;
- наличие соответствующего промотора, под который необходимо поместить чужеродный ген для экспрессии в клетке бактерии.

Существует несколько типов векторов: *бактериальные плазмиды, вирусы* и т.д. Существуют гибридные векторы, содержащие ДНК фага и плазмиды. К ним относятся, например, *космиды и фазмиды*. Кроме того, в качестве векторов можно использовать хлоропластную и митохондриальную ДНК. Интерес представляют сегменты ДНК, которые контролируют собственную транспозицию (перемещение) из одного сайта ДНК в другой путем вырезания из исходного сайта и внедрения в новый сайт хромосомы или плазмиды – *транспозоны*. В качестве векторных

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

молекул могут также применяться искусственные хромосомы дрожжей и бактерий.

Методы прямого введения генов в клетку

Для введения генетического материала в клетки разных организмов применяют ряд общих методов прямого переноса, таких как: трансформация, трансдукция, трансфекция, микроинъекция, электропорация, метод «мини-клеток», упаковка в липосомы, электронная пушка.

Трансформация – метод введения рекомбинантной ДНК в клетку благодаря увеличению проницаемости ее клеточной оболочки. Клетки обрабатывают ледяным раствором CaCl_2 , а затем выдерживают при температуре 42°C в течение 1,5 мин.

Трансдукция – процесс переноса бактериальной ДНК из одной клетки в другую бактериофагом. Общая трансдукция используется в генетике бактерий для картирования генома и конструирования штаммов.

При **трансфекции** ДНК адсорбируется на кристаллах фосфата кальция (Грэхем Ван дер Эб, 1973). Образуются частицы кальциевого преципитата. Они поглощаются клеткой путем фагоцитоза. Для трансфекции используется декстран, полимер, адсорбирующий ДНК. Эффект вхождения в клетки и время экспрессии высоки, но частота стабильной трансформации ниже, чем при использовании преципитата кальция. Частоту трансфекции увеличивает глицериновый шок (4 минуты в 15% растворе глицерина).

Электропорация – метод заключается в воздействии импульсов высокого напряжения на мембрану, которое, скорее всего, вызывает временное образование большого количества пор, что обратимо увеличивает проницаемость мембран. Через образующиеся на короткое время поры чужеродная ДНК проникает в клетку. Это простой, эффективный и воспроизводимый метод. С его помощью были получены трансгенные растения кукурузы, риса и сахарного тростника.

Микроинъекция ДНК позволяет с помощью тонких микроигл и микроманипулятора вводить в клетку или прямо в ядро векторную ДНК с включенным в нее трансгеном. Данный метод обладает значительной эффективностью и позволяет вводить любую ДНК в любые клетки, и для сохранения в клетках введенного гена не требуется никакого селективного давления.

Глава 8. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

«*Мини-клетки*» получают путем блокирования донорных клеток в митозе коллемеидом. При продолжительной обработке клеток коллемеидом в них вокруг каждой хромосомы формируется новая ядерная мембрана. Обработка цитохалазином В и центрифугирование приводит к образованию мини-клеток, представляющих микроядра, инкапсулированные в цитоплазматическую мембрану.

Упаковка в липосомы используется для защиты экзогенного генетического материала от разрушающего действия рестриктаз. Липосомы, состоящие из фосфатидилсерина и холестерина, наиболее пригодны для введения ДНК в клетки животных и растений. Системы переноса с помощью липосом низкотоксичны по отношению к клеткам.

Метод *биологической баллистики (биолистики)* является одним из самых эффективных на сегодняшний день методов трансформации растений, особенно однодольных. Суть метода заключается в том, что на мельчайшие частички вольфрама, диаметром 0,6–1,2 мкм, напыляется ДНК вектора. Бомбардировку осуществляют с помощью генной пушки за счет перепада давления или под действием электрического разряда. При достаточной скорости частицы металла с напылением могут непосредственно проникать в ядро, что сильно повышает эффективность трансформации. Часть клеток, которые находятся в чашке Петри в центре под пушкой, гибнет, а часть, расположенная по периферии чашки, выживает и трансформируется. С помощью биолиственной пушки были трансформированы однодольные растения, такие как кукуруза, рис, пшеница, ячмень. При этом были получены стабильные растения–трансформанты.

IV этап. Молекулярная селекция. Для последующей идентификации трансформированных клеток, несущих рекомбинантную ДНК, вектор должен содержать один или несколько генов-маркеров. Выделяют две группы маркерных генов, позволяющих отличить трансформированные клетки от исходных, – селективные и репортерные гены:

Селективные гены – придают клеткам селективное преимущество, т.е. устойчивость к антибиотикам (канамицину, тетрациклину и др.) или гербицидам. Основным принципом работы у такого маркера – способность трансформированных клеток расти на селективной питательной среде с добавкой определенных веществ, ингибирующих рост и деление обычных клеток. Например, в присутствии гена лактамазы бактериальная клетка

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

обретает устойчивость к ампициллину и на среде с этим антибиотиком образует колонии, тогда как обычные клетки на этой среде погибают.

Репортерные гены – кодируют нейтральные для клеток белки, наличие которых в тканях легко обнаружить. В качестве репортерных чаще всего используют гены β -глюкуронидазы (GUS), зеленого флуоресцентного белка (GFP), люциферазы (LUC), хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (CAT). Из них в большей степени применяют гены, кодирующие белки GUS и GFP, и в меньшей – кодирующие белки LUC и CAT.

Глава 9

Культивирование изолированных клеток человека и животных

Вопросы для самоподготовки

1. Особенности культивирования животных клеток.
2. Условия и способы культивирования животных клеток.
3. Питательные среды для культивирования клеток животных.

9.1 Особенности культивирования животных клеток

Представление о том, что клетки тканей животных можно выделить из организма и затем создать условия для их роста *in vitro* впервые появилось в XIX веке. В 1885 году Ру показал возможность сохранения вне организма живых тканей на практике. В 1897 году Лёб поддерживал жизнеспособность клеток крови и соединительной ткани в пробирках с сывороткой и плазмой крови. В 1948 году Эрл впервые получил клоны клеток в культуре одиночной клетки. В настоящее время можно культивировать клетки практически всех тканей и органов человека, животных и растений.

Особенности культивирования животных клеток

Главной особенностью культивирования животных клеток является обеспечение их стабильного роста. К основным требованиям при культивировании клеток животных и человека относят: клетки должны преобладать в культуре, быстро адаптироваться к новым условиям, быстро расти, также должны соблюдаться строго стерильные условия культивирования, питательные среды должны быть стерильны и

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

изготавливаться на стерильной воде. Без создания специальных условий клетки не будут делиться в *in vitro*.

В соответствии с целями и задачами экспериментальной работы можно выделить два направления культивирования животных клеток:

- культуры клеток;
- культуры тканей и органов.

Характеристики культур клеток животных

Клетки лишены структурной организации, теряют исходные гистологические и биохимические признаки, т.е. с ними происходят следующие изменения:

- потеря способности к дифференциации;
- происходит дегенерация (перерождение);
- происходит трансформация.

Клетки могут выдерживать не более 50 удвоений, затем они умирают от старости.

Рост клеток – этот процесс еще называют **пролиферацией**– связан с увеличением биомассы, которая представляет собой число клеток, умноженное на среднюю массу клеток. Клетки животных обычно в своей массе не увеличиваются, так как их масса удерживается в определенных пределах за счет регуляторных процессов, поэтому, когда говорят о росте животных клеток, то при этом подразумевают только увеличение их числа (гиперплазия), а не гипертрофию – увеличение массы клетки.

Изменение ростовых свойств культивируемых клеток называется **трансформация**. Она может быть вызвана генетическими, химическими, радиоактивными и другими факторами. Трансформированные клетки не имеют ограничений в росте и продолжительности жизни. Для биотехнологии это является преимуществом. Трансформированные клетки способны расти в условиях, в которых геометрические характеристики, а именно отношение площади поверхности к объему менее благоприятны. Повышенная способность к росту трансформированных клеток означает, что трансформация преобладает над процессом старения.

Культивирование тканей и органов

Тканевая культура (гистокультура) состоит из экспланта и зоны роста. Огранная культура – культура, в которой эмбрионы, зачатки органов, целые органы поддерживаются таким образом, чтобы обеспечить дифференциацию и сохранить структуру и функции.

Глава 9. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Первичная культура. Источником этой культуры являются органы, экспланты или клетки, непосредственно извлеченные из организма. Клетки гетерогенны и характеризуются низкой пролиферативной способностью. К такой культуре также относятся опухолевые клетки, образованные культивированными клетками, введенными в организм животных.

Перевиваемая культура – культура, подвергавшаяся переносу из одного сосуда в другой. Это обеспечивает возможность продления существования культуры, клонирования, исследования и сохранения свойств клеток. После нескольких пересевов клеточная линия либо гибнет, либо трансформируется и становится *постоянной клеточной линией*.

9.2 Условия и способы культивирования животных клеток

Условия культивирования клеток животных

К условиям, способствующим размножению клеток, относятся их низкая плотность, невысокая концентрация Ca^{2+} , присутствие ростовых факторов.

Высокая плотность клеток (выше 10^5 клеток на 1 см^2) и концентрация Ca^{2+} (300–1500 мкмоль), присутствие индукторов дифференциации (гормоны, например, гидрокортизон; ретиноиды), полярные растворители (диметилсульфоксид) способствуют прекращению клеточного деления и индуцируют дифференциацию клеток.

Факторы, влияющие на скорость деления клеток

1) специфические (например, фибробласты реагируют на фактор роста фибробластов). Используют специфические вещества, которые влияют только на определенный вид клеток.

2) неспецифические (гормоны и их аналоги – инсулин, гидрокортизон, дексаметазон, эстрадиол, тестостерон, прогестерон, трийодтиронин). Эти факторы вызывают деление любых клеток.

Способы культивирования клеток животных

В зависимости от соотношения с поддерживающим субстратом (культуральная среда) выделяют монослойные и суспензионные культуры. Монослойная культура субстрат-зависимая и клетки могут расти только до полного закрытия поверхности и если поверхности нет, то клетки не

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

растут. Таким образом, появляется проблема создания поверхности для клеток.

В зависимости от способа посева (периодичности) выделяют проточные и непроточные.

Для **непроточных культур** характерно введение клеток в фиксированный объем среды. По мере роста клеток происходит использование питательных веществ и накопление метаболитов, поэтому среда должна периодически меняться, что приводит к изменению клеточного метаболизма, называемого еще физиологической дифференциацией. Со временем, в результате истощения среды происходит прекращение пролиферации клеток. Культивируют в матцах (плоские сосуды), во вращающихся колоннах, в колоннах на микроносителях (стеклянные бусы, микропластины). В качестве носителей используют алюмоборосиликатное стекло, не содержащее ионов натрия, подщелачивающих среду; пластик из полистирола, поликарбоната, поливинилхлорида, тефлона и др.; металлические пластинки из нержавеющей стали и титана.

В **проточной культуре** происходит постоянное продвижение (поступление и выведение) жидкой среды. Обеспечиваются истинные гомеостатические условия без изменения концентрации питательных веществ и метаболитов, а также числа клеток. Выделяют суспензионные и монослойные (на микроносителях) культуры. Суспензионные культуры в отличие от монослойных культур предпочтительнее с точки зрения увеличения выхода клеток.

Материал для культивирования клеток и тканей

Культивируют элементы соединительной ткани человека (фибробласты); скелетные ткани (кость и хрящи); скелетные, сердечные и гладкие мышцы; эпителиальные ткани; ткани печени, легких, почек; клетки нервной системы; эндокринные клетки (надпочечников, гипофиза, клетки островков Лангерганса); меланоциты и различные опухолевые клетки.

Также культивируют клетки почки обезьяны, почки собаки, почки кролика, куриные эмбрионы (в течение 14 дней), клетки легких эмбриона человека (16 недель).

9.3 Питательные среды для культивирования клеток животных

Клетки после извлечения их из ткани или организма помещают в культуральную среду, которая должна обеспечивать все внешние условия, которые клетки имели *in vivo*. Среда обеспечивает выживание клеток, их пролиферацию и дифференциацию. Питательная среда представляет собой раствор определенного состава, к которому добавляются компоненты биологического происхождения. Ключевым компонентом может являться сыворотка животных, например, эмбриональная бычья (телячья) сыворотка. Без такой добавки наибольшая часть культивируемых клеток не будет воспроизводить собственную ДНК и, следовательно, не будет пролиферировать. Также к таким добавкам относят: белки, незаменимые аминокислоты, незаменимые жирные кислоты, витамины, источники углерода (глюкоза 5,5 ммоль/л), предшественники простагландинов. Добавляют макроэлементы (натрия, калия и кальция хлориды), микроэлементы (ионы железа, меди, кобальта, цинка, селена).

Жидкие питательные среды, как правило, готовят на основе солевых растворов Эрла и Хенкса. Основные требования к питательным средам: стерильность; определенное осмотическое давление; определенный pH (регулируют путем добавления буферных растворов).

Осмотическое давление выражают в осмотической концентрации – концентрации всех растворенных частиц. Может выражаться как осмолярность (осмоль на литр раствора) и как осмоляльность (осмоль на килограмм растворителя). **Осмоль** – единица осмотической концентрации, равная осмолярности, получаемой при растворении в одном литре растворителя одного моля неэлектролита. Соответственно, раствор неэлектролита с концентрацией 1 моль/л имеет осмолярность 1 осмоль/л.

Осмолярность (*Osm*) электролита зависит от его концентрации, коэффициента диссоциации и числа ионов, на которые он диссоциирует:

$$Osm = n \times \Phi \times C ;$$

где Φ – коэффициент диссоциации, принимает значения от 0 (для неэлектролита) до 1 (полная диссоциация),

n – количество ионов, на которые диссоциирует молекула (например, для NaCl $n=2$, для H_2SO_4 $n=3$),

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

C – молярная концентрация.

Для раствора Эрла осмоляльность составляет 310,6 осмоль/кг. Эти параметры варьируют в зависимости от числа клеток: 1) для диплоидных фибробластов человека WI38 $pH=7,30\pm 0,15$ и осмоляльность – 285 ± 40 осмоль/кг; 2) для фибробластов из эмбриона цыпленка $pH=7,12\pm 0,18$ и осмоляльность – 300 ± 20 осмоль/кг.

Стандартные среды:

1) *среда Игла MEM* (minima essential medium) и *BME* (basal medium, Eagle) содержит минеральные вещества, 13 незаменимых аминокислот, 5 водорастворимых витаминов, холин, инозит. Основа – раствор Эрла. Используют только с эмбриональной телячьей сывороткой;

2) *среда Дульбенко*, или *DMEM* (двойная модифицированная среда Игла) – основа для бессывороточных сред. Содержит двойную концентрацию аминокислот, глицерин, серин, пируват и железо. Используют для различных типов клеток;

3) *среда Искова (IMDM)* – модифицированная среда Дульбенко. Содержит дополнительно витамин B_{12} , селенит натрия, 4-(2-оксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES). Кислота имеет буферные свойства. В среде снижена концентрация натрия хлорида и натрия гидрокарбоната. Используется для культивирования лимфоцитов и кроветворных клеток;

4) *среда МакКоя 5A* – модифицированная среда Ивката и Грейса (RPMI). Используется для культивирования лимфоцитов в присутствии эмбриональной телячьей сыворотки;

5) *среда 199* для поддержания перевиваемых культур.

Глава 10

Получение лекарственных средств на основе цитокинов (интерфероны)

Вопросы для самоподготовки

- 1. Определение, общие свойства и классификация цитокинов.*
- 2. Основные типы, видоспецифичность и фармакологическое действие интерферонов.*
- 3. Синтез интерферонов человека в генетически сконструированных клетках микроорганизмов.*
- 4. Контроль качества лекарственных средств на основе цитокинов (интерферонов).*
- 5. Применение цитокинов (интерферонов) в медицине.*

10.1 Определение, общие свойства и классификация цитокинов

Цитокины – это секретируемые активированными клетками пептидные медиаторы, осуществляющие регуляцию взаимодействий, активацию всех звеньев самой системы иммунитета и влияющие на различные органы и ткани. Цитокин выделяется на поверхность клетки А и взаимодействуют с рецептором находящейся рядом клетки В. Таким образом, от клетки А к клетке В передается сигнал, который запускает в клетке В дальнейшие реакции.

Основными продуцентами цитокинов являются лимфоциты. Кроме лимфоцитов их секретируют макрофаги, гранулоциты, ретикулярные фибробласты, эндотелиальные клетки и другие типы клеток. Цитокины регулируют межклеточные и межсистемные взаимодействия, определяют выживаемость клеток, стимуляцию или подавление их роста,

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

дифференциацию, функциональную активность и апоптоз, а также обеспечивают согласованность действия иммунной, эндокринной и нервной систем в нормальных условиях и в ответ на патологические воздействия.

Общие свойства цитокинов

1. Являются гликопротеинами с молекулярной массой 15–25 кД.
2. Действуют на саму клетку и на ее ближайшее окружение (т.е. ауто- и паракринно). Это короткодистантные молекулы.
3. Действуют в минимальных (пико- и фемтомолярных) концентрациях.
4. Цитокины имеют соответствующие им специфические рецепторы на поверхности клеток.

Классификация цитокинов

Цитокины разделяются на несколько основных групп:

1. Интерлейкины (ИЛ).
2. Интерфероны (ИНФ).
3. Группа факторов некроза опухоли (ФНО).
4. Группа колониестимулирующих факторов (например, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор – ГМ-КСФ).
5. Группа факторов роста (эндотелиальный фактор роста, фактор роста нервов и т.д.).
6. Хемокины.

По активности цитокины можно разделить на:

- противовоспалительные, обеспечивающие мобилизацию воспалительного ответа (интерлейкины 1,2,6,8, ФНО- α , интерферон- γ);
- противовоспалительные, ограничивающие развитие воспаления (интерлейкины 4,10, TGF- β);
- регуляторы клеточного и гуморального иммунитета (естественного или специфического), обладающие собственными эффекторными функциями (противовирусными, цитотоксическими).

10.2 Основные типы, видоспецифичность и фармакологическое действие интерферонов

Интерфероны представляют собой класс цитокинов. Существуют четыре основных типа интерферонов (всего более 20 белков): лейкоцитарный альфа-интерферон и близкий к нему омега-интерферон (гены локализованы в 9-й хромосоме); бета-интерферон (фибробластный) и гамма-интерферон (ИНФ- γ) – иммунный (Т-клеточный, ген находится в 12-й хромосоме).

Биологическая активность интерферонов очень высока. У мышиноного интерферона она составляет $2 \cdot 10^9$ ед/мг, а одна единица снижает образование вирусов примерно на 50 %. Это означает, что достаточно одной молекулы интерферона, чтобы сделать клетку резистентной к вирусной инфекции. Показано, что молекулы интерферона должны оказывать действие на клетку в течение минимум четырех часов, для того, чтобы в клетке начались процессы борьбы с вирусом, таким образом, многие специалисты не считают эффективным интраназальное применение интерферона для профилактики острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ). Тем не менее, последние исследования показывают, что интерферон, примененный на слизистую оболочку, может действовать в качестве иммунологического адьюванта против вируса гриппа, усиливая специфический ответ иммунной системы. В США проводятся клинические испытания вакцины против гриппа, которая использует интерферон в качестве адьюванта.

Интерферон вызывает и целый ряд других биологических эффектов, в том числе подавляет размножение клеток. Недавние исследования показали, что в определённых условиях он может препятствовать развитию злокачественных новообразований. Установлено также, что интерферон действует на иммунную систему и вызывает изменение клеточных мембран. Таким образом, интерфероновая система, вероятно, может играть важную роль в защите организма от вирусов.

Альфа-интерферон (ИНФ- α) и бета-интерферон (ИНФ- β) являются мощными факторами противовирусного, а также противоопухолевого иммунитета. Они блокируют репликацию вирусов в клетках. Эти белки вырабатываются клетками, инфицированными вирусом, а также после стимуляции клеток лекарствами-

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

интерфероногенами или вакцинами. Интерфероны видоспецифичны: человеческие не влияют на инфекции животных и наоборот. При стимуляции лейкоцитов вирусными и другими антигенами они выделяются в значительном количестве. Интерфероны-препараты применяют для лечения гепатитов, опухолей и других заболеваний.

Интерфероны не блокируют проникновение вируса в клетку и их противовирусный эффект является опосредованным через изменение клеточного метаболизма. Они связываются со специфическими рецепторами на мембранах инфицированных клеток и запускают синтез противовирусных белков и ферментов. Один из них, протеинкиназа, фосфорилирует рибосомальные белки, что приводит к блокаде трансляции вирусной РНК на рибосомах клетки. Продукт другого фермента, олигоденилатсинтазы, активирует внутриклеточную латентную нуклеазу, которая расщепляет вирусную нуклеиновую кислоту.

Интерферон-гамма (ИНФ- γ) значительно отличается от двух предыдущих. В целом он проявляет свойства типичного интерлейкина. Этот цитокин продуцируется преимущественно Т-хелперами 1 типа, активирует различные клеточные популяции, особенно макрофаги, естественные киллеры, стимулирует превращение Тх0 в Тх1, тем самым усиливая воспалительный компонент иммунного ответа.

Гамма-интерферон усиливает синтез HLA-антигенов клетками, что приводит к ускорению процессов распознавания и переработки антигенов, адгезию лейкоцитов и моноцитов, фагоцитоз, усиливает экспрессию Fc-рецепторов на моноцитах/макрофагах и отсюда связывание ими антител.

10.3 Синтез интерферонов человека в генетически сконструированных клетках микроорганизмов

Для получения лейкоцитарного ИНФ- α используют шестидневные однослойные культуры клеток куриного эмбриона или культивируемые лейкоциты крови человека, зараженные определенным видом вируса. Иными словами, для получения ИНФ создают определенную систему вирус-клетка. Основными недостатками этого способа получения ИНФ являются низкий выход продукта; невозможность масштабирования процесса; вероятность контаминации конечного продукта вирусами человека, такими как вирус гепатита В и С, ВИЧ; наличие в конечном ЛС примесей окисленного белка и димеров.

Глава 10. ПОЛУЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ЦИТОКИНОВ (ИНТЕРФЕРОНЫ)

Фибробластный интерферон получают от культур диплоидных эукариотических клеток, поскольку они способны осуществлять процесс гликозилирования белка. Максимальный выход интерферона наблюдается при использовании синтетической двуничей РНК. Человеческий лимфобластоидный интерферон (смесь ИНФ- α и ИНФ- β) получен из лимфоидных клеток инфильтрата плевры больных лимфомой Беркита. Для индуцирования синтеза такого интерферона также используется вирус Сендай. Иммунный интерферон (ИНФ- γ) синтезируют В- и Т-лимфоциты. Его получают от кратковременных культур Т- и В-лимфоцитов. Выход этого интерферона ниже, чем альфа- и бета-интерферона.

В настоящее время более перспективным признан способ получения ИНФ микробиологическим синтезом, который обеспечивает возможность получения целевого продукта со значительно более высоким выходом из сравнительно недорогого исходного сырья. Используемые при этом подходы позволяют создать оптимальные для бактериальной экспрессии варианты структурного гена, а также регуляторных элементов, контролирующих его экспрессию. Из клетки человека изолирован ген, ответственный за биосинтез ИНФ, который используют при создании трансгенных микроорганизмов.

В качестве исходных микроорганизмов используют штаммы *Pichia pastoris*, *Pseudomonas putida* и *Escherichia coli*. Недостатком штамма *P. pastoris* является низкий уровень выхода целевого продукта на грамм биомассы, а штамм *P. putida* – сложность выделения конечного продукта. Наиболее продуктивным является использование штаммов *Escherichia coli*.

В качестве продуцента чаще всего используют штамм *E. coli* SS5, полученный с помощью рекомбинантной плазмиды pSS5. Экспрессия ИНФ штаммом *E. coli* SS5, содержащим эту плазмиду, контролируется тремя промоторами: Plac, Pt7 и P_{trp}. Уровень экспрессии ИНФ составляет около 800 мг на 1 л клеточной суспензии.

Рассмотрим более подробно технологический процесс получения человеческого рекомбинантного ИНФ- α .

На первом этапе проводят создание рекомбинантного штамма *E. coli*:

- 1) индукция синтеза ИНФ в культуре клеток (лейкоциты человека) и выделение мРНК;
- 2) получение кДНК, комплементарной мРНК, которая кодирует информацию об ИНФ;
- 3) встраивание кДНК в плазмиду pSS5;

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

- 4) введение реконструированной плазмиды в *E. coli*;
- 5) идентификация рекомбинантных бактерий.

Полученный штамм *E. coli* используют в процессе ферментации. В ферментер загружают питательную среду и засевают трансгенную культуру *E. coli*. Ферментация осуществляется в L-бульоне или среде M9 (содержит NaCl, фосфаты, глюкозу, CaCl₂, MgSO₄) при 30°C, pH составляет 6,8–7,0. Культуральную жидкость и биомассу отделяют центрифугированием. Далее биомассу замораживают до температуры не выше минус 70°C с последующим размораживанием. Клетки обрабатывают 1–2 % раствором лизоцима для разрушения клеточных стенок. В лизат добавляют ДНК-азу для удаления ДНК и РНК при комнатной температуре в течение 1 часа. Нерастворимую форму ИНФ очищают отмывкой буферным раствором с детергентами (полиэтиленамин). Осадок ИНФ отделяют центрифугированием и растворяют в 6М растворе гуанидина гидрохлорида. Проводят высаливание ИНФ из супернатата добавлением (NH₄)₂SO₄. Очистку от (NH₄)₂SO₄ проводят при помощи диализа. Далее следует ренатурация белка в буферном растворе с детергентами (Твин-20, Тритон X-100, Тритон X-114, полигистидин) и его одностадийная очистка при помощи ионообменной хроматографии (на смолах типа Ватман СМ-52, целлюлоза).

Недостатком данного способа является низкая технологичность процесса очистки и нестабильность штамма при работе в производственных условиях. На сегодняшний день наиболее эффективной является очистка интерферонов при помощи аффинной хроматографии (следует за этапом ренатурации белка). Вместе с тем, этот способ очистки является дорогостоящим.

10.4 Контроль качества лекарственных средств на основе цитокинов (интерферонов)

Интерферон человека рекомбинантный альфа-2b (субстанция) представляет собой прозрачную бесцветную жидкость, возможна слабая опалесценция. Субстанцию интерферона стандартизируют по следующим показателям: описание, подлинность, чистота (технологические и связанные с веществом примеси), определение специфической активности, токсичность, бактериальные эндотоксины.

Глава 10. ПОЛУЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ЦИТОКИНОВ (ИНТЕРФЕРОНЫ)

Определение специфической активности

Противовирусная активность. Должна составлять от 2×10^7 до 2×10^8 МЕ/мл. Определение осуществляют в первичной культуре клеток кожно-мышечной ткани эмбрионов человека, в перевиваемой культуре клеток почек быка (МДВК) или другой перевиваемой культуре клеток, высокочувствительных к интерферону альфа-типа, в сравнении со 2-м международным стандартом ВОЗ рекомбинантного человеческого интерферона альфа 2b (95/566) или другого аналогичного стандарта.

Клетки выращивают в виде монослоя в стеклянных матрацах вместимостью 0,5 л. Для культивирования клеток используют питательную среду 199 или RPMI 1640 с 10 % телячьей сыворотки (среда № 1), 100 ед/мл пенициллина и 10 ед/мл гентамицина.

Тестирование выполняют в 96-луночных плоскодонных пластиковых планшетах. Для засева используют 3–4 суточную культуру с вполне сформированным клеточным монослоем. Клетки суспендируют в 10 мл среды 199 или RPMI 1640 с 5 % телячьей сыворотки. Отбирают пробу для подсчета количества клеток в 1 мл среды в камере Горяева. Суспензию клеток разводят средой таким образом, чтобы в 1 мл содержалось около 5×10^5 клеток.

Образцы исследуемой субстанции разводят в 5 % телячьей сыворотке. Сначала готовят десятикратные разведения до концентрации 10^{-3} , а затем непосредственно в лунках планшета в объеме 0,1 мл делают двукратные разведения до разведения, близкого к предполагаемому титру активности. Параллельно разводят рабочий стандартный образец (СО), активность которого выражена в международных единицах активности. На каждое разведение используют не менее четырех лунок. Четыре лунки оставляют для контроля клеток, шестнадцать – для контроля дозы индикаторного вируса.

Затем к каждой из 96 лунок вносят по 0,1 мл клеточной суспензии в концентрации $(5 \pm 1) \times 10^5$ клеток в 1 мл среды. Планшеты с опытными и контрольными культурами инкубируют на протяжении 24 часов при температуре $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ в атмосфере $(5 \pm 0,5) \% \text{CO}_2$ и $(70 \pm 5) \%$ влажности.

После этого среду из лунок удаляют. К каждой лунке с исследуемыми материалами вносят предварительно определенную дозу вируса везикулярного стоматита, которая соответствует 100 условным единицам активности в 0,1 мл. Одновременно осуществляют контроль взятой дозы вируса на предназначенных для этой операции шестнадцати

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

лунках с культурой. Используют по четыре лунки на каждое разведение вируса, начиная с разведения, соответствующего 0,1 условных единиц активности с коэффициентом разведения $\times 10$.

После внесения индикаторного вируса и титрования его дозы, культуру клеток инкубируют при температуре $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$, $(5,0 \pm 0,5) \% \text{CO}_2$ и $(70 \pm 5) \%$ влажности.

Учет определения активности интерферона осуществляют через 24–48 часов, когда доза внесенного вируса соответствует 100 условным единицам активности. Учет результатов проводят в случае отсутствия дегенерации в контрольной культуре. За титр интерферона принимают величину, обратную разведению препарата, при котором клеточная культура в 50 % лунок оказалась полностью защищенной от цитопатического действия вируса.

Пересчет активности интерферона (X) в МЕ выполняется по формуле:

$$X \left(\frac{\text{МЕ}}{\text{мл}} \right) = \text{титр образца} \left(\frac{\text{ЕД}}{\text{мл}} \right) \times \frac{\text{Активность СО (МЕ)}}{\text{Титр СО} \left(\frac{\text{ЕД}}{\text{мл}} \right)}$$

Специфическую безопасность проверяют на животных (тест «токсичность») и на культурах клеток, которые используются в определении противовирусной активности. Для этого односуточный монослой вносят в планшеты, добавляют ту же питательную среду, что и для определения активности, и разведения интерферона- α . Инкубируют в течение трех суток при условиях, описанных выше. Не должно быть разрушения клеток. В контроле без определяемого вещества (отрицательный контроль) также не должно быть разрушения клеток.

10.5 Применение цитокинов (интерферонов) в медицине

Разработка методов получения лейкоцитарного и рекомбинантного интерферона в препаративных количествах, а также высокоэффективных методов их очистки открыла возможность применения этих препаратов в лечении вирусных гепатитов. В настоящее время выпускаются коммерческие препараты: человеческий лейкоцитарный, лимфобластный «Велферон» (Wellferon), фибробластный (Ферон); интерферон и интерфероны, полученные генно-инженерными методами:

Глава 10. ПОЛУЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ЦИТОКИНОВ (ИНТЕРФЕРОНЫ)

рекомбинантные альфа- (Лаферобион, Роферон, Реальдирон, Виферон, Гриппферон, Генферон, и другие), бета- и гамма-интерферон (Ингарон).

В РБ зарегистрированы следующие ЛС на основе интерферонов:

Офтальмоферон (Interferon) ЗАО «Фирн М», Российская Федерация;

Интерферон человеческий лейкоцитарный (Interferon-alfa) ФГУП НПО «Микроген», Российская Федерация;

Лаферобионроферон-А (Interferon alfa-2a) «F.Hoffmann-La Roche Ltd», Швейцария;

Пегасис (Peginterferon alfa-2a) «F.Hoffmann-La Roche Ltd», Швейцария;

Альгерон (Cerepinterferon alfa-2b) ЗАО «БИОКАД», Российская Федерация;

Виферон (Interferon alfa-2b) ООО «ФЕРОН», Российская Федерация;

Генферон и Генферон лайт (Interferon alfa-2b) ЗАО «БИОКАД», Российская Федерация;

Назоферон (Interferon alfa-2b) ПАО «ФАРМАК», Украина;

Пегинтрон (Peginterferon alfa-2b) «Schering-Plough Central East AG», Швейцария;

Руферон-РН (Interferon alfa-2b) ООО «Рубикон», Республика Беларусь;

Риппферон (Interferon alfa-2b) ЗАО «Фирн М», Российская Федерация;

Силатрон (Peginterferon alfa-2b) «Schering-Plough (Brinny) Company», Ирландия;

Бетаферон (Interferon beta-1b) «Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG», Германия;

Бетфер - 1b (Interferon beta-1b) ОАО «Биофарма», Украина;

Ронбетал (Interferon beta-1b) ЗАО «Биокад», Российская Федерация.

Гамма-интерферон широко применяют для лечения инфекционных, онкологических, аутоиммунных и аллергических заболеваний. К числу наиболее известных препаратов, содержащих его в качестве активного начала, относятся препараты с рекомбинантным ИНФ-гамма-1b – Immukin («Boehringer», Германия) и Actimmune («Inter Mune Pharm.», США), а также российский Ингарон («Фармаклон», Россия).

Интерферон-бета, как и все остальные виды интерферонов, может применяться при вирусных инфекциях, однако предпочтительно

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

используется в лечении рассеянного склероза и ряда хронических заболеваний нервной системы, где на сегодняшний день дает наилучшие (в сравнении с остальными формами) результаты. Наиболее известные ЛС для борьбы с РС на основе интерферона бета-1 это Ребиф («Serono Farma Int», Италия), Авонекс («Biogen», Нидерланды); Генфаксон, («Тьютор», Аргентина).

Индукторы интерферона

Индукторы интерферона – это вещества природного или синтетического происхождения, стимулирующие в организме человека продукцию собственного интерферона, который способствует формированию защитного барьера, препятствующего инфицированию организма вирусами и бактериями, а также регулирует состояние иммунной системы и ингибирует рост злокачественных клеток. Перспективными интерферогенами являются низкомолекулярные производные акридонуксусной кислоты (карбоксиметилакридон – СМА), а также различные производные флуоренонов.

За пределами стран бывшего СССР индукторы интерферонов (в том числе в странах Западной Европы и Северной Америки) в качестве лекарственных средств не зарегистрированы, а их клиническая эффективность не доказана ни в одном из крупных международных исследований.

Глава 11

Получение и стандартизация вакцин

Вопросы для самоподготовки

1. *Определение, общие свойства и классификация вакцин.*
2. *Получение микробных и вирусных вакцин.*
3. *Стандартизация вакцин.*

11.1 Определение, общие свойства и классификация вакцин

Вакцины – это средства, приготовленные из убитых или ослабленных болезнетворных микроорганизмов или их токсинов.

Вакцины для медицинского применения – это лекарственные средства, содержащие антигенные вещества, способные индуцировать специфический и активный иммунитет у человека против возбудителя инфекции, или токсина, или антигена, вырабатываемого возбудителем.

Примерно с X века н.э. в Индии и Китае практиковалось прививание здоровых людей жидкостью из пузырьков больных легкой формой натуральной оспы (инокуляция). В 1700 году в Лондоне были представлены отчеты сотрудников Ост-Индийской компании об успешной практике прививок против оспы в Китае. В XVIII веке в было отмечено, что люди, перенесшие менее вирулентную коровью оспу, оказываются невосприимчивы к натуральной оспе. В то время в Российской империи от натуральной оспы умирал каждый седьмой ребенок. Первые прививки (вариоляции) в России сделал специально приглашенный из Англии врач Томас Димсдейл. При этом Екатерина Великая решила подать подданным личный пример: в октябре 1768 года прививку от оспы сделали самой императрице. Материал для прививки был взят у крестьянского мальчика Александра Маркова, за что ему впоследствии было пожаловано

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

потомственное дворянство. Среди первых привитых оказались также Великий князь Павел Петрович и Великая княгиня Мария Федоровна. Через несколько лет так же были привиты и внуки Екатерины – Александр и Константин Павловичи. В 1798 году английский врач *Эдвард Дженнер* опубликовал статью о методе вакцинирования «рука-рука» для распространения вакцины, а также использовал термин «вакцинация». Примерно через 100 лет *Луи Пастер* разработал вакцины от куриной холеры и сибирской язвы на основе применение ослабленных микроорганизмов для формирования иммунитета против вирулентных штаммов.

Введение вакцин вызывает иммунную реакцию (выработку специфических антител), за которой следует приобретение устойчивости организма человека или животного к патогенным микроорганизмам.

В состав вакцин входит действующий компонент, представляющий специфические антигены (АГ); консервант, который определяет стабильность вакцины при ее хранении; стабилизатор, который продлевает срок годности вакцины; полимерный носитель, который повышает иммуногенность (свойство вызывать иммунный ответ) антигенов. В роли антигена можно использовать живые ослабленные микроорганизмы; неживые, убитые микробные клетки или вирусные частицы; антигенные структуры, извлеченные из микроорганизма; продукты жизнедеятельности микроорганизмов (токсины).

Классификация вакцин

Вакцины классифицируются на четыре поколения.

1 поколение (корпускулярные): живые, убитые (инактивированные). Корпускулярные вакцины содержат ослабленные или убитые компоненты вириона или сам вирион. Для умерщвления используют термический метод или фенол, формалин, ацетон.

2 поколение (молекулярные): химические, анатоксины. Химические вакцины содержат антигенные структуры из клеток микроорганизмов. Вирусный лизат, используемый для получения таких вакцин, получают обычно с использованием детергента, для очистки используют ультрафильтрацию, центрифугирование в градиенте концентрации сахарозы, гель-фильтрацию, ионообменную и аффинную хроматографию.

Глава 11. ПОЛУЧЕНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ВАКЦИН

Анатоксины. Иммунитет формируется в ответ на введение инактивированных токсинов – продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

3 поколение (генно-инженерные): рекомбинантные векторные. Рекомбинантные векторные вакцины. Генетический материал микроорганизмов встраивается в клетки дрожжей, продуцирующие антиген. После культивирования из дрожжей выделяют нужный антиген, очищают и готовят вакцину. Примером может служить вакцина против гепатита В, вируса папилломы человека (рисунок 11.1).

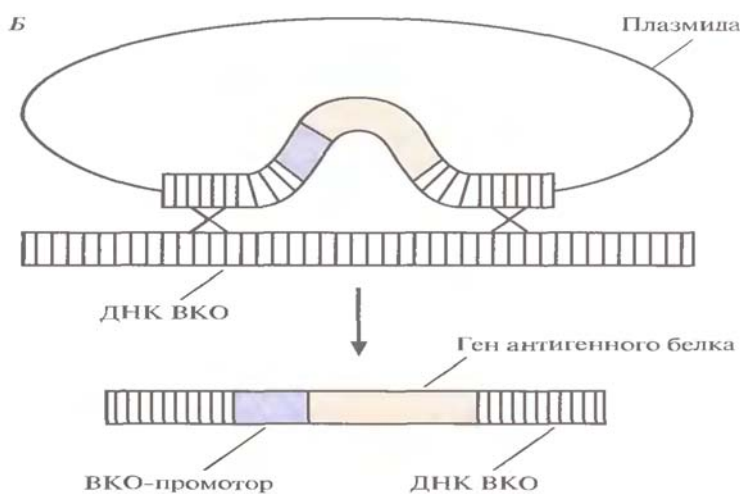


Рисунок 11.1 – Схема переноса генетического материала при помощи векторной плазмиды

4 поколение: пептидные синтетические, субъединичные вакцины, молекулярные вакцины. Субъединичные вакцины – вакцины, содержащие лишь отдельные компоненты патогенного микроорганизма. Для их разработки используется технология рекомбинантных ДНК. Было показано, что для выработки в организме-хозяине антител (АТ) в ответ на вирусную инфекцию достаточно очищенных поверхностных белков вируса (белков капсида или внешней оболочки (рисунок 11.2)).

К достоинствам относится стабильность, безопасность, отсутствие дополнительных белков и нуклеиновых кислот. Недостатки: высокая стоимость очистки специфического белка, изменение конформации и АГ свойств выделенного белка.

Молекулярные вакцины. Из микробной массы выделяют специфические АГ детерминанты или экзотоксины. Их очищают, концентрируют. Затем токсины обезвреживают и получают анатоксины. Специфический АГ может быть также получен путем химического или биохимического синтеза.

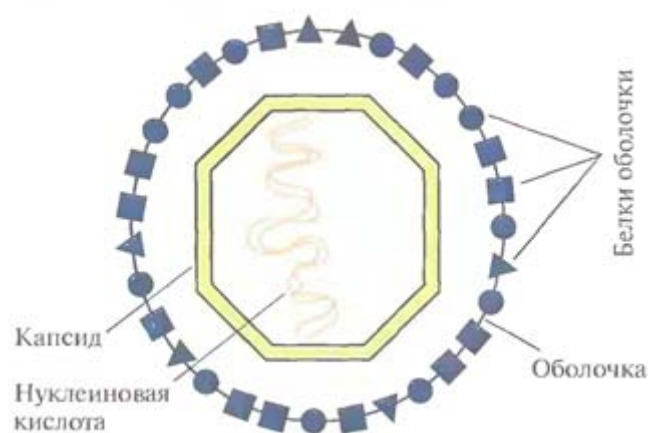


Рисунок 11.2 – Схема строения вируса

Пептидные вакцины. Небольшой участок белковой молекулы (домен) может служить эффективной субъединичной вакциной и индуцировать выработку АТ. В таком случае короткие пептиды, имитирующие эпитопы (АГ детерминанты), можно использовать для создания вакцин (рисунок 11.3). Последовательность аминокислот синтезируют химическим путем. Ограничения на использование пептидных вакцин: эпитоп должен быть непрерывным, с неизменённой конформацией, обладать достаточной иммуногенностью.

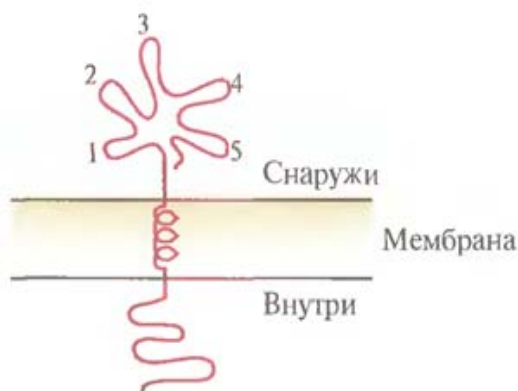


Рисунок 11.3 – Структура белкового антигена (1-5 – АГ детерминанты)

Генная иммунизация – новый подход, основанный на включении в клетки животного гена, кодирующего белок-АГ. Позволяет индуцировать иммунный ответ без введения АГ. Клонированный ген, кодирующий белок-АГ, включают в плазмиду. Раствор с плазмидами вводят животным

Глава 11. ПОЛУЧЕНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ВАКЦИН

внутримышечно. В организме животного происходит транскрипция белка-АГ, и дальнейшая индукция синтеза АТ к нему.

Комбинированные вакцины. Они комбинируются из отдельных вакцин, превращаясь при этом в поливакцины, которые способны иммунизировать сразу от нескольких инфекций. В качестве примера можно назвать поливакцину АКДС, содержащую дифтерийный и столбнячный анатоксины и коклюшные корпускулярные антигены.

По способу введения вакцины классифицируются на инъекционные жидкие, пероральные (таблетки, капсулы, драже) и ингаляционные (аэрозоли) вакцины.

Для повышения иммуногенности вакцин можно использовать следующие приемы:

- очистка вакцин от низкомолекулярных веществ, способных вызывать супрессию иммунного ответа;
- агрегация АГ с помощью ковалентного связывания и других способов комплексообразования;
- включение в вакцину максимального количества эпитопов АГ;
- сорбция на веществах, создающих депо АГ (гидроокись алюминия, вещества микробного или растительного происхождения).

11.2 Получение микробных и вирусных вакцин

Получение и стандартизация вакцин происходит в следующей очередности:

1. Получение и характеристика исходного штамма.
2. Получение биомассы (выбор способа культивирования микроорганизмов, вируса).
3. Выделение антигенной структуры (осаждение, высаливание, сорбция, элюирование, ультрафильтрация и др.).
4. Его инаktivация (формалин, фенол, перекись водорода, нагревание и др.), очистка, стерилизация (термическая, облучение, фильтрация).
5. Розлив.
6. Стандартизация.
7. Упаковка.

Живые вакцины – взвесь аттенуированных микроорганизмов, выращенных на различных питательных субстратах.

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

Изготавливают из ослабленных и авирулентных штаммов. Вакцинный штамм размножается в организме привитого и вызывает вакциниальный инфекционный процесс. Например, вакцина для профилактики краснухи, кори, полиомиелита, туберкулеза и паротита.

Живые бактериальные вакцины выращиваются на жидкой питательной среде в ферментере. Живые вирусные вакцины получают путем культивирования штамма в курином эмбрионе (вакцина против гриппа, бешенства, клещевого энцефалита) или в культурах животных клеток: первичные культуры клеток (живая полиомиелитная вакцина) и перевиваемые культуры клеток (VERO-инактивированная полиомиелитная вакцина). Живые вакцины представляют собой лиофилизаты, хранящиеся при 2–8°C без консервантов в герметичных стеклянных ампулах. Необходимо строгое соблюдение условий асептики.

Убитые (инактивированные) вакцины можно получить из целых микробных клеток, которые инактивируют температурой, ультрафиолетовым облучением, формалином, спиртом. Необходим строгий контроль инактивации. Обладают более низкой эффективностью в сравнении с живыми вакцинами. Необходима очистка вакцины от клеточных элементов, чужеродной ДНК и нежелательных АГ.

Недостатки корпускулярных (живых и инактивированных) вакцин. Не все патогенные микроорганизмы можно вырастить в количествах, необходимых для производства. Строгое соблюдение мер предосторожности по избеганию инфицирования персонала. Инактивация может быть неполной. Атенуированные штаммы могут ревертировать и становиться вирулентными.

Рекомбинантные вакцины. Для получения рекомбинантной вакцины клонируют гены, обеспечивающие синтез необходимых антигенов. Затем вводят гены в вектор (плазмида, вирус) и далее вводят вектор в клетки-продуценты (вирусы, бактерии, грибы, клетки животных). Далее осуществляют культивирование клеток *in vitro*, отделяют и очищают антиген.

Рассмотрим процесс получения микробных вакцин на примере **дифтерийной вакцины**. Дифтерийный токсин состоит из двух субъединиц: А (24 кДа, 193 аминокислоты, 6 пептидов) и В (38 кДа, 414 аминокислот, 4 пептида) и вырабатывается промышленным штаммом *Corynebacterium diphtheriae* PW-8 (Парк-Вильямс 8). После нагревания в течение 30 мин при 60°C теряет свою токсичность.

Глава 11. ПОЛУЧЕНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ВАКЦИН

Для получения дифтерийного токсина используют среду Lingood. Состав: триптически гидролизованная говяжья ткань и свиная поджелудочная железа (параметры гидролиза: рН 8,0–8,2; температура 48–50°C; гидролиз останавливают добавлением ледяной уксусной кислоты и кипячением смеси), содержание аминного азота в гидролизате составляет 120–130 мг/л. К полученному гидролизату добавляют пекарские дрожжи для сбраживания сахаров при 80°C в течение одного часа. Затем добавляют натрия лактат и мальтозу. Стерилизуют среду при 112°C в течение 30 мин.

Аэрирование (воздух подают со скоростью 6–10 л/мин) и перемешивают (1200–1400 обор/мин), для ускорения образования токсина. Ферментацию проводят при 34–36°C в течение 36–50 ч.

После процесса культивирования сепарацию проводят путем центрифугирования на суперцентрифугах при 15000 обор/мин. Токсин накапливается в культуральной жидкости.

К профильтрованной путем ультрафильтрации культуральной жидкости при медленном перемешивании (60–80 обор/мин) прибавляют 40% формальдегид и инкубируют при 39–40°C 5 суток. За это время происходит детоксикация токсина, связанная с образованием метиламинных групп (обратимая стадия), которые, взаимодействуя с индольными, амидными, фенольными радикалами аминокислот, формируют стабильные метиленовые мостики (необратимая стадия). Затем охлаждают до 2–8°C.

Очистку проводят путем добавления натрия гексаметафосфата (соль Грехема) при постоянном перемешивании. Добавляют трихлоруксусную кислоту до изоэлектрического значения рН 3,8–4,0. Инкубируют 40–60 мин при температуре 4–10°C. Осадок отделяют на суперцентрифугах при 12000 обор/мин. Растворят в боратно-буферном растворе при рН 7,8–7,9. Очистку от пигментов проводят на активированном угле.

Технология получения вирусной вакцины против гепатита В

Куриные эмбрионы заражают в аллантоисную жидкость вирусом осповакцины, экспрессирующей поверхностный антиген HBsAg. Выдерживают эмбрионы при 37°C в течение 72 ч. Затем охлаждают при 4–5°C в течение 18 ч. Затем их вскрывают и в асептических условиях собирают аллантоисную жидкость. Методом иммуноферментного анализа определяют содержание в ней антигена HBsAg, которого должно быть не менее 300 нг/мл. Аллантоисную жидкость пропускают через мембраны с размером пор 0,22 мкм. Проводят концентрирование раствора. К концентрированному раствору добавляют фосфатный буферный раствор с

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

pH 7,2 с натрия хлоридом и проводят диафильтрацию (ультрафильтрация с разделением хорошо и плохо задерживаемых мембраной компонентов). Проводят контроль на отсутствие вируса. Очистку проводят иммуноафинной хроматографией на сефарозе 4В, на которой адсорбированы анти-Нbsантитела сыворотки крови козы. Десорбцию с колонки проводят фосфатно-цитратным буфером с pH 2,2.

11.3 Стандартизация вакцин

При стандартизации вакцин учитываются такие показатели, как: описание, подлинность, растворимость, прозрачность, цветность, механические включения, pH, содержание белка, стерильность, токсичность, специфическая активность, специфическая безопасность, антигенная активность, пирогенность, упаковка, маркировка, транспортирование, хранение, срок годности, назначение.

Подлинность вакцины проверяется в реакциях идентификации микробного компонента. Путем окраски и просматривания препаратов под микроскопом.

Специфическая активность (иммуногенность) – необходимый минимальный титр микробного компонента в прививочной дозе.

В спецификации убитых вакцин должно быть указано содержание инактивирующих агентов (формалин) и консервантов. Если для получения вакцины использовалась клеточная культура (культуральная вакцина), необходим контроль содержания бычьего сывороточного альбумина (компонент питательной среды). Специфическая безопасность подразумевает контроль полноты инактивации, отсутствие остаточной вирулентности, генетическую стабильность. Специфическая активность вакцин – количество АГ в единице объема; количество живых или убитых микробных клеток, составляющих основу вакцины; уровень специфических АГ в сыворотке крови иммунизированных животных.

Специфическая безопасность вакцин. Вакцина не должна содержать живых вирулентных микроорганизмов. Проводят испытание на первичной культуре клеток почек сирийских хомячков. Используют среду 199 на растворе Хенкса с добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота. Культивируют при температуре 37°C в течение 5–6 суток. Затем среду сливают, вносят раствор Эрла и гидролизат лактальбумина, добавляют 5 % сыворотки крупного рогатого скота и гентамицина сульфат. На 7–8 сутки

Глава 11. ПОЛУЧЕНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ВАКЦИН

инкубации при 32°C берут пробу культуральной жидкости и вводят 10 мышам. При заболевании хотя бы одной мыши вакцину бракуют.

Количественное определение адсорбированной дифтерийной вакцины (ГФ РБ, статья 2.7.6)

Активность дифтерийной вакцины определяется путем назначения вакцины морским свинкам с последующей провокацией дифтерийным токсином (методы А или В) или путем определения титра антител против дифтерийного токсина или анатоксина в сыворотке крови морских свинок (метод С). В обоих случаях активность вакцины рассчитывается по сравнению со стандартным образцом, калиброванным в Международных Единицах.

Метод А. Внутривенный провокационный тест на морских свинках. Используют здоровых морских свинок из одной партии. Животных распределяют не менее чем на 6 равных групп по 5 голов в каждой. Готовят по 5 разведений раствора стандарта и исследуемого раствора с шагом не более 2,5 раза.

Иммунизация и провокация. Назначают по одному разведению одной группе морских свинок и вводят подкожно по 1,0 мл разведения каждой морской свинке в группе. Спустя 28 дней каждой свинке выбривают оба бока и вводят внутривенно по 0,2 мл каждого из 6 разведений токсина в 6 различных мест на коже животного так, чтобы минимизировать влияние соседних инъекций.

Все места инъекций обследуют через 48 часов и записывают наличие специфической дифтерийной эритемы (покраснение). Записывают также число мест инъекций без реакции (внутривенный провокационный индекс). Сравнивают индекс исследуемого и стандартного растворов.

Метод В. Летальный провокационный тест на морских свинках. Используют здоровых морских свинок из одной партии весом 250-350 г. Животных одного пола распределяют в 6 равных групп.

Назначают по одному разведению одной группе морских свинок и вводят подкожно по 1 мл разведения каждой морской свинке в группе. Спустя 28 дней каждой свинке вводят подкожно по 1 мл раствора токсина. Считают число выживших животных спустя 4 дня после инъекции токсина. Рассчитывают активность испытуемой вакцины по отношению к активности стандартного образца на основании пропорции выживших животных в каждой группе вакцинированных морских свинок.

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

Метод С. Определение антител у морских свинок. Готовят не менее трех разведений с 2,5–5-кратным шагом. Каждой свинке вводят подкожно 1,0 мл разведения, предназначенного для данной группы животных. Через 35–42 дня после иммунизации подходящим методом берут образцы крови у каждого вакцинированного и контрольного животного. Подходящим иммунохимическим методом определяют содержание антител.

Определение титра антител

Приведенные ниже твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА ELISA)) и *Vero-Тест* являются примером иммунохимических методов, признанных подходящими для определения титра антител.

Определение титра антител в сыворотке морской свинки с помощью тИФА. Лунки используют для исследуемых сывороток, отрицательного и положительного контролей. Покрывают лунки планшета для ТИФА 100 мкл раствора дифтерийного анатоксина. Планшет оставляют на ночь при температуре 4°C во влажной камере. На следующий день пластины тщательно отмывают промывочным буферным раствором.

Готовят подходящие разведения отрицательной и положительной контрольных сывороток и испытуемых сывороток. Инкубируют при температуре 37°C в течение 2 ч. Отмывают промывочным буферным раствором. Готовят подходящее разведение конъюгата пероксидазы в блокирующем буферном растворе и прибавляют по 100 мкл в каждую лунку. Инкубируют при температуре 37°C во влажной камере в течение 1 ч. Отмывают планшет промывочным буферным раствором. Прибавляют по 100 мкл субстратного раствора в каждую лунку. Инкубируют при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин. Учитывают реакцию при длине волны 405 нм.

Определение титра антител в сыворотке морской свинки с помощью Vero-теста. Метод основан на регистрации угнетения метаболизма (1) или цитотоксичности (2) в качестве конечного эффекта. Регистрация может быть выполнена путем микроскопии клеток (определение клеточной морфологии) или макроскопически (по изменению цвета). Конечная точка метода может быть определена как максимальное разведение сыворотки, которое защищает клетки от дифтерийного токсина. Активность антитоксина рассчитывается по сравнению с референтной сывороткой морской свинки или стандартным образцом ВОЗ и выражается в МЕ/мл.

Метод 1. Дифтерийный токсин оказывает цитопатическое действие (ЦПД) на клетки Vero (клетки почки африканской зеленой мартышки) и их

Глава 11. ПОЛУЧЕНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ВАКЦИН

лизис. Антитела против токсина могут нейтрализовать указанное ЦПД. Следовательно, активность дифтерийной вакцины можно определить с помощью описанной культуральной клеточной системы, если добавлять в культуру различные разведения сыворотки от иммунизированных животных и фиксированное количество токсина. При проведении Vero-теста желтый цвет среды указывает, что клетки живые; красный – что клетки погибли. В случае гибели части клеток цвет среды может быть оранжевым.

Метод 2. Тиазолил синий МТТ восстанавливается в сине-черный формазан митохондриальными дегидрогеназами живых клеток и, следовательно, может быть использован для количественной оценки присутствия живых клеток, указывая на степень нейтрализации токсина антитоксином. Белые или бесцветные лунки указывают на отсутствие живых клеток вследствие недостаточной нейтрализации токсина.

Количественное определение вакцины гепатита В (рДНК) (ГФ РБ, статья 2.7.15)

Количественное определение вакцины гепатита В (рДНК) производят либо *in vivo*, путем сравнения ее способности приводить в данных условиях к образованию специфических антител против поверхностного антигена гепатита В (HbsAg) у мышей или морских свинок с такой же способностью стандартного образца, либо *in vitro*, путем иммунохимического определения содержания антигена.

Определение in vivo. В испытании используют здоровых мышей из одной партии возрастом около 5 недель. Также могут использоваться здоровые морские свинки из одной партии с массой тела от 300 до 350 г и возрастом около 7 недель. Используют животных одной пола. Животных делят не менее чем на семь равных групп.

Готовят не менее трех разведений вакцины и стандартного образца. Каждое из полученных разведений назначают одной из групп животных, каждому из которых вводят внутрибрюшинно не более 1,0 мл данного разведения. Одну группу животных не вакцинируют, а вводят внутрибрюшинно такой же объем растворителя. Через подходящий промежуток времени (например, от 4 до 6 недель) всех животных анестезируют и производят забор крови. Выполняют количественное определение специфических антител против HbsAg в индивидуальных сыворотках, используя подходящий иммунохимический метод.

Определение in vitro. Выполняют иммунохимическое определение содержания антигена. Показано, что методы твердофазного

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

иммуноферментного анализа (тИФА, ELISA) и радиоиммунологического анализа (РИА) с использованием моноклональных антител, специфичных к индуцирующим защитную реакцию эпитопам HBsAg, являются подходящими. Используют соответствующее число разведений испытуемой вакцины и стандартного средства.

Иммунохимические методы

Иммунохимические методы основаны на селективном обратимом нековалентном связывании антигенов антителами. Эти методы используются для обнаружения и количественного определения как антигенов, так и антител. Факт образования комплекса антигена с антителом и количество этого комплекса могут быть определены различными путями. Могут использоваться методы с мечеными или немечеными реагентами.

В методах с использованием *меченых веществ* могут применяться подходящие метки, например, ферменты, флуорофоры, люминофоры и радиоизотопы.

В настоящее время разработаны различные варианты твердофазного иммуноферментного анализа:

1. «Сэндвич»-метод. На твердой фазе адсорбированы антитела к исследуемому антигену. После инкубации исследуемого материала и образования комплекса «антитело – антиген» проводится удаление несвязавшихся компонентов, добавляется конъюгат, т.е. антитела к искомому антигену, меченые ферментом. По завершении инкубации, с последующим удалением непрореагировавшего конъюгата промывкой, образуется комплекс, в котором антиген как бы заключен между двумя слоями антител. Наличие меченных ферментом антител определяется при помощи соответствующего субстрата (рисунок 11.4). «Сэндвич»-метод используется для выявления HBsAg, HBeAg, антигена вируса гепатита А.

В качестве ферментов-меток наиболее часто выступают пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, β -D-галактозидаза.

В качестве субстрата могут быть о-фенилендиамин, тетраметилбензидин.

В ИФА наибольшее распространение получил *фотометрический метод* регистрации активности ферментов. В качестве субстратов ферментов при этом используют такие вещества, продукты превращения которых являются окрашенными соединениями или, наоборот, окраска самих субстратов изменяется в процессе реакции. Окрашенные соединения

Глава 11. ПОЛУЧЕНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ВАКЦИН

поглощают видимый свет, т.е. электромагнитное излучение с длинами волн 400–700 нм.

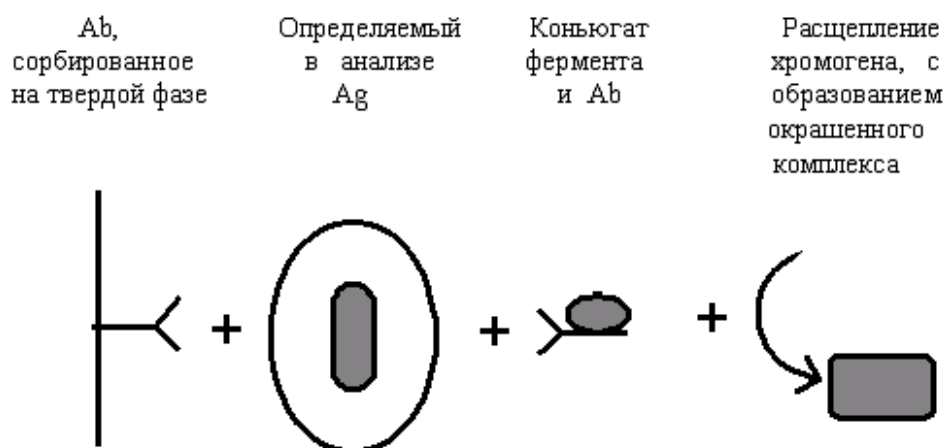


Рисунок 11.4 – Определение антигенов «сэндвич»-методом

2. *Непрямой ИФА.* На твердой фазе иммобилизуют антиген, после инкубации исследуемого материала и удаления несвязавшихся компонентов добавляют меченые ферментом антитела к иммуноглобулинам человека класса IgG, которые взаимодействуют с Fc-фрагментом к IgG. После проведения субстрат-ферментативной реакции проводят учет полученных результатов. При наличии антител уровень оптической плотности прошедшей реакции превосходит показатели отрицательных образцов (рисунок 11.5). Этот метод применяется для определения антител к вирусу гепатита С.

3. *Конкурентный метод.* К антигену, иммобилизованному на твердой фазе, одновременно добавляют исследуемый материал и конъюгат. При проведении реакции меченые и исследуемые антитела конкурируют за активные центры антигена, иммобилизованного на твердой фазе. После завершения инкубации и удаления не прореагировавших компонентов проводится ферментативная реакция, результаты которой обратно пропорциональны количеству антител в исследуемом образце.

4. *Ингибирующий ИФА.* На полистироловом шарике адсорбирован стандартный АГ, после инкубации с исследуемым материалом и удаления непрореагировавших компонентов добавляется АГ, меченный ферментом, который взаимодействует со свободными центрами связывания антител, прореагировавшими с антигеном, сорбированным на твердой фазе. При наличии антител в исследуемой пробе уровень оптической плотности

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

прошедшей реакции превосходит показатели отрицательных контрольных образцов.

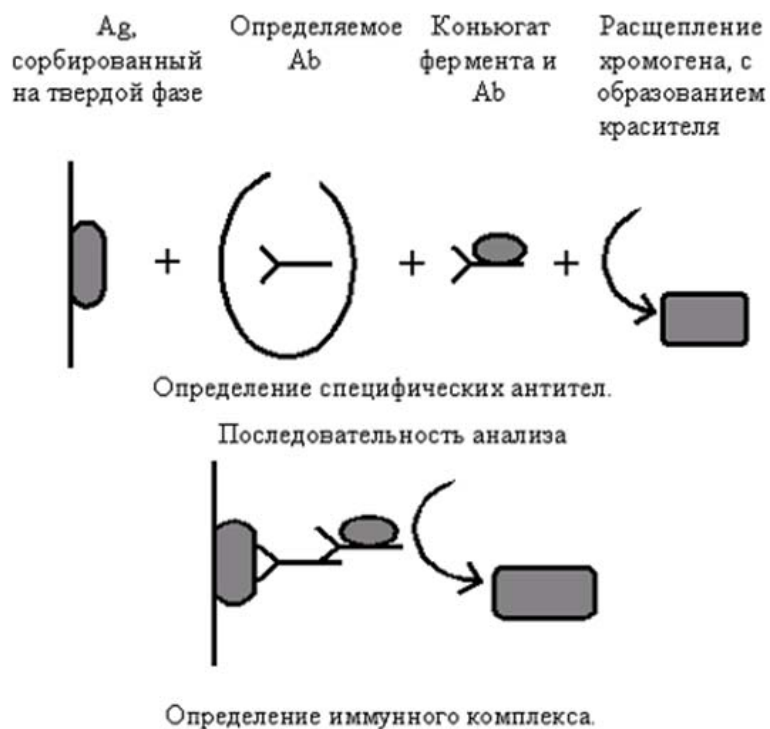


Рисунок 11.5 – Определение антигенов методом непрямого ИФА

5. *Прямой ИФА.* На первом этапе реакции исследуемый образец фиксируют на твердой фазе. Затем к нему добавляют конъюгат. После удаления непрореагировавших компонентов реакции проводится ферментативная реакция, интенсивность которой прямо пропорциональна содержанию исследуемых антигенов в образце и вообще говорит об их наличии в исследуемом материале.

Глава 12

Технология получения сывороток и препаратов моноклональных антител

Вопросы для самоподготовки

1. Структура и определение антитела.
2. Получение и стандартизация сывороток.
3. Получение и стандартизация моноклональных антител.
4. Применение моноклональных антител.

12.1 Структура и определение антитела

Антитела – белки сыворотки крови, которые синтезируются *B-лимфоцитами* как проявление защитной реакции иммунитета при попадании в организм чужеродного вещества – *антигена*. Антитела – это белковые молекулы, представляющие собой иммуноглобулины. Существует несколько классов иммуноглобулинов: М (первичный иммунный ответ против бактерий), G (вторичный иммунный ответ против бактерий), E (участвует в развитии аллергии), A (обеспечивает местный иммунитет).

Антитела образуются не против всей молекулы белка или бактериальной клетки, а только к небольшим участкам на их поверхности, которые получили название *антигенных детерминант*. Антигенные детерминанты (*эпитопы*) – выпуклые части молекулы АГ, которые могут входить внутрь активного центра АГ.

В структуре АГ присутствуют два *Fab-фрагмента*, которые связывают антигены. *H- (тяжелые) и L- (легкие) цепи* АГ состоят из переменных (VH, VL) и константных (CH1, CH2, CH3) доменов. Переменные домены содержат CDR-участки, определяющие комплементарность АГ к АГ. Fv – N-концевая часть Fab-фрагмента,

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

обладающая АГ-связывающей активностью. Fc-фрагмент обуславливает добавочные функции антител, т.е. несвязанные с взаимодействием с антигенами (например, связывание комплемента, взаимодействие с макрофагами). Цепи связаны между собой водородными связями и дисульфидными мостиками. N-концы образуют домены, которые являются ответственными за активность АГ (рисунок 12.1).

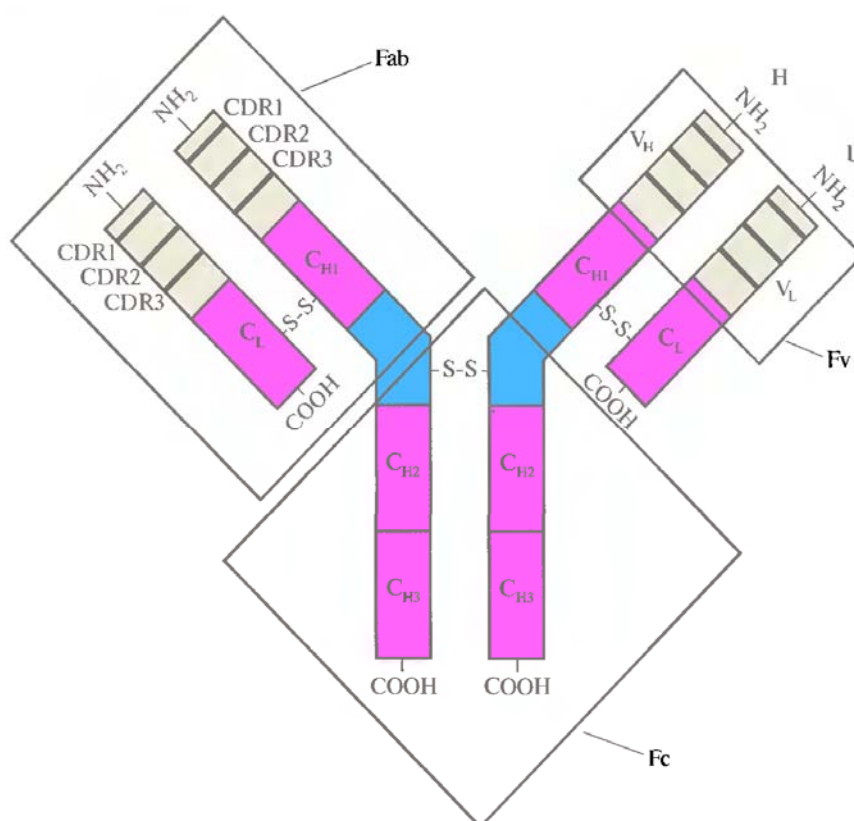


Рисунок 12.1 – Структура молекулы антитела

Сыворотки – средства для образования пассивного иммунитета, которые содержат поликлональные антитела против инфекционных агентов и микробных токсинов.

Иммунные сыворотки животного происхождения для медицинского применения – это жидкие или лиофилизированные лекарственные средства, содержащие очищенные иммуноглобулины или фрагменты иммуноглобулинов, полученные из сыворотки или плазмы иммунизированных животных различных видов.

В 1890 г. немец *Эмиль А. Беринг* обнаружил, что в крови животных, зараженных дифтерией, вырабатываются молекулы (антитела), которые

Глава 12. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ СЫВОРОТОК И ПРЕПАРАТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

связывают токсины бактерий. Совместно с японцем *Ш. Китасато* выяснил, что сыворотка иммунизированных животных способна вылечивать других животных, зараженных токсином.

Основные области применения сывороток

- профилактика и лечение инфекционных заболеваний (антисыворотки против бактериальных или вирусных агентов);
- в случае отравления ядами микробов при столбняке, ботулизме, дифтерии (антитоксины против микробных токсинов);
- при укусах змей – для инактивации экзотоксинов в ядах кобры, гадюки и др. (сыворотки против ядов змей);
- для диагностических целей (создание разных диагностических наборов, например, в тестах на определение беременности).

Получают сыворотки путем иммунизации домашних животных (ослов, лошадей, крупного рогатого скота). Забор крови у этих животных производят в период максимального содержания антител, однако для этого необходимо постоянно контролировать кровь по такому показателю, как титр антител, что представляет определенные технические трудности. Из крови животных выделяют плазму, затем из нее удаляют фибрин и получают сыворотку.

Приготовленные таким способом сывороточные препараты характеризуются относительно низкой активностью и существенным количеством примесей. Сыворотки можно получать также из культивируемых на искусственной питательной среде животных клеток. Однако главной проблемой в этом случае является обеспечение стабильного роста животных клеток вследствие их генетической нестабильности, непостоянства генетической экспрессии и старения.

12.2 Получение и стандартизация сывороток

Получение сывороток с использованием рекомбинантных штаммов микроорганизмов

Одним из методов получения антител (сывороток, иммуноглобулинов) может быть использование рекомбинантных штаммов *E. coli*:

1. Индукция синтеза антител В-лимфоцитами человека или мыши, выделение мРНК, на основе которой получают кДНК.

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

2. Проводят отдельную ПЦР-амплификацию (массовое образование дополнительных копий определенных генов) кДНК, кодирующей образование L- и H-цепей.

3. Амплифицированные кДНК обрабатывают эндонуклеазами рестрикции, разные рестрикты включают в бактериофаг лямбда. При этом участки, кодирующие образование L- и H-цепей, встраиваются в разные векторы, и таким образом получают два разных вектора.

4. Затем кДНК одной L- и одной H-цепей встраивают в общий «комбинаторный» вектор, при этом в фаге образуются обе цепи и синтезируется полноценный Fv-фрагмент. При этом проводят скрининг векторов с антигенсвязывающей активностью.

5. Вырезают плазмиды, содержащие кДНК, кодирующую образование сразу двух цепей.

6. Включение кДНК в клетки бактерий *E. coli*.

7. Выделение антигенсвязывающего Fv-фрагмента из *E. coli*.

Получение гипериммунных специфических сывороток

Сыворотки гипериммунные специфические лошадиные очищенные против бактериальных и вирусных агентов, токсинов микроорганизмов и ядов змей получают следующим образом:

1. Получение антигенов для иммунизации животных-продуцентов (выращивание бактерий или вирусов, получение их токсинов или ядов змей).

2. Подготовка лошадей-продуцентов (предварительный карантин перед введением в течение 30–45 дней). Животные должны быть здоровы, в их крови не должны обнаруживаться антибиотики.

3. Введение антигенов (иммунизация) в шею или спину лошади в объеме 5–25 мл (сравнительно небольшие объемы) подкожно или внутримышечно.

4. Взятие крови у животных, получение иммунной плазмы. Взятие крови проводят венопункцией в стерильных условиях. При необходимости могут проводить стерилизующую фильтрацию проб сыворотки или плазмы крови.

5. Ферментативный гидролиз белков плазмы пепсином. Процесс проводят при pH 3,2–3,4 и температуре 20–24°C в течение одного часа, а затем дополнительно еще один час при pH 4,1–4,2 в реакторах. После чего добавляют 14,0–14,5 % раствор аммония сульфата и смесь выдерживают в течение одного часа при этой же температуре и затем при 58°C в течение

Глава 12. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ СЫВОРОТОК И ПРЕПАРАТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

45 мин. В результате гидролиза образуется двухвалентный Fab-фрагмент, часть Fc-фрагментов разрушается.

6. Отделение осадка путем фильтрования. Осадок содержит коагулированные термолабильные белки и продукты протеолиза.

7. К фильтрату (содержит специфический белок) прибавляют 22–24 % раствор аммония сульфата при pH 7,0–7,1 и проводят отстаивание (оседает белок) при комнатной температуре в течение 1,5–2 ч.

8. Осадок отфильтровывают и прессуют. Очищают хлороформом в изoeлектрической точке (pH от 5,0 до 5,6) для осаждения балластных белков и выпавшие в осадок белки отделяют сепарированием.

9. Фильтрат стерилизуют и разливают в ампулы.

10. Стандартизация сывороток.

Стандартизация сывороток

Сыворотки стандартизируют по показателям: общий белок, стерильность, пирогенность, токсичность, определение специфической активности, содержание хлороформа. Специфическую активность сывороток определяют в реакции нейтрализации соответствующего АГ. Также проверяют удельную активность средства на 0,1 г белка.

Определение *специфической антитоксической активности* (на примере лошадиной очищенной концентрированной жидкой сыворотки против яда гадюки обыкновенной)

Активность (титр) сыворотки устанавливают по ее способности нейтрализовать предварительно установленную дозу яда гадюки, равную 3 LD₅₀ (доза, вызывающая гибель 50 % мышей, взятых в опыт). За одну антитоксическую единицу (АЕ) принимают количество сыворотки, которое в смеси с 3 LD₅₀ яда защищает от гибели 50 % взятых в опыт мышей.

Дозу яда гадюки устанавливают путем предварительного разведения яда на 10–20 %. Четырем мышам вводят по 5–6 разведений внутривенно. За животными наблюдают в течение двух суток. Фиксируют летальность и рассчитывают LD₅₀ яда.

Сыворотку разводят 0,9 % стерильным раствором натрия хлорида и получают разведения, отличающиеся на 10–20 %. Берут 0,2 мл разведения сыворотки и 0,3 мл яда гадюки и вводят внутривенно 4 белым мешам. Смесь яда и сыворотки выдерживают при 37±0,5°C в течение 45±3 мин. За

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

животными наблюдают в течение 48 ± 2 ч. В качестве контроля берут три разведения яда.

Удельную активность вычисляют по формуле:

$$УА = a \times 10 / v,$$

где a – количество АЕ в 1 мл сыворотки; v – содержание белка в процентах.

12.3 Получение и стандартизация моноклональных антител

В 1955 году датчанин *Н. Эрне* сформулировал клонально-селекционную теорию, согласно которой каждый лимфоцит несет информацию для синтеза определенного АТ. Во время иммунного ответа клетки усиленно делятся и продуцируют специфические АТ (против конкретного антигена или его части). При этом, вырастив лимфоцит в питательной среде можно получить его потомство, которое будет продуцировать специфические антитела.

Для практического применения АТ в диагностике и терапии необходимо было создать такую линию клеток, которая росла бы в культуре и продуцировала АТ одного типа, обладающие высоким сродством к специфическому АГ-мишени, – моноклональные антитела.

К сожалению, В-лимфоциты, синтезирующие АТ, не могут воспроизводиться в культуре. Решение данной проблемы виделось в создании гибридной клетки. От В-лимфоцита она получила бы способность к выработке АТ, а от клетки совместимого типа – способность к делению и росту в культуре. Было известно, что В-лимфоциты иногда перерождаются и становятся раковыми (миеломными) клетками, приобретая способность к росту в культуре. Так клетки миеломы, в первую очередь те, которые не вырабатывают АТ, стали кандидатами на слияние с АТ-продуцирующими В-лимфоцитами. В середине 70-х гг. эти идеи стали реальностью благодаря работам немца *Г. Келера* и аргентинца *Ц. Мильштейна*. Эти ученые разработали **гибридную технологию получения моноклональных антител**. Гибридная клетка представляет собой результат слияния В-лимфоцита и клетки опухоли лимфоидной ткани (плазмцитомы).

Глава 12. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ СЫВОРОТОК И ПРЕПАРАТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

При этом на мышинные моноклональные тела развивается иммунный ответ. Чтобы это устранить, были разработаны способы получения моноклональных антител, содержащих фрагменты человеческих иммуноглобулинов. Моноклональные антитела по структуре могут быть *химерные* – константная часть мышинных антител замещена соответствующей константной областью иммуноглобулина человека и в своей структуре имеют более 65 % человеческого иммуноглобулина. *Гуманизированные* моноклональные антитела – до 95 % состоят из человеческого иммуноглобулина. Кроме того, существуют *полностью человеческие* моноклональные антитела.

Образование и отбор гибридных клеток

Первый шаг в процессе получения гибридной клеточной линии, продуцирующей АТ одного типа, состоит во введении мышам антигена. После ряда иммунизаций, проведенных в течение нескольких недель, проверяют, произошло ли развитие у животных иммунного ответа. Если ответ развился, то животных умерщвляют, извлекают селезенку, промывают ее, измельчают и несильно встряхивают для высвобождения единичных клеток, среди которых находятся и АТ-продуцирующие В-клетки (рисунок 12.2).

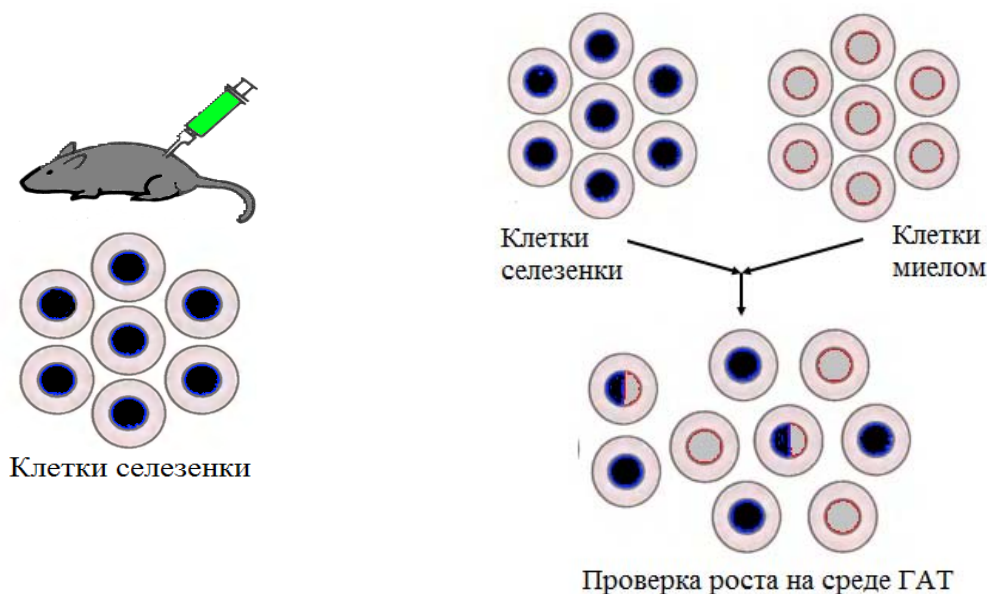


Рисунок 12.2 – Получение гибридной клеточной линии: взвесь АТ-продуцирующих клеток селезенки мыши смешивают со взвесью миеломных клеток, инкубируют для слияния, переносят в среду ГАТ, где растут только гибридные клетки

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

Обработка полиэтиленгликолем облегчает слияние клеток, тем не менее, слияние происходит редко и является в достаточной степени случайным событием. В смеси присутствуют клетки миеломы, селезенки, а также слившиеся клетки миеломы-селезенки, миеломы-миеломы, селезенки-селезенки. Однако в среде ГАТ растут только гибридные клетки миеломы-селезенки, все остальные типы клеток не могут в ней пролиферировать.

На 10–14-е сутки после слияния клеток в среде ГАТ остаются и растут только слившиеся клетки селезенки-миеломы. Их затем по одной вносят в лунки пластиковых микротитровальных плашек и выращивают на полной культуральной среде без ГАТ – первое клонирование (рисунок 12.3).

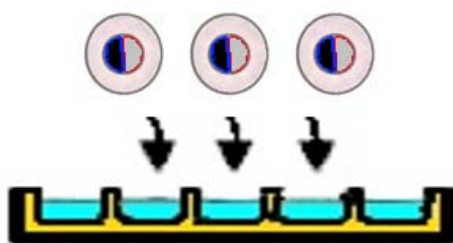


Рисунок 12.3 – Первое клонирование гибридных клеток на полной культуральной среде

Идентификация гибридных клеточных линий, секретирующих специфические антитела

Теперь необходимо идентифицировать гибридные клетки, вырабатывающие АТ к иммунизирующему АГ. Для этого обычно проводят скрининг культуральной среды в лунках, содержащих секретируемые АТ. Среду из тех лунок, в которых есть растущие клетки, отбирают и переносят в лунки другой микротитровальной плашки, предварительно покрытые слоем молекул АГ-мишени. Если в культуральной среде находится АТ (первое антитело), распознающее один из эпитопов данного АГ, то оно свяжется с АГ и останется в лунках после их промывания. Затем в лунки добавляют второе АТ, специфичное к мышинным АТ. Оно будет присоединяться к любому первому АТ, связанному с АГ. К используемому в иммунном анализе второму АТ предварительно присоединяют фермент, который превращает неокрашенный субстрат в окрашенное соединение. Изменение цвета содержимого одной из лунок говорит о том, что исходная культуральная среда содержала АТ,

Глава 12. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ СЫВОРОТОК И ПРЕПАРАТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

специфичное к данному АГ. Если же такое антитело в среде отсутствовало, то второму антителу не с чем будет связываться, и оно смывается при втором промывании. Субстрат в таких лунках останется неокрашенным (рисунок 12.4).

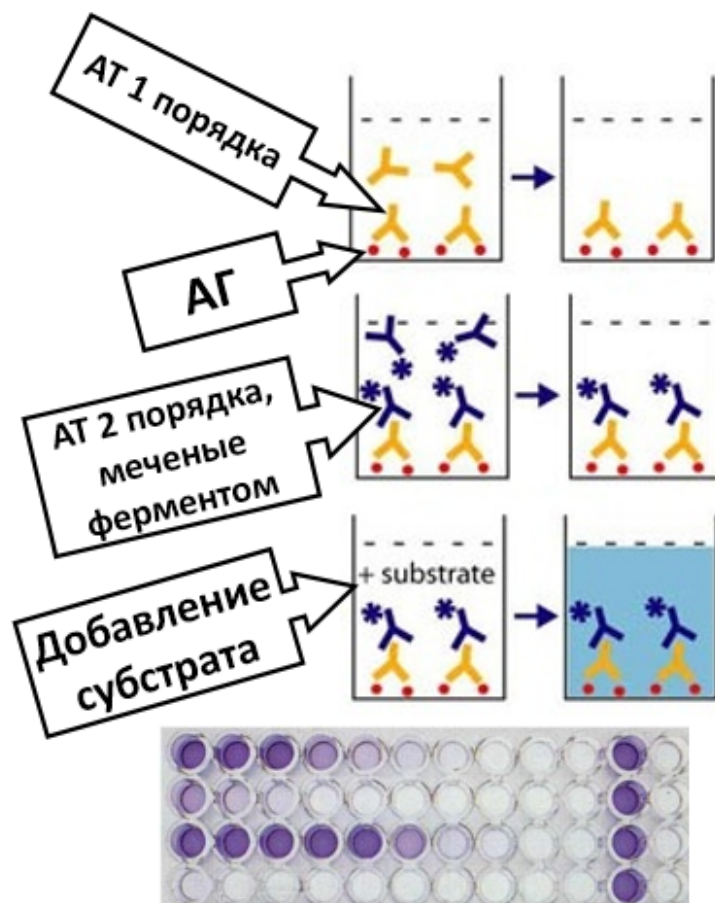


Рисунок 12.4 – Иммуноферментный анализ АГ-специфичных гибридных клеток

Однако лунки с положительным иммунным ответом могут содержать смесь слившихся клеток. После культивирования положительных клонов среды вновь тестируют, определяя, направлены ли АТ, вырабатываемые разными клонами, против одной и той же АГ детерминанты.

Каждый клон, продуцирующий моноклональное антитело, можно поддерживать в культуре практически бесконечно. В случае необходимости можно взять определенную дозу такого клона и ввести животному, у которого будет развиваться опухоль, продуцирующая моноклональные АТ заданной специфичности. Вскоре в сыворотке животного будут обнаружены антитела в очень высокой концентрации от

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

10 до 30 мг/мл. Клетки такого клона можно также выращивать *in vitro*, а секретируемые ими антитела получать из культуральной жидкости.

Кроме того, образцы можно заморозить в жидком азоте и использовать их в дальнейшем как источник клеток. Создание гибридом, которые можно хранить в замороженном состоянии (криоконсервирование), позволило организовать целые гибридомные банки, что в свою очередь открыло большие перспективы по применению моноклональных АТ.

Технологическая схема получения моноклональных антител

1. *Выделение Т-лимфоцитов по их розеткообразованию с эритроцитами барана*

Лейковзвесь выделяют на градиенте плотности фикол-верографин и центрифугируют при комнатной температуре в течение 40 мин при 300g. Мононуклеары отделяют и промывают средой 199. Затем смешивают с эритроцитами барана и эмбриональной телячьей сывороткой. Смесь инкубируют 15 мин при 37°C, центрифугируют при 150g в течение 5 мин и инкубируют при 4°C 12–16 ч. Затем проводят осторожно суспендирование клеток и их наслаивание на градиент фикол-верографин и центрифугируют. Розетки осаждаются на дно. При помощи гипотонического раствора их разрушают. Выделенные Т-клетки используют для иммунизации животных.

2. *Иммунизация мышей и получение клеток селезенки*

Иммунизацию мышей линии BALB/b (инбредные мыши, сингенные по отношению (генетически сходные) к плазмоцитоме) проводят путем введения им в хвостовую вену 2000 Т-клеток. Проводят 5 раз с интервалом 2 недели. Последнюю иммунизацию проводят за 4–5 дней до извлечения селезенки. Извлекают селезенку в асептических условиях, гомогенизируют и процеживают через ткань, промывают средой 199 2–3 раза.

3. *Подготовка миеломных клеток*

Клетки мышинной миеломы поддерживают в культуральной среде, содержащей 15 % эмбриональной телячьей сыворотки, глутамин и гентамицин.

4. *Слияние клеток, получение гибридом*

Клетки миеломы мышей и клетки селезенки смешивают в соотношении 1 к 10. Промывают средой 199, помещают в эту же среду,

Глава 12. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ СЫВОРОТОК И ПРЕПАРАТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

центрифугируют 3 мин при 300g и инкубируют при 37°C в течение 20 мин. Среду отсасывают, по каплям добавляют 50 % раствор полиэтиленгликоля и разводят средой в 5–10 раз. После выдерживания в течение 2–8 ч клетки переносят в лунки планшета на 96-ячеек. Через сутки среду меняют на ГАТ и инкубируют в водонасыщенной атмосфере с содержанием углекислого газа 5 %. Колонии появляются на 10–14 сутки.

5. Селекция гибридных клеток на среде ГАТ – отбор штаммом продуцентов (определение антителообразующей способности гибридом)

Клетки в количестве 500 тыс. инкубируют с 0,25 культуральной жидкости, разведенной 1 к 10 0,9 % раствором натрия хлорида, содержащего 0,1 % азиды натрия. Инкубируют при 4°C в течение 30 мин. Затем промывают фосфатным буферным раствором, который содержит 2 % эмбриональной телячьей сыворотки, 0,1 % натрия азиды и N-2-гидроксиэтилпиперазин-2-этансульфоновую кислоту и инкубируют при 4°C в течение 30 мин с 20 мкл поликлональных кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена. После чего промывают этим же буфером и ресуспендируют в изотоническом растворе с 1 % формалина. Анализируют флуоресценцию на проточном цитофлуориметре. Отбирают штамм ICO-90.

6. Клонирование

Получают фидер (слой поддерживающих клеток) селезенки и тимуса мышей линии BALB/b. Фидер получают путем гомогенизации органов, процеживания через ткань и их помещения в лунки планшета со средой 199 или RPMI. Через 3–7 суток образуется слой, используемый как фидер. Клетки клона разводят до 50 клеток в 10 мл и помещают в лунки. Видимые колонии возникают через 10–14 дней.

7. Консервирование гибридом

Гибридомы в логарифмической фазе извлекают из лунок, выдерживают в среде с 20 % эмбриональной телячьей сыворотки и 50–70 г/л диметилсульфоксида. Клетки сначала выдерживают при 2–4°C в сосуде Дьюара в течение 1–3 ч и затем переносят в жидкий азот.

Затем клетки из банка продуцентов извлекают, предварительно подготавливают и помещают в биореакторы для ферментации. После чего разделяют биомассу и культуральную жидкость, в которой содержатся моноклональные антитела, очищают жидкую часть.

Получение гибридом из асцитической жидкости (культивирование гибридом *in vivo*)

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

За 3–10 дней до инокуляции гибридом мышам внутрибрюшинно вводят 0,5 мл вазелинового масла для индукции роста гибридом в асцитной среде. 10^7 клеток гибридом ІСО-90 внутрибрюшинно вводят. Через 7–8 дней собирают асцитную жидкость. Центрифугируют ее при 4°C в течение 20 мин при 2500g. В надосадочной жидкости содержатся моноклональные антитела в наибольшей концентрации. Эту жидкость хранят при – 50°C.

8. Выделение и очистка моноклональных антител

Выделяют путем аффинной хроматографии на А-сефарозе. Асцитную или культуральную жидкость диализуют против фосфатного буфера с рН 8,0 при 4°C в течение 12–16 ч. Диализат наносят на колонку, уравновешенную этим же буфером и промывают до отсутствия белка. Моноклональные антитела, связавшиеся с сорбентом, элюируют цитратным буфером с рН 3,0. Полученный элюат концентрируют ультрафильтрацией.

Количественное определение моноклональных антител проводят подходящим иммунохимическим методом. Контролируются также остаточные и посторонние белки методом ВЭЖХ.

12.4 Применение моноклональных антител

Эффективность препаратов поликлональных АТ варьирует от одной партии к другой, поскольку в одних случаях при проведении иммунизации В-лимфоциты сильнее стимулируются одними эпитопами данного АГ, а в других – другими эпитопами того же АГ. Следовательно, в разных партиях поликлональных АТ может содержаться разное количество молекул, направленных против основного эпитопа, что влияет на эффективность препарата АТ.

Моноклональные антитела для медицинского применения – это препараты иммуноглобулина или фрагмента иммуноглобулина, например, F(ab')₂, с определенной специфичностью, выработанные одним клоном клеток.

Области применения:

- лечение онкологических патологий, аутоиммунных заболеваний и тяжелых воспалений;

Глава 12. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ СЫВОРОТОК И ПРЕПАРАТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

- дифференциальная диагностика многих инфекционных и неинфекционных заболеваний;
- изучение генетических механизмов многих заболеваний;
- выделение биологически активных веществ (белков, ферментов, гормонов, токсинов) из сложных смесей. Например, при использовании иммуноадсорбции для очистки интерферона был получен препарат высочайшей степени очистки (до 99 %). Только после одного пассажа через колонку с иммобилизованными моноклональными антителами интерферон очищался в 5 000 раз.
- можно использовать моноклональные антитела и в качестве меток для точной идентификации специализированных клеток, например нейронов;
- определение дозы лекарственных средств и усиление эффективности их действия на клетки-мишени благодаря использованию моноклональных АТ, полученных в результате иммунизации животных этими средствами;
- идентификация локализации опухоли с ее метастазами размером 0,5–1,0 см методом иммуносцинтиграфии;
- нейтрализация лимфоцитов, ответственных за отторжение трансплантата;
- нейтрализация аутоАТ, образующихся при аутоиммунных заболеваниях;
- создание высокоспецифичных вакцин и сывороток, особенно против определенных вирусных штаммов и паразитов.

Лекарственные средства на основе моноклональных антител

1. *Непосредственное использование моноклональных антител как лекарственных средств.*

Трастузумаб (Герцептин) – рекомбинантное моноклональное антитело, которое избирательно связывается с рецептором HER2 на поверхности опухолевых клеток многих солидных опухолей. Герцептин блокирует рецептор HER2, что не позволяет эпидермальному фактору роста стимулировать процесс деления злокачественных клеток.

Ритуксимаб (Ритуксан, Мабтера) представляет собой химерные моноклональные антитела мыши/человека, специфически связывающиеся с CD20+ антигеном. Этот антиген экспрессируется более чем в 90% В-клеточных неходжкинских лимфом. Механизм действия Ритуксана связан с развитием опосредованной антитело-зависимой клеточной и

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

комплемент–зависимой цитотоксичности, что вызывает гибель клеток лимфомы, положительных по CD20. В последние годы лекарственное средство зарегистрировано еще для лечения широкого круга аутоиммунных заболеваний с гиперфункцией В-клеток.

Алемтузумаб (Кампат, Кэмпас) – гуманизированное моноклональное антитело, связывающееся с CD52. Антиген CD52 экспрессируется на мембране большинства зрелых нормальных и опухолевых Т- и В-лимфоцитов. Этим объясняется чрезвычайно высокая активность алемтузумаба в отношении хронического лимфолейкоза и Т-клеточных лимфом. В последние годы Кэмпас используется для уменьшения реакции «трансплантат против хозяина».

Бевацизумаб (Авастин) представляет собой рекомбинантные гуманизированные моноклональные антитела, которые избирательно связываются с фактором роста эндотелия сосудов и нейтрализуют его, что приводит к нарушению ангиогенеза, снижению васкуляризации и угнетению роста опухоли.

2. Конъюгация моноклональных антител с токсинами (иммунотоксины).

К моноклональным антителам пришиваются (конъюгируются) токсины бактериального или растительного происхождения. Получается конструкция из структуры, специфичной к опухолевому антигену, и вещества, способного убить клетку, причем как самой опухоли, так и ее метастазов.

3. Радиоиммунотоксины.

Ибритумомаб (Зевалин) является конъюгатом Мабтеры с радиоактивным изотопом иттрия 90. Показаниями к использованию Зевалина является рецидивирующая неходжкинская лимфома, в том числе и при прогрессировании после приема Мабтеры.

4. Моноклональные антитела, действие которых направлено на воспалительный ответ.

Ремикейд (Инфликсимаб) представляет собой моноклональные антитела к одному из ключевых цитокинов, вовлеченных в развитие воспалительных процессов, – фактору некроза опухоли альфа (ФНО- α).

Глава 13

Организации Республики Беларусь, занимающиеся производством и контролем качества биотехнологических лекарственных средств

Вопросы для самоподготовки

- 1. Производство и контроль качества биотехнологических лекарственных средств в Республике Беларусь.*
- 2. Система контроля качества лекарственных средств, получаемых биотехнологическими методами в государственных учреждениях.*

13.1 Производство биотехнологических лекарственных средств в Республике Беларусь

При регистрации лекарственного средства на территории Республики Беларусь заявителем (производитель, официальный дистрибьютер) указывается: производитель фармацевтической субстанции, производитель, осуществляющий производство готовой лекарственной формы, организации (в случае их наличия), осуществляющие фасовку лекарственной формы, вторичную упаковку, контроль качества серии при выпуске, а также иные участники производства и контроля качества лекарственного средства. При регистрации экспертизу и апробацию методик контроля качества проходят все методики фармакопейной статьи производителя. Кроме данного документа производитель разрабатывает спецификацию на лекарственное средство, а каждую серию сопровождают протоколом анализа (сертификатом анализа, сертификатом качества, протоколом качества).

С 2004 года было принято решение о подготовке национальной фармакопеи, основанной на Европейской фармакопее. Беларусь с 2007 года

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

получила статус «Официального наблюдателя при Европейской Фармакопейной Комиссии». В период 2007-2009 гг. вышли три тома Государственной фармакопеи Республики Беларусь первого издания. В 2012 и 2016 годах опубликованы два тома второго издания. В ГФ РБ представлены общие статьи на методы анализа (физические, физико-химические, биологические и фармакогностические), определение подлинности, примесей, количественное определение, фармацевтико-технологические испытания, контейнеры, реактивы, общие тесты (по микробиологии, биологическим продуктам, общие статьи и таблицы физических характеристик), дозированные лекарственные формы, гомеопатические лекарственные средства, основанные на современных требованиях.

В Республике Беларусь производятся практически все группы лекарственных средств из субстанций, получаемых методами биотехнологии. Полный цикл производства (от субстанции до готового лекарственного средства), а также фасовка и упаковка осуществляются следующими фармацевтическими предприятиями РБ:

- **Антибиотики:** РУП «Белмедпрепараты» (азитромицин, ампициллин, амоксициллин, гентамицин, доксорубицина гидрохлорид, линкомицина гидрохлорид, тетрациклин, цефтриаксон, цефазолин, цефалексин, цефепим, цефотаксим, цефуроксим); ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов» (азитромицин, гентамицин, доксициклин, кларитромицин, клиндамицин, линкомицин, рокситромицин, цефтриаксон, цефазолин, цефепим, цефоперазон, цефотаксим, цефтазидим, цефуроксим, эритромицин); ООО «Фармтехнология» (азитромицин, амоксициллин, кларитромицин, спирамицин); СП ООО «Фармлэнд» (азитромицин, амоксициллин, колистат, рокситромицин, цефалексин); СООО «ТрайплФарм» (ванкомицин, капреоцин, тейкопланин, цефепим, цефтриаксон, цефосульбактам – цефоперазон и сульбактам);
- **Гормоны (инсулин, стероидные гормоны, соматотропин):** РУП «Белмедпрепараты» (человеческие инсулины, дексаметазон, гентадекс – дексаметазон и гентамицин, преднизолон, эритропоэтин – рекомбинантный человеческий гликопротеин, стимулирующий деление и дифференцировку эритроцитов в костном мозге); ОАО «Борисовский завод

Глава 13. ОРГАНИЗАЦИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ, ЗАНИМАЮЩИЕСЯ ПРОИЗВОДСТВОМ И КОНТРОЛЕМ КАЧЕСТВА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

медицинских препаратов» (клобетазол, бетаметазон); *ООО «Фармтехнология»* (бетаметазон);

- **Моноклональные антитела:** *СООО «ТрайплФарм* (Ритуксимаб – *Dr. Reddy's Laboratories Ltd*, Индия, упаковка в РБ); *ГП «Академфарм»* (бевацизумаб, ритуксимаб и трастузумаб – *ЗАО «Биокад»*, РФ, упаковка в РБ);
- **Иммуномодуляторы (интерфероны и полисахариды):** *ООО «Рубикон»* (Руферон – суппозитории содержат интерферон альфа-2b, Лаферон-Фарм Биотек – интерферон альфа-2b – НПК *ООО «Интерфармбиотек»*, Украина, упаковка в РБ); *ОАО «Несвижский завод медицинских препаратов»* (Лаферобион-НЗ – интерферон альфа-2b – *ФЗ ООО «БИОФАРМА»*, Украина, упаковка в РБ); *ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий»* (фруглюмин А и В – высокомолекулярный полисахарид с иммуномодулирующим действием);
- **Вакцины:** *РУП «Белмедпрепараты»* (Гриппол плюс-Белмед – фасовка и упаковка);
- **Пробиотики (лактобактерин, бифидумбактерин):** *РУП «Белмедпрепараты»* (Лактобациллин); *ПНУП «Диалек»* (Биофлор, Бифидумбактерин, Диалакт);
- **Сыворотки:** *ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий»* (Иммуноглобулин человеческий антирезус анти D);
- **Ферменты и их блокаторы:** *РУП «Белмедпрепараты»* (стрептокиназа); *ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий»* (тромбин, фибринолат);
- **Витамины:** *РУП «Белмедпрепараты»* (аскорбиновая кислота); *ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов»* (аскорбиновая кислота, БориВит – В₁, В₆, В₁₂, цианокобаламин); *УП «Минскинтеркапс»* (Антиоксикапс, Дуокапс, Кальций-ДЗ-МИК, Нейромед – комбинации витаминов); *СООО «Лекфарм»* (Нейровит – комбинации витаминов); *ОАО «Экзон»* (аскорбиновая кислота);
- **Аминокислоты:** *РУП «Белмедпрепараты»* (L-лизин, L-аспарагиновая кислота, лейцин, Валикар, Гепавилаг, Тавамин – сумма аминокислот, Церебролизат – гидролизат головного

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

мозга крупного рогатого скота и свиней, содержащий аминокслоты); *ОАО «Несвижский завод медицинских препаратов»* (Гамамин 40 – сумма аминокислот); *ООО «Фармтехнология»* (глицин);

- **Декстраны (плазмозамещающие растворы):** *РУП «Белмедпрепараты»* (Полиглюкин, Реополиглюкин); *ОАО «Несвижский завод медицинских препаратов»* (Реополиглюкан, Полиглюкин);
- **Спирты (этанол):** *Богушевский спиртовой завод; Бобруйское РУП «Гидролизный завод»; Уречский спиртовой завод; Хотовский спиртзавод; Ивацевичский спиртзавод; Бродницкий крахмальный завод и др.;*
- **Низкомолекулярные гепарины:** *РУП «Белмедпрепараты»* (гепарин); *ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов»* (гепарин); *ООО «Фармтехнология»* (гепарин).

Для исходного сырья, упаковочных материалов, промежуточной, нерасфасованной и готовой продукции на предприятии составляется и утверждается спецификация, в которой содержится:

- описание сырья или материалов – установленное наименование, внутренний код; ссылка на нормативный документ по контролю качества в регистрационном досье; наименования поставщиков или производителей (обычно несколько);
- указания по отбору образцов и проведению испытаний;
- требования к качественному и количественному составу с указанием предельных норм отклонений;
- условия хранения и сроки годности;
- для готовой продукции приводится описание лекарственной формы, подробные сведения об упаковке и маркировке.

При поступлении на фармацевтическое предприятие исходное сырье (фармацевтические субстанции, вспомогательные вещества), несмотря на наличие сертификатов анализа от производителя, обязательно помещается в карантинную зону, подвергается полному входному анализу, включающему испытания на подлинность, чистоту, количественное содержание. Для этих целей применяются фармакопейные статьи на субстанции, технические условия (ГОСТы) на вспомогательные вещества, возможно использование дополнительных методов анализа, разработанных на предприятии.

Глава 13. ОРГАНИЗАЦИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ, ЗАНИМАЮЩИЕСЯ ПРОИЗВОДСТВОМ И КОНТРОЛЕМ КАЧЕСТВА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

После одобрения отдела контроля качества исходное сырье и упаковочные материалы перемещаются из карантина в складские зоны, где хранятся вплоть до использования в соответствии с физико-химическими свойствами.

Каждый владелец лицензии на производство должен организовать на предприятии независимый отдел контроля качества. Этот отдел возглавляет лицо, имеющее соответствующую квалификацию и опыт, в распоряжении которого находится одна или несколько контрольных лабораторий. Помещения и оборудование в лабораториях должны соответствовать задачам, обусловленным характером и масштабами производственных операций. Персонал отдела контроля качества должен иметь доступ в производственные зоны для отбора проб и исследований.

Весь контроль в процессе производства, включая и тот, который выполняется производственным персоналом в производственной зоне, должен осуществляться в соответствии с методиками, утвержденными отделом контроля качества, а результаты – протоколироваться.

Особое внимание следует уделять качеству лабораторных реактивов, мерной посуды и титрованных растворов, стандартных образцов и культуральных сред. Лабораторные реактивы, предназначенные для длительного использования, маркируются с указанием даты приготовления, срока годности и подписью приготовившего их лица. На этикетке указывается срок годности нестабильных реактивов и культуральных сред, особые условия хранения. Кроме того, для титрованных растворов приводятся дата последнего установления титра и соответствующий последний поправочный коэффициент. При необходимости на емкости обозначается дата получения каждого вещества, используемого для проведения испытаний (например, реактивов и стандартных образцов).

В ходе производства проводится весь необходимый контроль промежуточной продукции, контроль качества готовой продукции на соответствие требованиям спецификации и фармакопейной статьи производителя. Все произведенные лекарственные средства не будут проданы и поставлены заказчику до тех пор, пока уполномоченное лицо предприятия не удостоверит, что серия продукции была изготовлена и проконтролирована в соответствии с действующими требованиями. Образцы каждой серии лекарственных средств хранятся один год после истечения срока годности в своей окончательной упаковке в

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология
рекомендуемых условиях.

13.2 Система контроля качества лекарственных средств, получаемых биотехнологическими методами в государственных учреждениях

Контроль качества лекарственных средств в государственных учреждениях включает мероприятия, направленные на соблюдение требований законодательных актов, регламентирующих обеспечение качества лекарственных средств в процессе разработки, производства, хранения и реализации населению. Он осуществляется аккредитованными испытательными лабораториями, которые располагают определенным набором производственных и вспомогательных помещений, квалифицированным персоналом и соответствующими техническими средствами проведения контроля качества любого лекарственного средства в соответствии с утвержденными уполномоченным органом нормативными документами. Результаты проведенной проверки качества лекарственного средства оформляются испытательной лабораторией протоколом испытаний. В помощь национальной системе может быть привлечена международная система удостоверения качества ЛС. Испытательные лаборатории Республики Беларусь специализируются по следующим направлениям.

Испытания **иммунобиологических лекарственных средств** до поступления в реализацию, находящихся в обращении на территории РБ, и в случае обжалования результатов проведенной проверки (арбитражный контроль) проводятся в Лабораторной службе государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии». В Лабораторной службе государственного учреждения «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» проводится только арбитражный контроль качества иммунобиологических лекарственных средств.

В Лаборатории государственного контроля за качеством компонентов, препаратов крови, кровезаменителей и консервирующих растворов государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» проводится контроль качества **лекарственных средств, полученных из донорской крови**, до поступления в реализацию, находящихся в обращении

Глава 13. ОРГАНИЗАЦИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ, ЗАНИМАЮЩИЕСЯ ПРОИЗВОДСТВОМ И КОНТРОЛЕМ КАЧЕСТВА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

на территории РБ, и арбитражный контроль.

Лекарственные средства, полученные из донорской крови (плазмы) либо полученные с использованием технологий рекомбинантной ДНК и другими биотехнологическими методами (вакцины, анатоксины, иммуноглобулины, интерфероны, сыворотки лечебно-профилактические, лактоглобулины, бактериофаги, цитокины) проверяются по следующим показателям и разделам фармакопейных статей производителя:

- «Описание». Соответствие лекарственного средства показателю «Описание» фармакопейной статьи производителя, показателю «Описание» документа производителя лекарственного средства, подтверждающего соответствие качества серии (сертификат анализа, протокол анализа или др.), а также разделу «Описание» инструкции по медицинскому применению и (или) листка-вкладыша, согласованных Минздравом при государственной регистрации (перерегистрации) лекарственного средства.
- Показатели «рН», «Подлинность», «Прозрачность», «Цветность», «Специфическая активность», «Специфическая безопасность», «Токсичность», «Пирогенность», «Стерильность», «Микробиологическая чистота».
- Проверка качества лекарственного средства по разделам «Упаковка» и «Маркировка» фармакопейной статьи или нормативного документа производителя предусматривает подтверждение соответствия внешнего вида образца упаковки лекарственного средства и ее маркировки следующим документам, входящим в регистрационное досье и согласованным Минздравом при государственной регистрации (перерегистрации) лекарственного средства: фармакопейной статье производителя; дизайну упаковки (макету графического оформления) лекарственного средства; документу производителя, подтверждающему качество лекарственного средства (сертификат анализа, протокол анализа или др.); инструкции по медицинскому применению и (или) листку-вкладышу.

Кроме специализированных испытательных лабораторий контролем качества лекарственных средств занимаются контрольно-аналитические

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

лаборатории областного уровня (на базе областных торгово-производственных республиканских унитарных предприятий «Фармация»), а также Республиканская контрольно-аналитическая лаборатория и Лаборатория фармакопейного и фармацевтического анализа республиканского унитарного предприятия «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении». Перечисленные лаборатории в соответствии с областью аккредитации могут выполнять анализы по следующим показателям: «Описание», «Подлинность», «Прозрачность», «Цветность», «рН», «Растворимость», «Светопоглощающие примеси», по показателям «Подлинность» и «Количественное содержание» в случае использования химических (титриметрия, гравиметрия) или инструментальных методов анализа (ВЭЖХ, спектрофотометрия, ГЖХ и др.), а также по разделам «Упаковка» и «Маркировка».

Рассмотрим проведение контроля качества иммунобиологического лекарственного средства на примере вакцины антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированной сухой. Вакцина контролируется по семнадцати показателям.

1. Описание (визуально).
2. Подлинность (оценивается на мышах).
3. Растворимость (визуально).
4. Прозрачность раствора (визуально, путем сравнения с эталоном).
5. Цветность раствора (визуально, путем сравнения с эталоном).
6. Значение рН (потенциометрически).
7. Потеря в массе при высушивании (инструментальный метод).
8. Герметизация (визуально).
9. Бычий сывороточный альбумин (реакция преципитации с сывороткой диагностической кроличьей, метод иммуноэлектрофореза).
10. Формалин (инструментальный метод).
11. Стерильность (инструментальный метод).
12. Пирогенность (оценивается на кроликах).
13. Токсичность (оценивается на мышах).
14. Специфическая безопасность (оценивается на мышах).
15. Специфическая активность (оценивается на мышах).
16. Термостабильность (оценивается после выдерживания при 37°C в течение четырех недель по показателю «Специфическая активность»).

Глава 13. ОРГАНИЗАЦИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ, ЗАНИМАЮЩИЕСЯ ПРОИЗВОДСТВОМ И КОНТРОЛЕМ КАЧЕСТВА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

17. Упаковка и маркировка (визуально).

Таким образом, из 17 показателей –десять показателей могут оценивать неспециализированные испытательные лаборатории по контролю качества лекарственных средств, шесть показателей оцениваются на животных (необходим виварий).

Построенная в Республике Беларусь система государственной регистрации и многостадийного контроля качества позволяет полностью исключить возможность попадания на фармацевтический рынок непроверенных и некачественных лекарственных средств и в полной мере гарантирует их эффективность, безопасность и качество при реализации в аптечных сетях и в учреждениях здравоохранения.

Глава 14

Культивирование растительных клеток

Вопросы для самоподготовки

1. История культивирования растительных клеток.
2. Факторы, влияющие на рост культуры клеток растений и накопление вторичных метаболитов.
3. Методы выращивания культуры клеток растений.
4. Применение лекарственных средств, полученных из культур растительных клеток в медицине.

14.1 История культивирования растительных клеток

Принципы культуры клеток впервые четко сформулировал *Г. Габерландт* в 1902 году. Он работал с отдельными клетками паренхимы листа ряда покрытосеменных растений и использовал в качестве питательной среды раствор Кноппа с добавлением сахарозы, аспарагина и пептона. *Г. Габерландт* выдвинул гипотезу о **тотипотентности** (свойство соматических клеток растений полностью реализовать свой потенциал развития, т.е. реализовать омнипотентность ядра с образованием целого организма) любой живой клетки растения и пытался вырастить ткань из единственной клетки. Однако ему самому не удалось экспериментально доказать свою гениальную догадку, так как он выбрал для опытов узкокодифференцированные клетки, утратившие способность к активному делению и эмбриональному росту.

Работы *Ф. Уайта* с кончиками корней томата и *Р. Готре* с камбиальными тканями ивы и моркови в 30-е годы XX-го века легли в основу современных методов культуры тканей. *Ф. Уайт* поддерживал непрерывную длительную культуру кончиков корней около 30 лет, еще дольше культивировались каллусные клоны, полученные *Р. Готре* из

Глава 14. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

камбия и флоэмы корня моркови. Он ввел в питательную среду ауксин и показал его способность стимулировать деление клеток камбия. *Ф. Уайт* и *Р. Готтре* внесли неоценимый вклад в становление современного метода культуры тканей растений. С этого времени начинается интенсивное развитие нового направления экспериментальной биологии растений.

В Советском Союзе исследования в области культуры тканей были начаты в 1944 году в Московском институте физиологии растений под руководством *Н.А. Максимова* и *А.А. Прокофьева* и далее успешно продолжены *Р.Г. Бутенко*, создавшей советскую школу биотехнологов. В 1959 году *Р.Г. Бутенко* в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева АН СССР была впервые получена каллусная культура женьшеня. Позднее для получения каллусных и суспензионных культур женьшеня с успехом были использованы корни (с эксплантами из области ксилемы, флоэмы и камбия), стебли, семядоли и др.

В 1965 году по инициативе профессора *А.Ф. Гаммерман* и профессора *И.В. Грушвицкого* при кафедре фармакогнозии Ленинградского химико-фармацевтического института (Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия) была создана группа по изучению культур ткани лекарственных растений. Основными объектами изучения стали культуры тканей тропических видов раувольфии как возможные продуценты БАВ, используемые для получения сердечно-сосудистых средств, и растений семейства *Araliaceae*, действующие вещества которых обладают тонизирующими и адаптогенными свойствами.

В настоящее время в РФ осуществляется выпуск лекарственных и парфюмерных средств на основе биомассы клеток женьшеня и родиолы розовой, проводятся работы по созданию средств на основе культур тканей стефании гладкой, омелы белой, унгернии, алтея, стальника, солодки, марены, раувольфии змеиной, полисциаса папоротниколистного и ряда других растений.

В Японии исследованиями по получению лекарственных средств методами культивирования тканей растений занимаются практически все ведущие фармацевтические фирмы. Основное внимание уделяется созданию высокопродуктивных клеточных штаммов (сверхпродуцентов), разработке технологических приемов выращивания ткани, поиску путей совершенствования и повышения надежности биореакторов. В результате целенаправленных исследований сотрудниками фирмы «Mitsui Petrochemical» была получена ткань воробейника, продуктивность которой составила 800 % продуктивности интактного растения. На ее основе

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

налажен выпуск противобактериального и противовоспалительного средства – шиконина. Фирма «Shionogi» получила убихинон-10 из ткани табака, продуктивность которой в 12 раз выше по сравнению с целым растением. Японской компанией «Sankyo Company Ltd» был предложен метод культивирования ткани мака снотворного и разработана технологическая схема получения морфина *in vitro* в значительных количествах.

В Германии ведутся работы по повышению содержания фармакологически активных веществ в культуре растительной ткани. Исследователям удалось получить ткань катарантуса розового, содержащую алкалоиды в количествах, в 15-20 раз превышающих соответствующие показатели интактных растений. Много исследований в Германии посвящено вопросам использования культуры растительной ткани для биотрансформации химических веществ. Так, ученые университета в Тюбингене изучают превращения сердечных гликозидов культурой ткани наперстянки.

В США, Канаде и Великобритании также занимаются получением клеточных штаммов с высоким и стабильным выходом целевых веществ, масштабированием процессов выращивания тканей, конструированием надежных биореакторов. Интенсивно развивается промышленное производство фитопрепаратов из культуры растительной ткани.

Преимущества культивирования изолированных клеток и тканей растений

Метод культивирования растительных клеток и тканей достиг к настоящему времени высокого технологического уровня, пригодность его для решения ряда биологических, ботанических и медицинских проблем не вызывает сомнения. Его практическое использование является перспективным.

Основными преимуществами использования культивируемых клеток высших растений в биотехнологической промышленности является:

- а) способность клеток синтезировать традиционно используемые продукты растительного происхождения;
- б) возможность создания принципиально новых продуктов, превосходящих традиционные или открывающих новые области применения;

Глава 14. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

- в) возможность биотрансформации дешевых предшественников в конечный ценный продукт;
- г) возможность получения продукта независимо от климата, сезона, погоды, почвенных условий;
- д) унификация и оптимизация условий выращивания;
- е) перспективы полной автоматизации и компьютеризации процессов.

Однако при этом организованное на основе клеточных культур растений производство должно быть способным выдержать конкуренцию с альтернативной системой получения продукта – использованием традиционного растительного сырья. Также следует принять во внимание быстрое истощение ресурсов дикорастущих растений и сложность перевода их на полевое выращивание.

14.2 Факторы, влияющие на рост культуры клеток растений и накопление вторичных метаболитов

Генотип материнского растения

Генотип родительского растения, то есть донора экспланта для введения в культуру, существенно влияет на биосинтетический потенциал культивируемых клеток. *М. Ценк* с сотрудниками для получения культуры барвинка розового собрал 184 образца семян из различных мест произрастания. Из проростков этих семян были отобраны те, которые содержали наибольшее количество индольных алкалоидов серпентина и аймалицина (более 0,7% в пересчете на сухую массу). Из этого материала были получены каллусные культуры, содержащие указанные алкалоиды в 4–5 раз больше, чем каллусы, полученные из низкопродуктивных растений.

Однако *У. Реллер* не обнаружил подобной зависимости в образовании серпентина каллусными культурами, полученными из разных растений барвинка розового. Японские исследователи также не наблюдали корреляции между содержанием берберина в интактных экземплярах василистника и содержанием этого алкалоида в его каллусных культурах.

При получении клеточных культур мака снотворного использовали апикальные меристемы, изолированные одновременно из разных, но одновозрастных растений, культивировали на одинаковых средах.

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

Полученные каллусы существенно различались как по ростовым характеристикам, так и по синтезу алкалоидов.

Несмотря на то, что приведенные данные противоречивы, большинство исследователей учитывают генетическую характеристику ткани – *экспланта* (фрагмент ткани или органа, инкубируемый самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса). Однако это вовсе не значит, что в качестве экспланта используется только ткань, богатая искомым веществом, поскольку высокая концентрация вещества может отражать накопление его в ткани путем направленного транспорта, а не только как результат синтеза по месту локализации. Поэтому выбор органа растения для введения его в культуру имеет немаловажное значение. Так, например, содержание стероида диосгенина в культуре клеток диоскореи, полученной из клубня, было на порядок выше, чем в культуре клеток из побега. Но зачастую клетки *in vitro* тотипотентны в отношении синтеза вторичных соединений, то есть любая клетка при создании соответствующих условий культивирования может продуцировать вещества, характерные для исходного растения.

Следует подчеркнуть, что гены, ответственные за регуляцию биосинтеза вторичных метаболитов, присутствуют и в других клетках, обычно их не продуцирующих. В некоторых случаях биосинтетические способности культуры клеток восстанавливались при регенерации растений. Например, культура клеток наперстянки при длительном культивировании утрачивала способность к синтезу гликозидов, а растения, регенерированные из этой культуры, восстанавливали их биосинтез. Таким образом, генетическая информация в клетках сохраняется, но для ее реализации требуются специфические условия.

Следовательно, культивируемые клетки, изолированные из высокопродуктивных растений и тканей, содержат необходимую генетическую информацию для биосинтеза вторичных метаболитов.

Гетерогенность культивируемых клеток

У культивируемых *in vitro* клеток могут происходить значительные изменения вторичного метаболизма по сравнению с интактными растениями. Неорганизованно пролиферирующие каллусные клетки в основном характеризуются низким содержанием искомого вещества. В то же время у некоторых растений клетки *in vitro* продуцируют повышенное количество БАВ, например, клетки амми зубной и некоторых видов

Глава 14. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

дурмана. Не уступает целому растению по содержанию БАВ и культура клеток женьшеня.

У отдельных растений в культуре клеток синтезируются вещества, не обнаруженные *in vivo*, например, убихинон-10 в культуре ткани табака, вомиленин в культуре ткани раувольфии змеиной. Спектр стероидных сапонинов и стероидов в клеточной культуре, полученной из корневищ диоскореи дельтовидной, значительно отличался от состава стероидов исходной ткани.

Эти факты свидетельствуют о том, что вторичный метаболизм в клетках растений зависит от процессов развития (цитодифференцировки). Изменение состава продуктов вторичного метаболизма в каллусных культурах вызвано, по-видимому, отсутствием **дифференциации** (комплекс процессов, приводящих к различиям между дочерними клетками, а также между материнскими и дочерними клетками) ткани. Очень часто дифференцированные культуры тканей синтезируют большее количество вторичных веществ, чем недифференцированные. Однако это не является абсолютным правилом. Появляется все больше данных, что органогенез в культуре не является необходимым условием для биосинтеза вторичных метаболитов *in vitro*. Например, иногда органогенез сопровождается снижением содержания вторичных веществ. Нарушение автотрофности питания при переходе к гетеротрофному типу обмена также может приводить к неполной реализации генетических возможностей клетки.

Клетки растений *in vitro* обладают генетической гетерогенностью, что тоже может быть причиной изменения вторичного метаболизма. Вместе с тем, гетерогенность клеточной популяции может играть положительную роль, позволяя отбирать линии клеток с сильно измененными свойствами, в частности с повышенным синтезом искомого продукта или синтезирующие совершенно другие вещества.

Изменение генома культивируемых клеток могут быть вызваны путем индуцированного мутагенеза. Биохимические мутанты могут быть получены при обработке культуры либо мутагенами, либо антиметаболитами. Так, в результате химического индуцированного мутагенеза и селекции на клеточном уровне были отобраны мутированные клеточные линии следующих растений: раувольфии змеиной, содержащей в 10 раз больше алкалоида аймалина и диоскореи дельтовидной, продуцирующей диосгенин в тех же количествах, что и интактное растение. Выделяемые вещества являются ценными соединениями для

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

фармацевтической промышленности. Аймалин используют для получения препаратов, обладающих антиаритмическим действием, а диосгенин проявляет антиатеросклеротическую активность. В дальнейшем, благодаря применению метода экспериментального мутагенеза и клонирования, были получены еще более продуктивные клеточные линии штамма диоскореи дельтовидной.

При обработке культуры антиметаболитами, например, аналогами ароматических аминокислот, большинство клеток погибает. Единичные мутантные клетки, выжившие в этих условиях, способны синтезировать избыточное количество метаболита. Так, были получены клоны клеток моркови и картофеля, синтезирующие большое количество триптофана, клоны клеток клена белого, продуцирующие много фенилаланина и тирозина.

Химические факторы культивирования

Одним из основных условий успешного культивирования тканей *in vitro* является правильный подбор состава питательной среды. Этому вопросу на всех этапах развития метода культуры ткани ученые уделяли большое внимание. Были разработаны различные питательные среды, некоторые из них нашли широкое применение: Мурасиге и Скуга (калия и аммония нитраты; магния сульфат; кальция хлорид; калия дигидрофосфат; железа, марганца, меди и цинка сульфаты; борная кислота; натрия молибдат; кобальта хлорид; секвестрен (удобрение с железом), витамины (тиамин, пиридоксин, кислота никотиновая), сахароза), Уайта, Эллера, Миллера, Шенка и др.

Важнейшим фактором среды, влияющим на накопление биомассы, являются углеводы. Поскольку в основном клетки *in vitro* гетеротрофны, то обычно в качестве источника углевода используется сахароза. Наравне с сахарозой может использоваться и глюкоза, но за редким исключением, рост и высокий уровень биосинтеза в культуре обеспечивает именно сахароза. Повышение концентрации сахарозы обычно приводит к увеличению выхода вторичных метаболитов. Вместе с тем, высокие концентрации сахарозы повышают осмотический потенциал среды, влияние которого на метаболизм культивируемых клеток не изучено. Однако увеличение содержания сахара в среде повышает себестоимость полученной продукции, поэтому поиск дешевых углеводных добавок остается актуальным. В последние годы стали использовать отходы производства – сахарную патоку, молочную сыворотку. Установлено, что

Глава 14. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

наиболее эффективными источниками углеводов являются глюкоза и сахароза. Они утилизируются более чем на 60 %. Их присутствие в составе питательной среды способствует высокой скорости роста и повышению выхода биомассы.

Рост на средах с реже используемыми источниками углеводов, такими как галактоза и лактоза, а также на неочищенных источниках, часто требует особого периода «адаптации». Он может быть коротким (2–3 пассажа), а иногда более длительным (12–15 пассажей).

Полисахариды, как правило, не используют в качестве источников углеводного питания. Но поскольку ряд тканей обладает активными гидролитическими ферментами (амилаза) и выделяет их в среду, то такие ткани могут расти на средах с растворимым крахмалом (ткани можжевельника, сахарного тростника, раувольфии змеиной).

Большое влияние на рост и синтез вторичных соединений оказывает минеральный состав среды. При этом наиболее значимыми являются азот и фосфор. Однако их влияние очень специфично как в отношении вида растения, так и в отношении того или иного продукта.

Соотношение аммонийного и нитратного азота в питательной среде также имеет значение. Для большинства культур четко установлена корреляция между увеличением сырой массы ткани и использованием нитратов из среды. Увеличение нитратного азота в среде приводит к повышению синтеза диосгенина культурой клеток диоскореи. В качестве источников азота используют также органические соединения: мочевины; аминокислоты: аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, аланин, или их смеси в виде гидролизата казеина. Иногда их используют в качестве единственных источников азотного питания, но чаще в комплексе с нитратами и солями аммония.

Следует также отметить, что у одних культур органические формы азота – пептон, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина тормозят накопление вторичных соединений, а у других повышают их синтез.

Необходимым компонентом является фосфор, который входит в состав питательных сред в виде солей ортофосфорной кислоты (NaH_2PO_4 , KH_2PO_4) Влияние фосфора на биосинтез вторичных метаболитов различно. Так, например, в культуре клеток табака происходит усиление синтеза никотина при уменьшении в среде сахарозы, нитрата и фосфора. Бесфосфатная среда способствует образованию алкалоидов и других вторичных метаболитов в каллусной культуре гармалы. Недостаток фосфора стимулирует синтез вторичных соединений и у некоторых других

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

культур, но существуют противоположные данные. Для ткани барвинка розового повышение содержания фосфора в среде приводило к увеличению выхода вторичных соединений.

Ионы K^+ , Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} необходимы в меньших количествах, и их вносят в состав среды в виде минеральных солей: $NaCl$, $CaSO_4$, $MgSO_4$, K_2SO_4 . Железо вводят также в виде неорганических солей: $FeCl_3$, $FeSO_4$. Для повышения усвоения железа вводят хелатирующие агенты, например, соли этилендиаминтетрауксусной кислоты. Кроме основных макроэлементов в состав сред входят так называемые микроэлементы: соли марганца, кобальта, меди, цинка, молибдена, иода, бора. Присутствие солей в составе среды необходимо, т.к. они моделируют состав компонентов питания, присущих клеткам материнского растения.

Решающими факторами при составлении питательной среды, эффективно регулирующими первичный и вторичный обмен клеток, являются фитогормоны (ауксины и цитокинины). Во многих работах, посвященных изучению действия фитогормонов, показано, что оно зависит от вида растения, от природы вторичного соединения, от клеточного штамма и т.д. Поэтому результаты экспериментов по влиянию фитогормонов на синтез вторичных метаболитов крайне противоречивы. М. Ценк с сотрудниками изучили влияние 146 соединений с ауксиновой активностью на рост и образование антрахинонов у культуры клеток моринды лимнолистной из семейства мареновых. Они установили, что многие из них поддерживали хороший рост клеток, но только альфа-нафтилуксусная кислота наряду с поддержанием роста стимулировала образование антрахинонов.

Широко применяемым ауксином является 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, способная стимулировать как деление, так и растяжение клеток. Однако этот компонент может вызывать резкое подавление синтеза продуктов вторичного метаболизма. Варьируя концентрацией и типом ауксинов и цитокининов, можно оказать значительное влияние на процессы роста и биосинтеза для каждой конкретной культуры.

Для образования первичного каллуса обычно используют более высокие концентрации ауксинов, а при пассировании их содержание в среде может быть снижено в 10 раз.

К цитокининам или, как их еще называют, растительным гормонам, относят кинетин и ряд его синтетических аналогов. Кинетин (6-фурфуриламинопурин) не только активизирует клеточное деление, но и

Глава 14. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

является обязательным компонентом среды при индуцировании органогенеза.

В состав питательных сред обязательно входят витамины, как стимуляторы роста культур. Чаще всего используют тиамин (B_1), пиридоксин (B_6) и никотиновую кислоту. Необходимость их внесения в среду объясняется тем, что они входят в состав ферментов, катализирующих реакции, важные для жизнедеятельности клетки. Витамины вносят в среду в концентрациях от 0,1 до 10 мг/л. Среди факторов, оказывающих положительное влияние на биосинтез вторичных веществ, можно выделить некоторых предшественников самих искомым соединений. Предполагают, что при продолжительном культивировании тканей в ограниченном объеме питательной среды происходит снижение способности клеток синтезировать органические вещества, а добавление в среду предшественников вторичных соединений повышает синтез биологически активных веществ. В качестве предшественников используют аминокислоты (глутамат, фенилаланин, лейцин, орнитин и др.). Однако не всегда каллусные ткани используют их. Возможно, имеет значение время внесения предшественника в питательную среду. Отсутствие желаемого эффекта от внесения в питательную среду предшественников можно объяснить разными причинами: либо клетки их не поглощают, а синтезируют сами, либо они распадаются в процессе приготовления и стерилизации среды или переходят в другие физиологически неактивные формы. Не исключено, что предшественники могут ингибировать рост культуры. Для выяснения роли предшественников необходимы более тщательные исследования с применением радиоактивных меток. Главным препятствием в этих работах является недостаточное знание путей биосинтеза многих продуктов вторичного метаболизма.

Для приготовления твердых питательных сред используют агар-агар. Это полисахарид, получаемый из морских водорослей и изготавливаемый в виде пластин, зерен, порошка желтовато-белого, сероватого цвета. Агар-агар образует с водой гель, плавящийся при 100°C и застывающий при 45°C . Агар-агар теряет способность образовывать гель в кислой среде. В составе агара были обнаружены витамины и другие факторы роста. Агар-агар добавляют в питательные среды в концентрации 0,5–1,0%.

Важным параметром для успешного выращивания культур клеток является значение рН питательной среды. От величины рН зависит активность белков, устойчивость и степень усвоения компонентов среды

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

(витаминов, углеводов, фитогормонов). При низких значениях рН не происходит желатинизации агар-агара. Для большинства сред значение рН составляет 5,5–6,0 (оптимальное значение).

Относительную стабильность рН поддерживают введением в состав среды хелатированных соединений или буферов. Кроме того, необходимый уровень рН готовой среды может быть установлен с помощью добавления 10 % или 1 М растворов КОН или NaOH, а также 1 М раствора HCl перед автоклавированием. Однако необходимо учитывать, что во время стерилизации рН среды может измениться.

Физические факторы культивирования

Физическими факторами, влияющими на накопление вторичных метаболитов клетками, являются: свет, температура, аэрация и режим перемешивания в случае суспензии, газовый состав в колбах.

Стимулирующее действие света на образование вторичных соединений в культуре клеток показано на примере каротиноидов, эфирных масел, коричных масел, флавоноидов, антоцианов, катехинов, алкалоидов, витаминов. Свет активировал ферменты фенольного метаболизма, не влияя при этом на ферменты углеводного и липидного обмена. В некоторых случаях свет оказывал ингибирующее действие, подавлял синтез алкалоидов в культурах дурмана, скополии, табака, шиконина – в культуре клеток воробейника. В большинстве случаев, с целью получения БАВ, культуры выращивают в темноте.

Данных о влиянии температуры на рост и биосинтез клеточных культур очень мало. Однако тот факт, что температура оказывает действие на вторичный метаболизм интактных растений, говорит о необходимости исследований в этом направлении. Тем более, что температурные оптимумы для роста культуры клеток и биосинтеза не всегда совпадают. Так, например, наилучший рост каллусов гармалы наблюдали при 30°C, а максимум образования алкалоидов – при 25°C. Температурный оптимум для подавляющего числа культур тканей лежит в пределах 24–27°C.

При выращивании клеток и тканей растений в жидкой питательной среде необходимо учитывать условия перемешивания и аэрации. Потребность в дыхании у растительных клеток ниже, чем у микроорганизмов. Если чрезмерно повышать степень аэрации культуры растительных клеток, то происходит значительное увеличение размеров вакуолей клеток, а при интенсивном перемешивании вакуоли будут

разрушаться, что приведет к гибели клеток. Для каждого вида культуры тканей подбираются оптимальные условия перемешивания, обычно они составляют 60–130 об/мин.

14.3 Методы выращивания культуры клеток растений

Культура каллусных тканей

Каллусная ткань – это недифференцированная ткань (не имеющая строго определенной анатомической структуры), образованная паренхимными клетками в результате их повреждения (ранения) и последующих *дедифференцировки* (переход специализированных, неделящихся клеток к пролиферации) и деления. Образование и рост каллуса регулируется стимуляторами роста (ауксинами и цитокининами). С помощью этих веществ образование каллуса можно индуцировать и у тех тканей растения, которые его не образуют в ответ на ранение. После образования каллуса в асептических условиях его отделяют и помещают на поверхность агаризованной питательной среды. В результате этого получают стерильную культуру каллусной ткани. Каллусную ткань можно поддерживать в культуре неограниченно длительное время, периодически разделяя ее на фрагменты и пересаживая на новую среду. Впервые культура каллусной ткани из корня моркови была получена *Р. Готре* (1939 г.).

Каллусные культуры различаются по интенсивности роста, по консистенции, окраске, способности зеленеть на свету и другим свойствам. Клеточные колонии на агаризованной среде могут быть компактными, твердыми, а также рыхлыми. При извлечении каллуса они распадаются на отдельные кусочки. Последний тип каллусов в жидкой среде очень легко отделяет одиночные клетки и дает начало суспензионной культуре. Консистенция каллуса зависит в значительной степени от состава среды. Анатомическая структура рыхлых каллусов характеризуется множеством организованных центров меристематической активности, разделенных большими недифференцированными клетками. Плотные каллусы менее дифференцированы и содержат много крупных вакуолизированных клеток. Существует разница между этими типами каллусов в упаковке клеток: плотные каллусы состоят из тесно упакованных клеток. Обнаружены различия в химическом составе: у плотных каллусов общее количество полисахаридов клеточной стенки выше, но снижен процент целлюлозы по

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

сравнению с пектиновыми веществами и гемицеллюлозами. Каллусные культуры также различаются по морфологии и степени гетерогенности клеточной популяции, по морфогенетическим и биосинтетическим потенциалам.

Технология получения каллуса. Выбранный эксплантант представляет вырезанные маленькие кусочки (2–4 мм) растительной ткани, которые находятся в подходящем биологическом состоянии (они молоды, здоровы), что необходимо для получения каллусных культур. Этот растительный материал тщательно моют, стерилизуют гипохлоридом натрия, 96 % спиртом или 0,1% раствором ртути (II) хлорида, затем тщательно промывают водой очищенной и помещают на синтетическую агаризованную питательную среду. Сосуды закрывают ватно-марлевыми тампонами. Конечно, при этом необходимо соблюдать строгие правила антисептики (работают только в боксах). Для образования каллуса и роста ткани сосуды переносят в темное помещение, где строго поддерживают определенный режим. Это касается температуры и влажности. Известно, что для большинства культур эти параметры таковы: температура 24–26°C, а влажность 65–70 %. Через 2-3 недели на раневой поверхности образуется первичный каллус.

Культура клеточных суспензий

Растительные суспензионные культуры состоят из одиночных клеток и клеточных агрегатов, растущих в аэрируемой жидкой питательной среде определенного состава.

Выращивание клеточных суспензий в жидкой питательной среде имеет ряд преимуществ перед выращиванием каллусных тканей поверхностным способом. В этом случае легче и более эффективно влиять на метаболизм и рост клеточных популяций экзогенными факторами. Этот способ более удобен при проведении биохимических и молекулярно-биологических экспериментов.

Клеточную суспензию получают, помещая каллусную ткань в колбу с жидкой питательной средой. Суспензию перемешивают в колбах на качалке или в специальных сосудах с помощью роллеров разного типа. Для инициации суспензионной культуры необходимо 2–3 г сырой массы каллусной ткани на 60–100 мл жидкой питательной среды. Первичную суспензию получают на качалках, имеющих скорость перемешивания 60–120 об/мин.

Глава 14. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Суспензионную культуру можно получить и из фрагмента органа растения, однако этот путь более трудоемкий и требует большего времени. Клетки экспланта должны при этом образовать первичный каллус, затем поверхностные каллусные клетки, попавшие в жидкую среду и размножившиеся в ней, дадут начало линии, способной расти в суспензии.

Клональное микроразмножение и его практическое применение

Культура органов растений (микрклональное размножение) позволяет получить достаточно большое количество новых растений. Используется для массового размножения растений, оздоровления посадочного материала (в т.ч. лекарственных растений), получения элитного и суперэлитного посадочного материала, в т.ч. новых сортов лекарственных растений. Важное условие – идентичность полученного растительного материала исходному растению. Для этого берут молодые, слабо дифференцированные ткани (например, кончики молодых стеблей, корней, пазушные почки, зародыши, части молодых проростков). При этом данные части практически лишены вирусов, что позволяет получить безвирусные клоны.

Пути микрклонального размножения:

Прямая регенерация – получение растений *in vitro* непосредственно из верхушечных побегов или пазушных почек.

Косвенная регенерация – получение целых растений из меристематических тканей, но с промежуточной стадией каллуса. Выросшее растение переносят в грунт.

Это свойство основано на тотипотентности, поэтому его можно отнести к способам клонирования растений. Метод был успешно применен в 1960 году *Ж. Морелем*.

Методы клонального размножения растений:

- Активация пазушных меристем.
- Образование адвентивных (придаточных) побегов тканями экспланта.
- Возникновение адвентивных побегов в каллусе.
- Индукция соматического эмбриогенеза в клетках экспланта.
- Соматический эмбриогенез в каллусной ткани.
- Формирование придаточных эмбриоидов в ткани первичных соматических зародышей (деление первичных эмбриоидов).

Микрклональное размножение в сравнение с обычным (черенками, луковичками и т.п.) обладает более высоким коэффициентом размножения.

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

Позволяет получить тысячи растений в течение более короткого промежутка времени.

Процесс клонального микроразмножения можно разделить на четыре этапа:

- 1) выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры;
- 2) собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества клонов;
- 3) укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям, а при необходимости депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре (2°, 10°C);
- 4) выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадке в поле.

Культура ткани женьшеня (*Panax ginseng* С.А.Мей)

Культура ткани женьшеня является продуцентом тритерпеновых сапонинов – панаксозидов. Сухая биомасса женьшеня является сырьем для получения средств, обладающих адаптогенным, стимулирующим и тонизирующим действиями. Производственным штаммом для получения биомассы женьшеня является штамм «Биоженьшень» ткани *Panax ginseng* С.А. Мейер. Параметры и условия культивирования штамма «Биоженьшень» следующие:

- Способ культивирования – поверхностное выращивание каллусной ткани на агаризованной питательной среде в накопительном режиме, затем глубинное культивирование.
- Тип роста – динамический, S-образного характера.
- Режим пересева – 30–35 суток.
- Время культивирования – 38–40 суток.
- Масса **инокулюма** (часть каллусной культуры, используемая для пересадки в свежую среду) – 2,0–2,5 г сырой ткани на сосуд.
- Кратность посева – 1 к 5–6.
- Температура культивирования – 25°C.
- Выход сухой биомассы – 20–25 г/л.
- Содержание суммарной гликозидной фракции в сухой биомассе – не менее 1,5 %.

14.4 Применение в медицине лекарственных средств, полученных из культур растительных клеток

В результате разработки технологий, позволяющих осуществлять направленный синтез БАВ путем создания оптимальных условий и методов культивирования, получают так называемые штаммы-суперпродуценты. В них содержание БАВ в несколько раз выше, чем в исходных органах растения.

В длительно пересаживаемой культуре клетки могут сохранять или наоборот утрачивать способность к синтезу характерных для растения БАВ. Это объясняется тем, что в популяции непрерывно растущих культур, даже полученных от одиночных клеток, идут сложные перестройки генома. Это может привести к тому, что популяция очень скоро становится гетерогенной по способности индивидуальных клеток к синтезу БАВ. На изменчивости клеток в культуре *in vitro* основана селекция штаммов-продуцентов. Ее можно проводить различными методами. Опыт селекционной работы с культурами продуцентами показал, что наиболее эффективным является комплексное использование мутагенов, селективных сред и высокоэффективных способов отбора. Так, обработка каллусных клеток раувольфии змеиной этиленамином позволила получить клеточную линию с высоким содержанием алкалоида аймалина. А дальнейшая оптимизация условий выращивания с применением селективного отбора привела к получению промышленного штамма-суперпродуцента с увеличением продуктивности по аймалину в 10 раз по сравнению с растением.

Важным условием промышленного использования культур тканей является их стабильность, гарантирующая стандартность биомассы как лекарственного сырья.

Поэтому на всех этапах культивирования штаммов-продуцентов необходимым является регулярный поддерживающий отбор высокопродуктивного посевного материала. В настоящее время разработана следующая технология культур-продуцентов с целью получения биомассы – сырья для выделения БАВ:

- получение высокопродуктивных и стабильных клеточных линий и штаммов;
- оптимизация условий поддержания культур в коллекции и последующего выращивания штаммов-продуцентов: состав

Часть 2. Частные вопросы биотехнологии. Клеточная биотехнология

питательной среды, температурный режим выращивания, аэрация, освещенность, длительность культивирования и т.п.;

- разработка метода культивирования штаммов-продуцентов;
- разработка крупномасштабного выращивания штаммов-продуцентов с целью наработки биомассы.

В настоящее время около ста видов растений выращивают *in vitro* с целью получения фармакологически важных веществ, среди них белладонна, паслен дольчатый, дурман обыкновенный, ландыш майский, агава, амми зубная, родиола розовая, мак снотворный и др. Наиболее крупномасштабными технологиями являются культивирование тканей воробейника для получения красящегося вещества щиконина, обладающего бактерицидным действием; табака – продуцента убихинона-10, природного антиоксиданта; женьшеня – сырья для получения настойки, применяемой в качестве лекарственного средства; раувольфии змеиной – сырья для выделения алкалоидов, обладающих антиаритмическим и гипотензивным действиями.

В РБ зарегистрированы лекарственные средства, получаемые из клеточных культур, из нескольких фармакотерапевтических групп.

Противоопухолевые препараты на основе алкалоидов растительного происхождения:

Винорелбин (Vinorelbine) РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь – алкалоид, получаемый из барвинка розового полусинтетическим путем;

Винкристин-Белмед (Vincristine) РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь – алкалоид, получаемый из барвинка розового;

Этопозид (Etoposide) «Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Германия; ООО «Верофарм», Российская Федерация; «EBEWE Pharma Ges.m.b.H.Nfg.KG.», Австрия – полусинтетическое производное подофиллотоксина;

Паклитаксел (Paclitaxel) РУП «Белмедпрепараты, Республика Беларусь»; «Махpharma Baltija UAB», Литовская Республика; «Fresenius Kabi Deutschland GmbH», Германия и Доцетаксел (Docetaxel) РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь; «Fresenius Kabi Deutschland GmbH», Германия – противоопухолевые вещества растительного происхождения, получаемые полусинтетическим путем.

На основе культуры изолированных клеток женьшеня разработаны общетонизирующие средства – настойки «Биоженьшень» и «Панаксел» (ГП «Киришский биохимический завод», Россия). Из различных видов

Глава 14. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

барбариса, а также василисника малого получены суспензионные клеточные культуры, которые продуцируют 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 антибиотикорезистентных микроорганизмов, многих патогенных бактерий, а также грибов. На основе водно-спиртового экстракта из биомассы клеток полисциаса папоротниколистного разработано общеукрепляющее и тонизирующее средство «Витагмал» (ООО «Биофармос», Россия).

ЧАСТЬ III.
ЧАСТНЫЕ ВОПРОСЫ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ
БИОТЕХНОЛОГИИ.
МИКРОБНАЯ
БИОТЕХНОЛОГИЯ

Глава 15

Технология получения и стандартизация пробиотиков

Вопросы для самоподготовки

- 1. Нормальная микрофлора кишечника человека и ее функции.*
- 2. Технология получения основных пробиотиков.*
- 3. Стандартизация лекарственных средств на основе пробиотиков.*
- 4. Номенклатура лекарственных средств для восстановления нормофлоры.*

15.1 Нормальная микрофлора кишечника человека и ее функции

Микрофлора человека составляет основу его микроэкологии. Нормальную флору принято рассматривать как совокупность микробиоценозов различных частей тела, контактирующих с внешней средой.

К открытым полостям тела человека относят: носоглотку, верхние дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт, урогенитальную сферу. Поверхность открытых слизистых полостей чрезвычайно развита и оценивается в 400 м² (для сравнения поверхность кожи – 1,8 м²). Поскольку мы живем в нестерильном мире, то совершенно очевидно, что поверхность этих полостей, покрытая слизистой оболочкой, представляет собой идеальную среду для жизнедеятельности микроорганизмов, где каждый участок слизистой поверхности имеет свой, характерный только для него, состав микрофлоры.

Глава 15. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПРОБИОТИКОВ

Постепенно у взрослого человека в процессе жизни формируется и стабилизируется микрофлора различных участков слизистой, которая строго индивидуальна для каждого макроорганизма.

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.

Для здорового человека характерно состояние равновесия микроэкологии организма. 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. Поверхность слизистых полостей чрезвычайно развита и самой большой является поверхность желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

Микрофлора ЖКТ представлена большим разнообразием микроорганизмов. Ведущее место по своей численности среди других представителей бактериальной флоры занимают *молочнокислые бактерии* – *лактобактерии* и *бифидобактерии*. Молочнокислые бактерии (*Lactobacteriaceae*) представляют собой грамположительные бактерии: кокки или палочки, собранные в цепочки. Они характеризуются неподвижностью, являются анаэробами, не образуют спор.

Микрофлора ЖКТ также представлена:

- стафилококками;
- стрептококками;
- эшерихиями и бактероидами;
- клостридиями;
- дрожжеподобными грибами;
- условно-патогенными энтеробактериями.

В организме человека проживает 10^{14} – 10^{16} бактерий. Они составляют своеобразный *экстракорпоральный* (хорошо развитый, организованный)

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

орган. Этот орган, как и любой орган человека, имеет свои функции, критерии, показатели функционального состояния, т.е. показатели нормы и отклонения от нее.

Функции нормальной микрофлоры кишечника

Нормальная микрофлора кишечника выполняет и регулирует многие функции организма, которые можно сравнить с работой лаборатории, осуществляющей многие сотни биохимических процессов.

1. В процессе жизнедеятельности микроорганизмы образуют органические кислоты (преимущественно молочная и уксусная), лизоцим и другие антибиотикоподобные вещества (бактериоцины), обуславливающие *антагонистическую активность* бактерий, заселяющих ЖКТ, по отношению к патогенной и гнилостной микрофлоре, т.е. защищают организм от некоторых инфекций.

2. Важна *ферментообразующая роль* микрофлоры кишечника в процессах пищеварения. Бактериальные протеазы гидролизуют белки до аминокислот и пептидов. Одним из свойств микрофлоры является метаболизм азот- и углеродсодержащих соединений за счет микробных ферментов. Она также участвует в деградации липидов и в их синтезе, принимает участие в рециркуляции желчных кислот.

3. Лакто- и бифидобактерии, а также эшерихии выполняют *витаминобразующую функцию* – синтезируют витамины группы В (тиамин, биотин, витамин В₁₂), фолиевую и никотиновую кислоты. Кроме того, они способствуют синтезу незаменимых аминокислот (изолейцин, треонин, метионин, лизин, аргинин, гистидин).

4. Нормофлора кишечника играет важную роль *в формировании и функционировании иммунной системы*. Бифидобактерии стимулируют синтез антител, лактобактерии повышают образование фагоцитов и лимфоцитов.

5. Анаэробные бактерии *вырабатывают биологически активные вещества*, такие как (β-аланин, 5-аминовалериановая и γ-аминомасляная кислоты), влияющие на функции печени, сердечно-сосудистой системы, кроветворение и обменные процессы.

6. Как *«естественный биосорбент»* нормальная микрофлора способна аккумулировать значительное количество различных токсических продуктов, включая металлы, фенолы, яды растительного и микробного происхождения, другие ксенобиотики.

Глава 15. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПРОБИОТИКОВ

Причины возникновения дисбактериоза

Для здорового человека характерно состояние равновесия микроэкологии организма. В случае нарушения равновесия между отдельными видами микроорганизмов в местах их постоянного обитания за счет более интенсивного размножения или гибели какого-либо вида может произойти нарушение гомеостаза с соответствующими последствиями патологического характера.

Изменение качественного и количественного состава нормофлоры человека приводят к дисбиотическому состоянию или к *дисбактериозу*. Установлено, что около 90% населения нашей страны в той или иной мере страдает дисбактериозами, то есть микроэкологическими нарушениями.

В последнее время резко возросло потребление *антибиотиков, сульфаниламидов и других противомикробных лекарственных средств*. Это является одной из основных причин развития дисбактериоза. Антибиотикотерапия сопровождается дисбактериозом в 90% случаев и диареей в 30 % случаев. Другой основной причиной развития дисбактериоза является *стресс*. Группу риска составляют люди, находящиеся в состоянии постоянного напряжения – летчики, моряки, бизнесмены, спортсмены, врачи-хирурги, журналисты, а также жители экологически неблагоприятных территорий и пожилые люди.

К развитию дисбактериоза приводит также *лучевая терапия, применение гормонов, химиотерапия, иммунодефицитные состояния, аллергия, воспалительные заболевания ЖКТ (энтериты, колиты, гастриты и т. д.)*. Ухудшение экологической обстановки, низкое качество воды, неполноценное и несбалансированное питание также могут стать причиной дисбактериоза.

В профилактике и лечении дисбактериозов показано применение лекарственных средств нормальной микрофлоры кишечника, то есть *пробиотиков* (или эубиотиков).

Термин пробиотики впервые введен в научную литературу в 1965 году учеными *Lilly* и *Stillwell* для обозначения соединений микробного происхождения, которые в отличие от антибиотиков не убивали, а стимулировали рост микроорганизмов.

В историческом плане бактериальные средства, содержащие жизнеспособные микроорганизмы в качестве терапевтического средства

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

впервые были предложены основоположником отечественной микробиологии *И.И. Мечниковым*.

И.И. Мечников, занимаясь проблемой старости у людей, считал, что молочная кислота и другие продукты обмена молочнокислых бактерий, содержащиеся в молочнокислых продуктах, подавляют гнилостную микрофлору кишечника и тем самым предотвращают старение организма. За комплекс этих работ он получил Нобелевскую премию в 1908 году.

Во многих странах для лечебного питания используют различные молочнокислые продукты. Это кефир, ацидофилин, простокваша, ряженка, варенец, йогурты и многие другие. Достаточно сказать, что только в Беларуси производится до 30 видов разнообразных молочнокислых продуктов. Для их получения используют молочнокислые бактерии: *Lactobacillus acidophilus* (ацидофилин); *L. casei* и *Saccharomyces kefir* (кефир).

Микрофлора йогурта – смешанная, но в нем доминирует болгарская палочка (*L. bulgaricus*). Изготавливают молочнокислые продукты, добавляя в простерилизованное молоко (120°C – 15 мин) чистую посевную культуру, выдерживают в течение 24–48 часов при температуре 24–26°C (или 35–37°C) до получения продукта требуемой кислотности.

Следует отметить, что молочнокислые продукты – это продукты диетического, профилактического питания. Многочисленные опыты отечественных и зарубежных исследователей показали, что молочнокислые бактерии, введенные в организм с молочнокислыми продуктами, не обладают способностью приживаться в кишечнике и исчезают из него вскоре после того, как прекращается пребывание в нем, например, простокваши.

Идея *И.И. Мечникова* об использовании различных микроорганизмов для профилактики и терапии различных патологических состояний, связанных с нарушениями состава нормальной микрофлоры, стала успешно развиваться специалистами многих стран мира.

Начался поиск более эффективной штаммовой формулы средства. Так еще в довоенной Германии стали выпускать высушенную взвесь кишечной палочки, в капсулах из желатина, препарат «Мутафлор». Этот препарат выпускается до настоящего времени. Во Франции было выпущено лекарство «Лиобифидис», содержащее высушенные культуры бифидобактерий.

В основном лекарственные средства пробиотиков содержат различные штаммы кишечной палочки или бактерии молочнокислой

Глава 15. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПРОБИОТИКОВ

группы. Чаще всего это: *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricum*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* и др.

Широко известный всем «Линекс» содержит три вида молочнокислых бактерий – *Bifidobacterium bifidus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*.

Вместе с тем поиск штаммов бактерий – основы лекарственных средств – не ограничивается видами микроорганизмов, которые присутствуют в микробиоценозах человека.

Так, во Франции было разработано средство «Бактисубтил» – желатиновые капсулы с высушенной живой культурой *Bacillus subtilis*. В России лекарственное средство такого действия выпускается под названием «Бактиспорин» и «Споробактерин». Недавно фармацевтическим предприятием «Биолек» (Оренбург) выпущен живое бактериальное средство нового поколения «Споробактерин жидкий», который представляет собой взвесь биомассы бацилл *Bacillus subtilis* 534. Бациллы выделяют высокоэффективное антибиотическое вещество белковой природы, обладающее широким спектром действия, подавляющее рост патогенных и условно-патогенных бактерий. Культура *Bacillus subtilis* 534 продуцирует биологические активные вещества, ферменты, набор аминокислот. Они улучшают пищеварение, обладают антиаллергическими свойствами, стимулируют защитные силы организма.

В России создан сухой бактериальный концентрат «Витафлор» (форма выпуска – лиофилизат во флаконах и в сублингвальных таблетках живых клеток симбиотической биокультуры *Lactobacillus acidophilus*). Витафлор принципиально отличается от известных пробиотиков на бактериальной основе. Обычно пробиотики имеют в качестве лекарственной субстанции либо один бактериальный штамм, либо механическую композицию нескольких штаммов. В отличие от известных препаратов, «Витафлор» сконструирован на основе симбиотической системы двух штаммов.

Разработка бактериальных средств и их новых лекарственных форм продолжается и в настоящее время, несмотря на то, что рынок таких препаратов достаточно представлен.

Начиная с 1960 года на территории бывшего СССР производятся:

- колибактерин (штамм *E. coli* штамм М-17);
- бифидобактерин (штаммы *Bifidobacterium bifidum*);
- бификол (смесь *E. coli* и *Bifidobacterium bifidum*);

- *лактобактерин* (штаммы *Lactobacterhim plantarum* и *L. fermentum*).

Перечислить все имеющиеся на фармацевтическом рынке средства невозможно, так как номенклатура их постоянно увеличивается. Появляются новые лекарственные формы – в капсулах, свечах, жидком эмульсионном состоянии, в виде драже и т.д.

15.2 Технология получения основных пробиотиков

Все пробиотики получают по схожим технологиям. Различия состоят лишь в виде используемого микроорганизма и составе питательной среды. Технологию получения пробиотиков рассмотрим на примере лактобактерина.

Для получения лактобактерина используют два штамма *Lactobacillus fermentum* и два штамма *L. plantarum*. Представляют собой грамположительные палочки, длиной 0,7–3,0 мкм, растут в среде углекислого газа, азота и кислорода. По потребности в питательных веществах молочнокислые бактерии относятся к наиболее сложным микроорганизмам.

Из соединений *углерода* они могут использовать незначительное количество веществ, служащих бактериям источником питания и энергии. Это моно- и дисахариды, *глюкоза* или *лактоза*.

Молочнокислые бактерии нуждаются в *сложных органических соединениях азота*. Они растут на средах с подобранными смесями аминокислот, ферментативными или кислотными гидролизатами белков печени, казеина и молока.

Большинству бактерий необходимы цистеин, *триптофан*, реже – глутаминовая кислота.

Также молочнокислые бактерии нуждаются в *витаминах*. Этим объясняется влияние на их рост добавок к средам: растительных экстрактов, дрожжевого автолизата и других витаминсодержащих соединений.

Для промышленного культивирования лактобацилл используют питательную среду МРС-1 (Мозера-Рогозы-Шарма-1).

Она имеет следующий состав: глюкоза; гидролизат коровьего молока; печеночный экстракт; гидролизат казеина; дрожжевой автолизат; пептон; цистеин; $MnSO_4$; $MgSO_4$; KH_2PO_4 ; Твин-80.

Глава 15. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПРОБИОТИКОВ

Приготовление полупродуктов (гидролизата коровьего молока, печеночного экстракта, гидролизата казеина, дрожжевого автолизата) *ведется по отработанным методикам*, гарантирующим переход питательных веществ, содержащихся в сырье, в состояние, наиболее доступное для потребления микроорганизмами.

Все перечисленные компоненты смешивают в определенной последовательности и стерилизуют.

Для получения маточной культуры микроорганизмов делают 6 последовательных пассажей (пробирки → чашки Петри → флаконы → бутылки). Культивирование осуществляют в течение 9 суток.

Выращивание молочнокислых бактерий проводят в ферментаторе при температуре 35–37°C в течение 8–12 часов в среде МРС-1. Периодически, через каждые 1,5–2 часа, культуральную жидкость перемешивают для равномерного распределения клеток в объеме среды. Ферментацию проводят в анаэробных условиях, в аппарат подают *азот* для создания инертной атмосферы, необходимой для развития лактобактерий.

Необходимым условием массового производства пробиотиков является сохранение их стабильности в течение длительного времени.

Бактерийные средства, 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 молочнокислых бактерий используют сублимационную (лиофильную) сушку, которая проводится в условиях низкой температуры и глубокого вакуума. Лиофильная сушка осуществляется после розлива в ампулы.

К факторам, влияющим на выживаемость микроорганизмов в средствах сухих пробиотиков при хранении, относят наличие защитных сред.

В связи с этим микробная суспензия после стадии ферментации смешивается с защитной средой, которая представляет собой смесь желатина, сахарозы, молока, натрия цитрата и воды. Культуральная жидкость лактобактерий, смешанная с защитной средой, поступает на стадию розлива в ампулы или флаконы.

В качестве защитных сред также используют:

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

- сахарозо-желатозную среду (сахароза – 5 %, желатин 1–1,5 %);
- обрат молока (5–10 %)
- сахарозо-желатозно-молочную среду (сахароза – 5 %, желатин пищевой – 3 %, обрат молока 5-10 %).

Биохимические процессы, протекающие при культивировании молочнокислых бактерий

Молочнокислые бактерии делятся на две большие группы: гомоферментативные (лактобактерии) и гетероферментативные (бифидобактерии), которые, в свою очередь, могут быть облигатными и факультативными.

Гомоферментативные бактерии (*S. lactis*, *S. cremoris*, *L. casei*, *L. lactus* и т.д.) – в результате брожения образуют из глюкозы в основном молочную кислоту:

глюкоза → глюкозо-6-фосфат → фруктозо-1,6-дифосфат →

фосфоенолпируват → пировиноградная кислота → молочная
кислота

У этих микроорганизмов *расщепление глюкозы идет по гликолитическому пути* (ФДФ-пути) с образованием пирувата.

Бактерии располагают для этого всеми необходимыми ферментами, включая альдолазу. Затем благодаря наличию у них фермента лактатдегидрогеназы ПВК превращается в молочную кислоту.

У гетероферментативных молочнокислых бактерий (*S. citrovorus*, *S. acetonicus*, *S. faecalis*, *S. bovis*) отсутствуют основные ферменты ФДФ-пути (альдолаза и триозофосфатизомераза).

Начальное расщепление у них глюкозы происходит исключительно по пентозо-фосфатному пути (ПФ-пути), то есть через глюкозо-6-фосфат и рибулозо-5-фосфат, из которого в последующем синтезируется молочная кислота. Наряду с молочной кислотой образуется уксусная кислота и этанол:

глюкоза → глюкозо-6-фосфат

глицеральдегид-3-фосфат → пировиноградная кислота

Глава 15. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПРОБИОТИКОВ

молочная кислота → уксусная кислота → этанол

Наряду с ними образуется глицерин, а также диацетил и ацетилметилкарбинол – ароматические вещества, придающие определенный аромат кисломолочным продуктам и сливочному маслу.

15.3 Стандартизация лекарственных средств на основе пробиотиков

Стандартизация пробиотиков проводится по следующим показателям:

Описание, упаковка, маркировка в соответствии с требованиями фармакопейной статьи производителя.

Идентификация: проводится микроскопическое исследование с последующим подтверждением вида микроорганизма по биохимическим и культуральным свойствам.

Лекарственные средства на основе пробиотиков должны иметь определенный рН. рН контролируют потенциметрически. Лиофильные формы проверяются на содержание влаги (потеря в массе при высушивании), растворимость.

Обязательно контролируется микробиологическая чистота.

Проверяется загрязненность другими микроорганизмами, в т.ч. патогенными. Для этого готовят мазки и окрашивают их по Граму. Должны быть только грамположительные палочки, расположенные в коротких цепочках или беспорядочно. Либо проводят посев на среду Сабуро, агар Эндо или мясопептонный агар и культивируют при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 8, 2 и 8 суток соответственно. Не должно быть роста микроорганизмов.

Также проводится тест на специфическую безопасность. Для этого 5 белым мышам обоего пола массой 14–16 г вводят перорально по 0,5 мл суспензии, полученной путем растворения одной дозы в изотоническом растворе натрия хлорида. Наблюдают в течение 5 суток и фиксируют изменение массы мышей. В случае гибели хотя бы одной мыши или при снижении групповой массы после проведения испытания (в сравнении с исходной групповой массой), испытание повторяют на удвоенном количестве животных.

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

Испытание на специфическую активность лактобактерий можно проводить двумя способами. Во-первых, по количеству жизнеспособных бактерий в 1 дозе. Во-вторых, по способности к кислотообразованию (титриметрически).

Первое испытание. Суспензию, полученную из одной дозы, разводят и получают серию разведений. Высевают на среду МРС-4. Культивируют 40–48 ч при $37\pm 1^\circ\text{C}$. Производят подсчет колоний и расчет содержания живых бактерий в одной дозе.

Второе испытание. Содержимое разводят средой МРС-4 и инкубируют при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 48 ч. Затем титруют содержимое 0,1 М натрия гидроксидом в присутствии фенолфталеина до стойкого слабо розового окрашивания.

Расчет ведут по формуле:

$$^{\circ}\text{T} = \text{A} \times \text{K} \times 10,$$

где $^{\circ}\text{T}$ – условная величина, выраженная в градусах Тернера;

A – количество миллилитров раствора натрия гидроксида в концентрации 0,1 моль/л, пошедшего на титрование 10 мл исследуемой суспензии;

K – поправка к титру раствора натрия гидроксида.

Дополнительно проверяют состав компонентов среды высушивания для лиофилизированных лекарственных форм.

15.4 Номенклатура лекарственных средств для восстановления нормофлоры

Последние годы характеризуются бурным увеличением количества пробиотиков за счет как модернизации и улучшения свойств старых лекарственных средств, 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:

I. *Монокомпонентные.*

1) бифидосодержащие:

- Бифидумбактерин (*Bifidobacterium bifidum*);
- Биовестин (*B. adolescentis*);

Глава 15. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПРОБИОТИКОВ

- Профибор (*B. bifidum*);
- 2) лактосодержащие:
 - Лактобактерин в порошке, Ацилакт, Биобактон (*Lactobacterium acidophilus*);
 - Концентрат «Наринэ» (*L. acidophilus* лиофилизированные в культуральной среде);
 - Гастрофарм (*L. bulgaricus*);
- 3) содержащие апатогенных представителей рода *Bacillus*:
 - Бактисубтил, Флонивин БС (*Bacillus cereus*);
 - Споробактерин сухой (*Bacillus subtilis*);
- 4) содержащие колибактерии:
 - Колибактерин сухой (*Escherichia coli*);
 - Биофлор (*E. coli* и компоненты культуральной среды);
- 5) содержащие дрожжи:
 - Энтерол 250 (*Saccharomyces boulardii*).

II. Поликомпонентные.

- Бифилонг (*Bifidobacterium bifidum et longum*);
- Аципол сухой (*Lactobacterium acidophilus, Saccharomyces kefir*);
- Биоспорин (*Bacillus subtilis et licheniformis*);
- Линекс (*Lactobacterium acidophilus, Bifidobacterium bifidum, Enterococcus faecium*);
- Бифидлакт экстра (*Bifidobacterium bifidum, Lactobacterium acidophilus*);
- Бификол (*Bifidobacterium bifidum, Escherichia coli*);
- Бифиформ (*Bifidobacterium longum, Enterococcus faecium*).

III. Комбинированные.

- Кипацид (*Lactobacterium acidophilus* и лизоцим);
- Бифидиз (*Bifidobacterium bifidum* и лизоцим).

IV. Имобилизованные на сорбенте бактерии.

Бифидумбактерин форте (*Bifidobacterium bifidum* на сорбенте из косточкового активированного угля).

Характеристика основных пробиотиков

Бифидо- и лактосодержащие пищевые продукты – бифилакт, бифидок и др.

Бактисубтил (Bactisubtile) – ЛС 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. Препятствует нарушению синтеза в кишечнике витаминов группы В и Р. Форма выпуска – капсулы.

Бифидумбактерин в порошке (Bifidum bacteriujn in pulveris) представляет собой лиофилизированную микробную массу живых антагонистически активных штаммов *Bifidobacterium bifidum*. Обладает антибактериальной активностью в отношении широкого спектра патогенных и условно-патогенных бактерий, восстанавливает микрофлору кишечника, 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 (Bifllys) 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 (Lactobacterinum in pulvis) – сухая микробная масса живых антагонистически активных двух штаммов *Lactobacterium acidophilus*. Форма выпуска – ампулы.

Глава 15. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПРОБИОТИКОВ

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.

Колибактерин сухой – лиофилизированная микробная масса живых бактерий *E. coli*. Применяется для лечения детей и взрослых, страдающих хроническим колитом. Форма выпуска – флаконы, ампулы и таблетки.

Споровактерин 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 средств. *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. Выпускается в виде порошка кремового цвета, кисло-молочного вкуса, во флаконах и пакетах.

Характеристика основных пребиотиков

Кроме пробиотиков выпускают и *пребиотики*. Это пищевые добавки, содержащие различные вещества или продукты жизнедеятельности микроорганизмов, селективно стимулирующие рост и размножение собственной микрофлоры кишечника.

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

Чаще всего это ди- или олигосахариды – например, *лактулоза* — *синтетический дисахарид* или *фруктозилолигосахарид*. Эти вещества не разрушаются в организме человека, имеют сладкий вкус, безвредны.

Например, пребиотик «ЖКТ-транзит», выпускаемый фармацевтической компанией «Эвалар» в виде саше, содержит олигофруктозиды, инулин, полисахарид из смолы акации, экстракт зеленого чая, экстракт артишока. Пребиотик «Хилак-форте» представляет собой концентрат метаболитов нескольких микроорганизмов (*E. coli*, *Streptococcus faecalis*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*).

Лактулоза (Lactulose) – синтетический дисахарид. Под влиянием средства 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. Ингибитор фибринолиза.

Лизоцим (Lysocim) – мукополисахаридаза, фермент белковой природы. Оказывает бактериолитическое действие, разрушает полисахариды микробной клетки, подавляет рост грамположительных бактерий, стимулирует неспецифическую реактивность организма, оказывает противовоспалительное и муколитическое действие.

Нормофлор – кишечный фитосорбент (корни аира, трава зверобоя, кипрея, лист подорожника, трава пустырника, яблочный пектинат).

В последнее время стали выпускать *синбиотики*. Это комплекс пробиотиков с пребиотическими веществами с целью создания новых лекарственных средств, в которых живые микроорганизмы сочетаются с субстратами, стимулирующими их рост. В составе таких средств пребиотик должен, не включаясь в метаболизм микроорганизмов, служить стартовым компонентом роста пробиотика.

Глава 16

Технология получения и стандартизация витаминов

Вопросы для самоподготовки

- 1. Классификация витаминов. Витамины, получаемые методами микробиологического синтеза.*
- 2. Технология получения, выделение и стандартизация витамина В₁₂.*
- 3. Технология получения и стандартизация витамина В₂.*
- 4. Номенклатура лекарственных средств витаминов, представленных на фармацевтическом рынке РФ.*

16.1 Классификация витаминов. Витамины, получаемые методами микробиологического синтеза

Среди биологически активных веществ, необходимых для нормального развития живого организма, одно из первых мест занимают низкомолекулярные органические соединения - витамины. Важное значение витаминов объясняется тем, что они в качестве активных групп входят в состав каталитических центров ферментов, которые служат катализаторами многих обменных процессов. Например, в состав протетической группы кокарбоксилазы входит тиамин (В₁), коэнзимом ряда окислительно-восстановительных ферментов является рибофлавин (В₂), в реакциях переаминирования принимает участие пиридоксин (В₆).

Установлено, что организм человека и животных не способен к синтезу витаминов, тогда как растения при нормальных условиях развития полностью обеспечивают себя всеми витаминами (кроме В₁₂). Человек удовлетворяет потребности в витаминах за счет поступления их с пищей или за счет их синтеза микрофлорой желудочно-кишечного тракта.

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

Недостаток витаминов человек восполняет путем приема комплекса витаминов, которые выпускаются в различном сочетании. В мире существует 40 крупных промышленных производителей витаминов. Ведущее место среди них занимает швейцарский концерн Hoffman La Roche, выпускающий 50-70 % всех витаминов.

Классификация витаминов

Наиболее распространенным способом классификации витаминов является их разделение на водо- и жирорастворимые. Однако, существуют и другие способы классификации: по химическому строению, по фармакологической активности, буквенная классификация и т.д.

I. Жирорастворимые:

- 1) Витамин А (антиксерфталмический); ретинол; β -каротин;
- 2) Витамин D (антирахитический); кальциферолы;
- 3) Витамин Е (антистерильный); токоферолы;
- 4) Витамин К (антигеморрагический); нафтохиноны.

II. Водорастворимые:

- 1) Витамин В₁ (антиневритный); тиамин;
- 2) Витамин В₂ (витамин роста); рибофлавин;
- 3) Витамин В₆ (антидерматитный); пиридоксин;
- 4) Витамин В₁₂ (антианемический); цианокобаламин;
- 5) Витамин РР (антипеллагрический, ниацин); никотинамид;
- 6) Витамин В_с (антианемический); фолиевая кислота;
- 7) Витамин В₃ (антидерматитный); пантотеновая кислота;
- 8) Витамин Н (антисеборейный); биотин;
- 9) Витамин С (антискорбутный); аскорбиновая кислота;
- 10) Витамин Р (капилляроукрепляющий); рутин.

III. Витаминоподобные вещества:

холин, липоевая кислота, витамин В₁₅ (пангамовая кислота), оротовая кислота, инозит, убихинон, парааминобензойная кислота, карнитин, линолевая и леноленовая кислоты, витамин U (противоязвенный фактор).

Микробиологическим способом можно получить практически все витамины, но экономически более выгодно их выделять из природных источников или синтезировать химическим путем. Тем не менее, получать

Глава 16. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ВИТАМИНОВ

сложные по строению витамины проще при помощи микроорганизмов. Это витамины В₂, В₁₂, D₂, β-каротин, биотин.

В медицинской практике в качестве самостоятельного лекарственного средства применяется *витамин В₁₂* (цианокобаламин), который в свободном состоянии и в составе коферментов обеспечивает кроветворную функцию организма, а именно созревание эритроцитов. Витамин В₁₂ является эффективным противоанемическим препаратом. Его применяют для лечения злокачественного малокровия, железодефицитных анемий, также его назначают при лечении лучевой болезни, заболеваниях печени, болезни Дауна, детском церебральном параличе.

Для медицинских целей субстанцию витамина В₁₂ получают в виде кристаллического темно-красного порошка, содержащего не менее 99% основного вещества.

Эту субстанцию используют для получения различных лекарственных форм, из которых наиболее широкое применение находит цианокобаламин в изотоническом растворе хлорида натрия для инъекций и таблетки, содержащие цианокобаламин и фолиевую кислоту.

16.2 Технология получения, выделение и стандартизация витамина В₁₂

Витамин В₁₂ - первое органометаллическое соединение, выделенное из биологической системы. Из органических соединений он имеет наиболее сложное строение. Его сложная формула (структура) была расшифрована в 1955 году. Молекула витамина В₁₂ состоит из двух частей:

- *кобальтосодержащей* (порфириноподобной);
- *нуклеотидной*, содержащей 5,6-диметилбензимидазол.

Характерной особенностью *кобальтосодержащей* (порфириноподобной) части является наличие атома кобальта и цианогруппы (R-CN). Эта часть молекулы витамина В₁₂ состоит также из четырех *азотистых гетероциклов типа пиррола*, к которым присоединены одинаковые заместители: *амиды уксусной и пропионовой кислот*.

Особенности микробиологического синтеза витаминов на примере витамина В₁₂

В природе витамин В₁₂ синтезируют многие микроорганизмы: уксуснокислые и пропионовокислые бактерии, метаногенные бактерии,

грибы. Промышленное значение имеют представители рода *Propionibacterium*, природные штаммы которого образуют 5-8,5 мг/л цианокобаламина, а полученный искусственный мутант *P. shermanii* способен накапливать до 58 мг/л витамина В₁₂. Также в промышленности используют штаммы *Pseudomonas denitrificans*.

Атом кобальта в структуре цианокобаламина имеет два лиганда — верхний и нижний. Верхним лигандом является цианогруппа (рисунок 16.1).

Нижний лиганд кобальта представлен нуклеотидным ядром, состоящим из нуклеотидного основания 5,6-диметилбензимидазола (5,6-ДМБ), связанного с рибозой гликозидной связью. Нуклеотидное ядро соединяется с кобальтом через азот основания, а с корриновым кольцом через аминокпропанольный мостик. Наряду с витамином В₁₂ могут образовываться его производные. Они характеризуются тем, что в нуклеотидной части молекулы вместо 5,6-ДМБ содержится аденин или метиладенин или их производные. Они не обладают биологической активностью для человека и животных и, следовательно, являются псевдовитаминами.

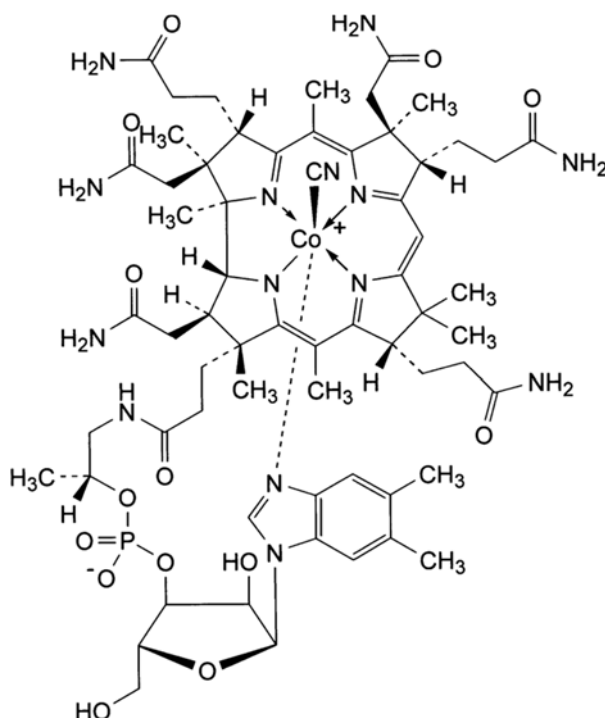


Рисунок 16.1 – Химическая формула цианокобаламина

Производство витамина В₁₂ основано, главным образом, на культивировании пропионовокислых бактерий. В качестве продуцента витамина В₁₂ используют *Propionibacterium shermanii*. Преимущество получения витамина В₁₂ пропионовокислыми бактериями заключается в

Глава 16. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ВИТАМИНОВ

том, что они синтезируют исключительно истинный витамин В₁₂ (до 58 мг/л).

В качестве *источника углерода* в составе питательной среды *используют глюкозу*. Установлено, что концентрация глюкозы в процессе выращивания бактерий должна поддерживаться на уровне 1,0–1,5%, что осуществляется путем постоянной подачи стерильного 40% раствора глюкозы на протяжении всего процесса ферментации.

Важное значение имеет азотное питание. В качестве источника органического азота в состав среды вводят кукурузный экстракт в концентрации 2 %.

Также в состав среды вводят неорганический источник азота – (NH₄)₂SO₄. Установлено, что катион аммония принимает участие в реакциях амидирования уксусной и пропионовой кислот.

Существенное значение для синтеза витамина В₁₂ имеет определенная концентрация в среде солей Co²⁺. Поэтому дополнительно в состав среды вводят хлористый кобальт – CoCl₂. При этом необходимо учитывать, что соли кобальта относятся к довольно эффективным бактерицидным веществам. Поэтому концентрацию этой соли подбирают такую, чтобы она не тормозила рост продуцента, но стимулировала синтез витамина. Эта величина составляет около 0,0005 %.

Для биосинтеза витамина В₁₂ в состав питательной среды добавляют предшественник – 5,6-диметилбензимидазол (5,6-ДМБ), который входит в состав нуклеотидной части молекулы витамина. Наличие в среде этого соединения способствует направленному синтезу истинного витамина, понижая до минимума, или вовсе исключая наличие в микробной массе псевдоформ.

Культура *P. shermanii* в процессе ферментации образует аналоги витамина В₁₂ – так называемый *кофактор В* – витамин без нуклеотидной части или псевдовитамин, где нуклеотидная часть представлена аденином. Эта форма биологической активностью не обладает. Установлено, что лучшие результаты по накоплению истинного витамина В₁₂ наблюдали в том случае, если 5,6-ДМБ добавляли **на 4 сутки ферментации**, то есть за сутки до окончания процесса. За это время 5,6-ДМБ вытесняет все неактивные соединения, превращая псевдоформы в истинный витамин В₁₂.

Одной из существенных положительных сторон процесса ферментации витамина В₁₂ является *отсутствие аэрации*.

Показано, что наибольшее количество витамина В₁₂ образуется при культивировании бактерий в анаэробных условиях. В связи с этим первые 4

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

суток процесс ферментации ведут в строго анаэробных условиях, лишь перемешивая культуральную жидкость через каждые 12 часов (мешалку включают на 2–3 минуты). На последние сутки процесс ферментации уже ведут в аэробных условиях, так как включение нуклеотидной части в молекулу витамина происходит уже в присутствии кислорода.

Оптимальная температура для роста пропионовокислых бактерий и синтеза ими витамина В₁₂ является 28–30°C.

Технология выделения и очистки витамина В₁₂

Еще одной особенностью биосинтеза витамина В₁₂ является то, что его накопление происходит внутри клетки, поэтому выделение и очистка целевого продукта ведутся по следующей схеме:

- 1) отделение клеточной биомассы от культуральной жидкости путем центрифугирования;
- 2) кислотный гидролиз биомассы (HCl, до pH= 4,3–4,6, t=80–90°C);
- 3) сорбция витамина из гидролизата на карбоксильном катионите СГ-1 в динамических условиях (раствор подаётся сверху вниз) и десорбция аммиачно-боратным буферным раствором;
- 4) адсорбция витамина на активированном угле (очистка от примесей);
- 5) осаждение белком добавлением алюмокалиевых квасцов;
- 6) цианирование (обработка цианистым натрием при pH=6,0);
- 7) десорбция витамина с активированного угля изопропиловым спиртом при температуре 80°C и pH = 5,0–6,0;
- 8) упаривание изопропилового элюата (под вакуумом при температуре 70–80°C);
- 9) получение резорцинового комплекса;
- 10) разложение резорцинового комплекса горячей очищенной водой (при температуре 80°C);
- 11) кристаллизация и перекристаллизация витамина ацетоном;
- 12) сушка кристаллов витамина.

Выход продукта при таком способе очистки составляет 55% (с переработкой маточных растворов) от содержания его в биомассе. Данный способ выделения и очистки имеет ряд недостатков: низкий выход конечного продукта, использование нерегенерируемого дорогостоящего сырья разового использования (активированный уголь, резорцин), большой расход органических растворителей, использование ручного труда при многократной загрузке и выгрузке активированного угля и т.д.

Глава 16. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ВИТАМИНОВ

Для их устранения разработана технология выделения и очистки витамина В₁₂, позволяющая увеличить выход конечного продукта более чем на 20 % и улучшить качество лекарственных средств. Метод включает тонкую хроматографическую очистку витамина на минеральном молекулярном сорбенте типа «Силохром» или «Силикагель», с последующим концентрированием на органическом молекулярном сорбенте – «Полисорбе». Используемые сорбенты можно регенерировать.

Стандартизация витамина В₁₂

Описание. Субстанция витамина В₁₂ представляет собой игольчатые кристаллы темно-красного цвета, который обусловлен наличием в них кобальта. Витамин растворим в воде и полярных растворителях (например, 96% спирте), нерастворим в бензоле, хлороформе, диэтиловом (наркотическом) эфире, безводном ацетоне. Безводная субстанция очень гигроскопична.

Идентификация. Спектрофотометрия в УФ- и видимой областях. Максимумы поглощения при 278; 361 и 547–559 нм. Рассчитывают также отношения оптических плотностей.

Сопутствующие примеси определяют методом ВЭЖХ.

Количественное определение проводят спектрофотометрически. Для этого субстанцию растворяют в воде. Измеряют поглощение при длине волны 361 нм. Удельный показатель поглощения равен 207.

Более подробно методики контроля качества субстанции цианокобаламина описаны в соответствующей статье ГФ РБ II издания (07/2016:0547).

16.3 Технология получения и стандартизация витамина В₂

Название витамина В₂ (рибофлавин) происходит от сахара рибозы, входящего в состав молекулы витамина в виде многоатомного спирта Д-рибита (рисунок 16.2). Он широко распространен в природе и в значительных количествах синтезируется растениями, дрожжами, грибами, бактериями.

Животные, не синтезирующие этот витамин, должны получать его в составе комбикормов, поскольку при его дефиците в организме нарушаются процессы белкового обмена, замедляется рост. Лекарственные средства, содержащие рибофлавин (таблетки, раствор для инъекций), используют в

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

медицине для лечения ряда заболеваний (кожные болезни, заживление ран, заболевания глаз, нарушения со стороны ЖКТ, анемии, цирроз печени, диабет), а в животноводстве – в качестве добавки в корма, а также в пищевой промышленности как краситель. Микроорганизмы синтезируют рибофлавин и две его коферментные формы — флавинадениннуклеотид (ФАД) и флавинмононуклеотид (ФМН).

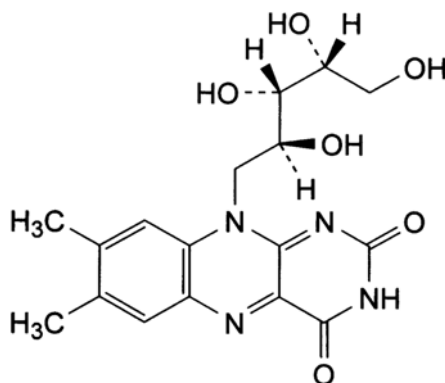


Рисунок 16.2 – Химическая формула рибофлавина

Технология получения витамина В₂

Продуцентами витамина В₂ являются:

- бактерии (*Brevibacterium ammoniagenes*, *Micrococcus glutamaticus*);
- дрожжи (*Pichia pastoris*);
- микроскопические грибы (*Ashbya gossypii*, *Eremothecium ashbyii*);
- плесневые грибы (*Aspergillus niger*);
- дрожжи (*Candida guilliermondii*, *C. flaveri*);
- актиномицеты (*Nocardia eritropolis*).

Промышленное получение рибофлавина осуществляют химическим, микробиологическим и комбинированным синтезом. В последнем случае синтезированная микроорганизмами рибоза химически трансформируется в В₂. Для медицинских целей микробиологический рибофлавин получают на основе гриба *Aspergillus*. Для высоких выходов витамина (до 7 г/л) используют усовершенствованные штаммы и оптимизированные среды, содержащие: кукурузный экстракт – 2,25 %; пептон – 3,5 %; соевое масло – 4,5 % и стимуляторы (пептоны, глицин). Используют активный инокулят, которым засевают стерильную среду. Ферментацию проводят в течение семи суток при 28°C и хорошей аэрации. Исходное значение pH составляет около 7,0, в ходе ферментации в связи с выделением кислот среда

Глава 16. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ВИТАМИНОВ

подкисляется до рН 4,0–4,5. После использования углеродного субстрата продуцент начинает утилизировать кислоты, рН повышается, и затем начинается образование витамина В₂. При этом кристаллы рибофлавина накапливаются в гифах и вне мицелия. На постферментационной стадии для выделения витамина мицелий нагревают в течение 1 ч при 120°С. Очистку проводят перекристаллизацией.

В ряде стран для получения кормовых препаратов витамина В₂ используют достаточно простой способ, основанный на выращивании микроскопического гриба *Eremothecium ashbyii* в глубинной культуре в течение 80–84 ч при 28–30°С на среде с глюкозой или мальтозой (2,5%), источником азота в виде NH₄NO₃ и карбонатом кальция (0,5%). Выход рибофлавина составляет 1250 мкг/мл. Культуральная жидкость концентрируется в вакуумном испарителе до содержания сухих веществ 30–40% и высушивается в распылительной сушилке. Товарная форма продукта – порошок с содержанием рибофлавина не менее 10 мг/г и 20% сырого протеина. В препарате присутствуют также никотиновая кислота и витамины В₁, В₃, В₆ и В₁₂.

При использовании штамма *Bacillus subtilis*, полученного генноинженерным методом, выход рибофлавина составляет 4 г/л за 35 суток ферментации. Бактерии выращивают на питательных средах следующего состава: источник углерода (сахариды, органические кислоты), источник азота ((NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, (NH₄)₃PO₄, гидролизат соевых бобов), витамин В₁, нуклеиновые кислоты или дрожжевой экстракт, соли кальция, магния, железа и марганца. Ферментацию осуществляют при 30–45°С при рН=5–8 в условиях хорошей аэрации.

Стандартизация витамина В₂

Описание. Субстанция рибофлавина представляет собой желтый или оранжево-желтый кристаллический порошок (обладает полиморфизмом), очень мало растворимый в воде, практически не растворимый в 96% спирте. Растворы неустойчивы при хранении на свету, особенно в присутствии щелочи. В форме натриевой соли растворимы в воде.

Для **идентификации** используют удельное оптическое вращение (от – 115 до – 135 для рибофлавина; от + 38 до + 48 для его соли). Идентификацию также проводят методом спектрофотометрии. Максимумы поглощения находятся при длинах волн 223, 267, 373 и 444 нм. Рассчитывают также отношения оптических плотностей.

Сопутствующие примеси определяют методом ВЭЖХ.

Количественное определение проводят при 444 нм, удельный показатель поглощения 328 нм. Для растворения используют слабощелочную среду и колбы темного стекла.

Методики контроля качества субстанции рибофлавина и рибофлавина натрия фосфата описаны в соответствующей статье ГФ РБ II издания (07/2016:0292 и 07/2016:0789).

16.3 Технология получения и стандартизация эргостерина и витаминов группы D

Эргостерин (эргоста-5,7,22-триен-3 β -ол) является исходным продуктом при производстве витамина D₂ и кормовых препаратов дрожжей, обогащенных этим витамином. Витамин D₂ (эргокальциферол) образуется при облучении ультрафиолетом эргостерина, который в значительных количествах синтезируют бурые водоросли, дрожжи, плесневые грибы (рисунок 16.3). Наиболее активные продуценты эргостерина – *Saccharomyces*, *Rhodotoryla*, *Candida*.

В промышленных масштабах эргостерин образуется при культивировании дрожжей и мицелиальных грибов на средах, содержащих избыток сахаров и недостаток азота, при высокой температуре и хорошей аэрации. Более интенсивно эргостерин образуют дрожжи рода *Candida* на средах с углеводородами. Кристаллическую субстанцию витамина D₂ получают при культивировании плесневых грибов (*Penicillium*, *Aspergillus*).

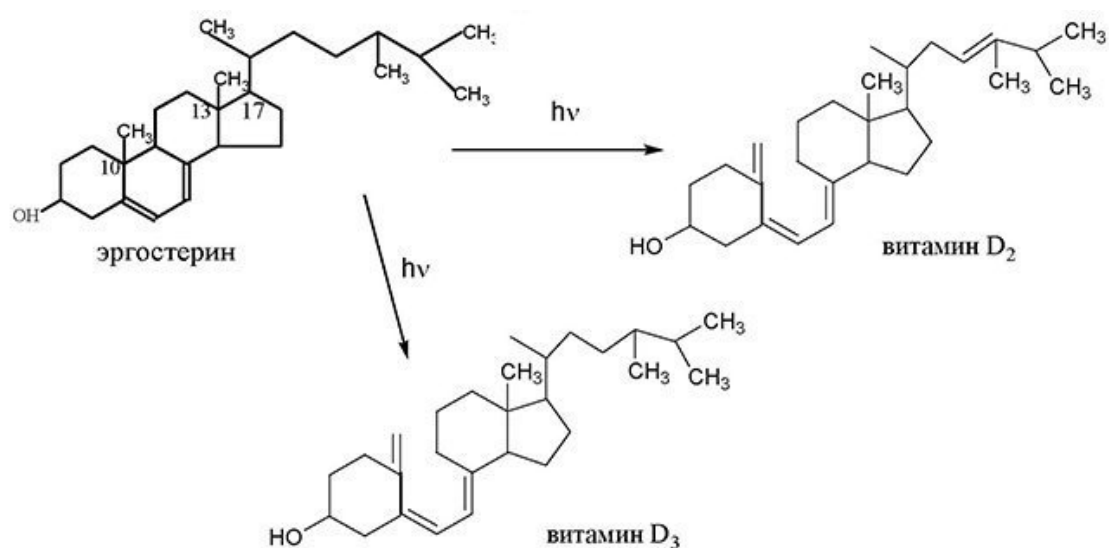


Рисунок 16.3 – Превращение эргостерина под действием УФ-излучения

Глава 16. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ВИТАМИНОВ

Технология получения эргокальциферола

Получение эргокальциферола в производственных условиях можно подразделить на следующие этапы: размножение исходной культуры и накопление инокулята, ферментация, сепарация клеток, облучение ультрафиолетовыми лучами, высушивание и упаковка целевого продукта. Так, применительно к дрожжам (*Saccharomyces cerevisiae*), инокулят получают на средах, обеспечивающих полноценное развитие клеток, после чего основную среду с ацетатом (активатором биосинтеза стероидов), обогащенную источником углерода и содержащую пониженное количество азота, засевают сравнительно большим количеством инокулята. Ферментацию дрожжей проводят при максимальной для конкретного штамма температуре и выраженной аэрации (2 % O₂ в газовой фазе). Спустя трое-четыре суток клетки отделяют и подвергают вакуум-высушиванию. Затем сухие дрожжи облучают ультрафиолетовыми лучами (длина волны 280–300 нм). Облученные сухие дрожжи применяют в животноводстве; в промышленности их выпускают под названием «кормовые гидролизные дрожжи, обогащенные витамином D₂». В случае получения кристаллического витамина D₂ клетки продуцента гидролизуют соляной кислотой при 110°C, затем температуру снижают до 75–78 °C и добавляют этанол. Смесь фильтруют при 10–15 °C, оставшуюся после фильтрации массу промывают водой, высушивают, измельчают, нагревают до 78°C и дважды обрабатывают тройным объемом этанола. Спиртовые экстракты объединяют и упаривают до 70% содержания сухих веществ. Полученный «липидный концентрат» обрабатывают раствором натрия гидроксида. Эргокальциферол кристаллизуют из неомыленной фракции концентрата при 0°C. Его можно очистить повторными кристаллизациями. Кристаллы высушивают, растворяют в этиловом эфире, облучают УФ-лучами, эфир отгоняют, раствор витамина D₂ концентрируют и кристаллизуют.

В виде масляного раствора применяют для профилактики и лечения рахита и рахитоподобных заболеваний у детей. В комплексной терапии применяют при остеопатиях разного генеза, у больных с ортопедической патологией (остеопорозе) или замедленной консолидацией переломов.

Стандартизация эргокальциферола

Описание. Субстанция эргокальциферола представляет собой белый или слегка желтоватый кристаллический порошок или белые или почти белые кристаллы. Практически не растворим в воде, легко растворим в 96 %

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

спирте, растворим в жирных маслах. Активность выражают в МЕ. Растворы на летучих растворителях нестабильны.

Идентификация. Инфракрасная спектроскопия. Удельное оптическое вращение от +103 до +107.

Количественное определение проводят ВЭЖХ.

Методики контроля качества субстанции эргокальциферола описаны в соответствующей статье ГФ РБ II издания (07/2016:0082).

16.4 Номенклатура лекарственных средств витаминов, представленных на фармацевтическом рынке РБ

Ассортиментный перечень витаминов в мире очень широк. Витамины выпускаются как в виде моно-, так и в виде комбинированных лекарственных средств, а также в виде БАД.

На сегодняшний день из лекарственных средств витаминов белорусских производителей представлены следующие:

- Аевит, Альфа-токоферола ацетат (витамин Е), аскорбиновая кислота, аскорбиновая кислота с глюкозой, Резистон (РУП «Белмедпрепараты»);
- Аевит, Антиоксикапс, Антиоксикапс с железом, йодом, селеном, цинком, Витадиабетоканс, Витамин А, Витамин Е, Дуокапс (УП «Минксинтеркапс»);
- аскорбиновая кислота, аскорбиновая кислота с глюкозой, пиридоксина гидрохлорид (ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов»);
- Аскорбиновая кислота, аскорбиновая кислота с глюкозой (ОАО «Экзон»).

Глава 17

Технология получения и стандартизация аминокислот, органических кислот и спиртов

Вопросы для самоподготовки

- 1. Общая характеристика аминокислот. Заменяемые и незаменимые аминокислоты.*
- 2. Способы промышленного получения аминокислот.*
- 3. Микробиологический синтез лизина.*
- 4. Микробиологический синтез триптофана.*
- 5. Препараты аминокислот, зарегистрированные в РБ.*
- 6. Получение органических кислот на примере лимонной кислоты.*
- 7. Получение и контроль качества спирта этилового.*

17.1 Общая характеристика аминокислот. Заменяемые и незаменимые аминокислоты

Аминокислоты – это органические соединения, содержащие одновременно основную аминную группу (NH_2 -) и кислотную карбоксильную (COOH -). По объему производства среди соединений, производимых биотехнологическими способами, аминокислоты стоят на первом месте, а по стоимости – на втором, уступая в этом только антибиотикам.

По значению для организма аминокислоты подразделяют на заменяемые и незаменимые. К незаменимым относят те аминокислоты, которые не синтезируются в человеческом и/или животном организме, они должны быть привнесены с пищей или кормом (таблица). Недостаток каждой из них в пищевом рационе приводит к нарушению обмена, замедлению роста и развития.

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

Аминокислоты находят широкое применение в следующих областях:

1) *в пищевой промышленности* используется около 30% производимых аминокислот (цистеин предотвращает пригорание пищи, улучшает качество хлеба при выпечке, усиливает запах пищи; глицин, обладающий освежающим, сладковатым вкусом, используется при производстве напитков; глутаминовая кислота – для усиления вкуса и консервирования пищи);

2) *в медицинской и фармацевтической практике* аминокислоты используют для терапии послеоперационных больных, язвенной болезни, заболеваний печени, психических заболеваний (серотонин, аспарагин, валин, гистидин, глицин и др.);

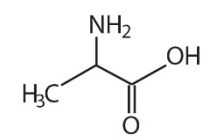
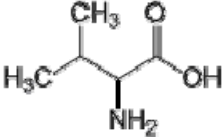
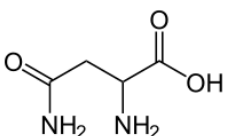
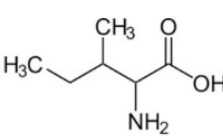
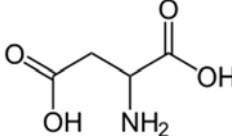
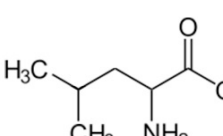
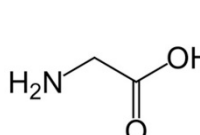
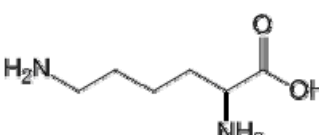
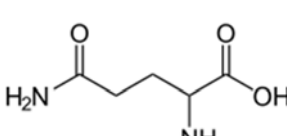
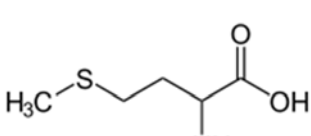
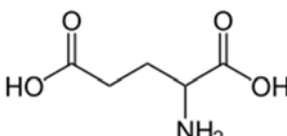
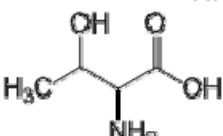
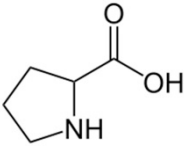
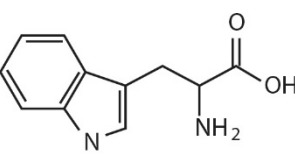
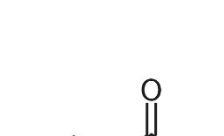

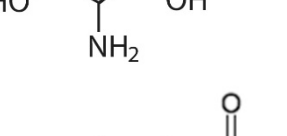
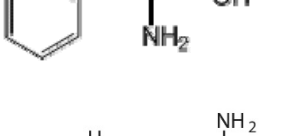
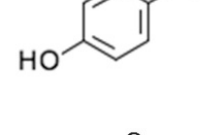
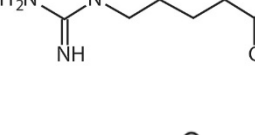
3) *в химической промышленности* аминокислоты используют как предшественники в производстве детергентов, полиаминокислот, полиуретана;

4) *в сельском хозяйстве* – для получения кормовых добавок.

В медицине используют аргинин. В сочетании с аспаратом и глутаматом он помогает при заболевании печени. Под действием аргинина повышается активность иммунной системы у послеоперационных пациентов. К-Na-аспартат снимает усталость и назначается для облегчения боли в сердце, его рекомендуют при заболевании печени и диабете. Цистеин защищает SH-ферменты в печени и других тканях от окисления и оказывает детоксицирующее действие. Он проявляет также защитное действие от повреждений, вызванных облучением. Триптофан – антидепрессант, его используют при лечении алкоголизма и бессонницы. Глицин является регулятором обмена веществ, нормализует процессы возбуждения и торможения в центральной нервной системе, обладает антистрессорным эффектом, повышает умственную работоспособность. Фенилаланин эффективен при болезни Паркинсона.

Глава 17. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ, ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ И СПИРТОВ

Таблица 17.1 – Незаменимые и заменимые аминокислоты

Заменимые АК		Незаменимые АК	
Аланин		Валин	
Аспарагин		Изолейцин	
Аспарагиновая кислота		Лейцин	
Глицин		Лизин	
Глутамин		Метионин	
Глутаминовая кислота		Треонин	
Пролин		Триптофан	
Серин		Фенилаланин	
Тирозин		Аргинин*	
Цистеин		Гистидин*	

* не заменимы у детей

17.2 Способы промышленного получения аминокислот

Способность аккумулировать в питательной среде аминокислоты обнаружена у многих микроорганизмов. В качестве продуцентов аминокислот, как правило, используют:

- 1) грамположительные бесспорные бактерии рода *Corynebacterium*, *Brevibacterium* и *Micrococcus*;
- 2) спорообразующие грамположительные палочки рода *Bacillus*, *Microbacterium*;
- 3) грамотрицательные палочки рода *Enterobacter*, *Escherichia*.

Для производства аминокислот бактерии стали использовать с начала 50-х годов, при этом штаммы постоянно улучшали генетическими методами, выделяя мутанты с измененными регуляторными свойствами, так называемые *ауксотрофные микроорганизмы*. Основной целью создания ауксотрофных организмов является возможность воздействия на синтез первичных метаболитов (аминокислоты относятся к первичным метаболитам микроорганизмов), повышая тем самым выход целевого продукта. Для этого можно либо стимулировать потребление субстрата на некоторых путях биосинтеза и выделение аминокислот в среду, либо подавить побочные реакции и процессы деградации аминокислот.

В промышленных масштабах аминокислоты получают несколькими способами:

- 1) гидролизом природного белоксодержащего сырья;
- 2) химическим синтезом;
- 3) микробиологическим синтезом;
- 4) биотрансформацией предшественников аминокислот с помощью микроорганизмов или выделенных из них ферментов (химико-микробиологический метод).

Химический синтез аминокислот находится на втором месте по объему производства. Основным его недостатком является получение рацемической смеси аминокислот, состоящей из D- и L-изомеров, тогда как биологической активностью в организме человека и животных обладают лишь L-изомеры, а D-изомеры аминокислот не перерабатываются их ферментными системами. Кроме того, некоторые из них токсичны для человека и животных. Производство аминокислот химическим синтезом связано с использованием дорогостоящего оборудования и нередко агрессивных токсических соединений в качестве исходного сырья. Процесс,

Глава 17. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ, ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ И СПИРТОВ

как правило, протекает при высокой температуре, требует дорогостоящих катализаторов, и, как всякое химическое производство, сопровождается образованием побочных продуктов, загрязняет окружающую среду, небезопасен и небезвреден для обслуживающего персонала.

Технологии получения аминокислот за счет гидролиза белков экономически менее выгодны, поэтому они не получили широкого распространения.

Наиболее перспективным и экономически выгодным является микробиологический синтез аминокислот. Более 60% всех производимых в настоящее время высокоочищенных аминокислот получают этим способом. Главное его преимущество состоит в возможности получения аминокислот на основе возобновляемого сырья, при этом образуются только их L-изомеры.

В основе культивирования микроорганизмов для получения чистых субстанций аминокислот применяют промышленные технологии, включающие одно- и двухступенчатый биологический синтез.

При одноступенчатом синтезе в промышленных культиваторах выращивают ауксотрофные регуляторные мутанты, являющиеся сверхпродуцентами аминокислот. После завершения рабочего цикла их выращивания культуральную жидкость отделяют от клеток микроорганизмов, сгущают и получают из нее готовый продукт с высокой концентрацией синтезированной аминокислоты.

В процессе двухступенчатого синтеза (рисунок 17.1) аминокислоты вначале получают ее предшественник (часто более дешевым химическим синтезом), а затем с помощью ферментов, вырабатываемых микроорганизмами, превращают предшественник в аминокислоту, при этом образуется только L-изомеры. В качестве источника фермента могут быть использованы суспензия клеток микроорганизмов или полученный после разрушения этих клеток ферментный раствор. Этим методом можно производить практически все аминокислоты, но из-за дороговизны и сложности получения кислот-предшественников этот метод не всегда экономически выгоден и в большинстве случаев уступает методу прямого микробиологического синтеза.

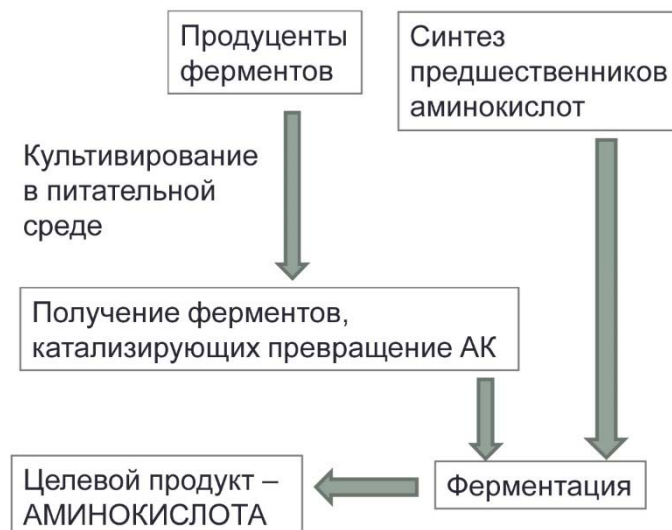


Рисунок 17.1 – Схема двухступенчатого биосинтеза аминокислот

17.3 Микробиологический синтез лизина

Лизин – алифатическая незаменимая аминокислота. Лизин относится к числу соединений, которые живые организмы не производят самостоятельно, и должны получать в готовом виде для синтеза собственных структурных и функциональных белков.

Источником лизина являются микроорганизмы и растения. Из микроорганизмов лизин синтезируют бактерии, актиномицеты, сине-зеленые водоросли. В начале 50-х годов японские ученые *С. Киносита*, *К. Накаяма* и *С. Китада* получили мутантные штаммы бактерий, способные к сверхсинтезу лизина. Поначалу максимальная концентрация его достигала 20 г в 1 л культуральной жидкости. Сейчас получены штаммы, способные вырабатывать до 60 г/л и более аминокислоты.

Установлено, что лизин в организме является не только структурным элементом белка. Данная аминокислота выполняет и другие важные биохимические функции – является предшественником карнитина и оксилизина, способствует секреции пищеварительных ферментов и транспорту кальция и стронция в клетки, улучшает общий азотный баланс в организме.

Наиболее дешевым и освоенным способом получения лизина является микробиологический метод. Впервые такое производство налажено в Японии в середине 50-х годов; затем в Голландии и США. В СССР лизиновая промышленность родилась в 70-х годах XX в. В основу производства положены технологии с использованием одноступенчатого

Глава 17. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ, ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ И СПИРТОВ

микробиологического синтеза, которые включают промышленное культивирование ауксотрофных мутантов бактерий из рода *Corynebacterium*, способных к синтезу лизина, а также химико-энзиматический способ (рисунок 17.2).

Одноступенчатый синтез

В клетках бактерий лизин синтезируется из аспарагиновой кислоты через ряд промежуточных этапов, связанных с образованием альдегида аспарагиновой кислоты. Альдегид аспарагиновой кислоты является также одним из предшественников в синтезе аминокислот – треонина, метионина и изолейцина. Процесс синтеза аминокислоты начинается фосфорилированием аспарагиновой кислоты с участием аллостерического фермента аспартаткиназы, активность которого ингибируется совместным действием двух аминокислот – лизина и треонина, если они накапливаются в клетках бактерий в избыточной концентрации (*feedback-регуляция*). Если понизить концентрацию одной из этих аминокислот, то синтез другой будет осуществляться даже при условии, когда она накапливается в довольно высокой концентрации. Поэтому для снятия регуляции синтеза лизина необходимо прекратить образование треонина на стадии превращения альдегида аспарагиновой кислоты в гомосерин, катализируемое гомосериндегидрогеназой, что достигается путем мутагенеза.

В процессе приготовления питательной среды в качестве источника углерода используют смеси, включающие уксусную кислоту и свекловичную мелассу. Небольшие добавки сахара в среду (около 1 %) повышают выход лизина на 30–50 %; в качестве источника азота используют соли аммония, мочевины, кукурузный экстракт в качестве источника биологически активных веществ (1,2–1,5 % по содержанию сухих веществ), гидролизаты дрожжей. Кроме дефицитных аминокислот, которые не синтезируются клетками мутантов, в питательную среду также добавляют необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов микро- и макроэлементы, витамины (биотин и др.). Среда должна содержать в одном литре: 200 мг метионина, 800 мг треонина, 15–20 мкг биотина. Соотношение углерода и азота в среде оптимально как 11 : 1.

В процессе культивирования микроорганизмов обеспечивается подача стерильного воздуха с помощью специальных турбинных мешалок, для предотвращения вспенивания субстрата и клеточной суспензии в среду культивирования добавляют пеногасители.

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

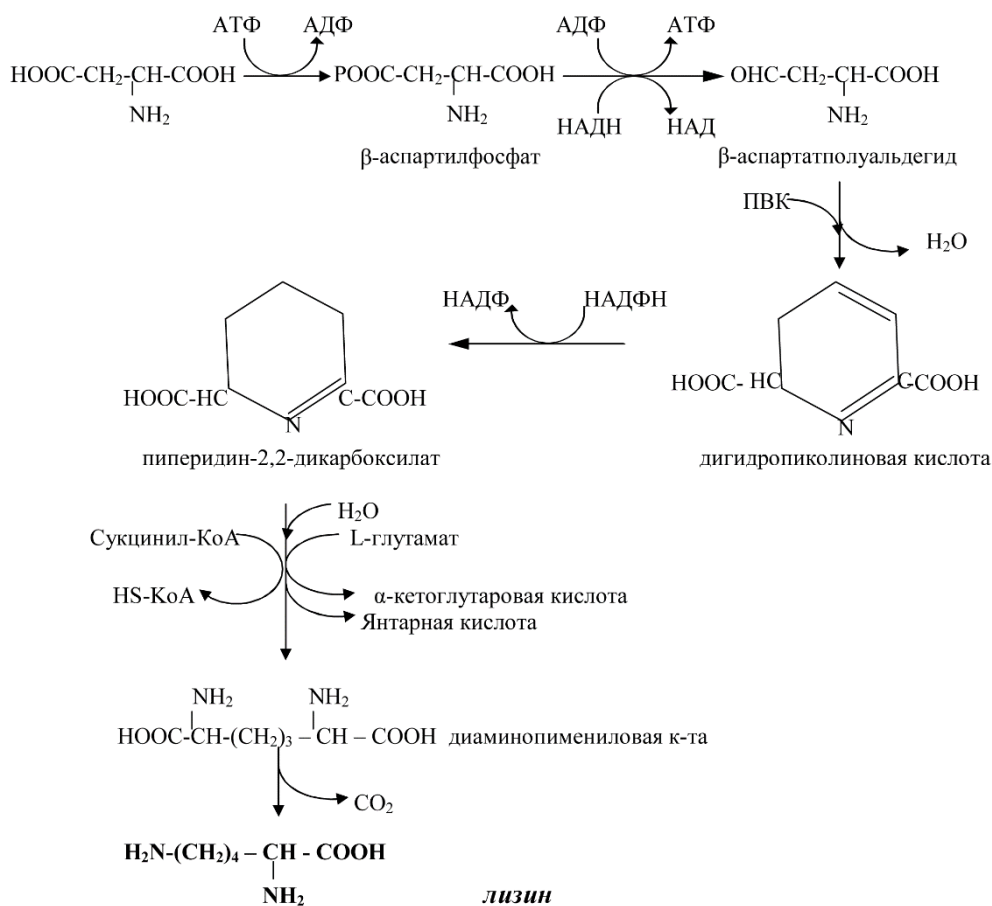


Рисунок 17.2 – Схема синтеза лизина

Посевной материал вначале выращивается в посевных аппаратах при 28–32°C, pH 7,0–7,2 в течение 18–24 ч, полученная суспензия клеток подается в производственные ферментеры, в которых поддерживается постоянный режим аэрации, избыточное давление 20–30 кПа, непрерывное перемешивание, контроль за всеми параметрами среды. Культивирование осуществляется в строго стерильной глубинной аэробной периодической культуре. Время ферментации составляет 55–72 ч. Накопление в культуральной жидкости лизина начинается через 25–30 ч после начала выращивания промышленной культуры и к концу ферментации достигает 40–50 г/л.

Культуральную жидкость отделяют от культуры клеток продуцента фильтрованием и используют для получения лизина. Для получения очищенной субстанции лизина культуральную жидкость после фильтрования подкисляют соляной кислотой до pH 1,6–2. Образовавшийся в результате взаимодействия с соляной кислотой раствор монохлоргидрата лизина направляют на колонки с катионитом, где происходит сорбция аминокислоты и отделение ее от культуральной жидкости. Затем проводят десорбцию аминокислоты элюированием 0,5–5 % раствором аммиака.

Глава 17. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ, ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ И СПИРТОВ

Элюат выпаривают под вакуумом при 60°C до концентрации 30–50 %, после подкисленный соляной кислотой раствор монохлоргидрата высушивают. Путем перекристаллизации полученной соли можно получить субстанцию с содержанием монохлоргидрата лизина в количестве 97–98 %.

Химико-энзиматический способ получения лизина

В ряде стран (Японии, США и др.) для получения лизина применяется химико-энзиматический метод, позволяющий создать высокоэффективные технологии, основанные на ферментативной конверсии в лизин α -амино- ϵ -капролактама, который получают химическим методом из циклогексана:



В результате химического синтеза образуется рацемическая смесь D- и L-капролактама, направляющаяся в реактор с гидролазой α -амино- ϵ -капролактама, который катализирует превращение L-капролактама в L-лизин. D-изомер капролактама затем превращается в L-изомер с помощью специфической рацемазы. При такой технологии получения лизина его содержание в реакционной смеси по завершении рабочего цикла достигает свыше 150 г/л.

Продуценты гидролазы α -амино- ϵ -капролактама – некоторые штаммы дрожжей из рода *Cryptococcus*, *Candida*, *Trichosporon*, которые выращивают в щелочной оптимизированной для синтеза фермента питательной среде, содержащей активаторы – ионы магния, марганца и цинка. Для ферментативной реакции превращения капролактама в лизин может использоваться клеточная суспензия дрожжевых клеток с активным ферментом, клеточный экстракт (после разрушения и отделения клеток) или очищенный фермент. Продуценты рацемазы – бактерии *Achromobacter*, *Flavobacterium* и др.

17.4 Микробиологический синтез триптофана

Триптофан, наряду с другими ароматическими аминокислотами, фенилаланином и тирозином, в последние годы находит все большее применение. Отсутствие или дефицит триптофана в организме приводит к ряду тяжелых заболеваний (диабет, туберкулез, пеллагра).

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

Для промышленного получения триптофана разработаны технологии одноступенчатого синтеза на основе использования ауксотрофных мутантов бактерий *Bacillus subtilis* с нарушенным метаболизмом фенилаланина и тирозина, а также двухступенчатый синтез, включающий вначале получение предшественника триптофана, а затем его ферментативное превращение в конечный продукт – триптофан.

У бактерий и у др. организмов триптофан образуется из эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпировиноградной кислоты через ряд последовательных реакций, непосредственным предшественником триптофана является антралиловая кислота (рисунок 17.3). Синтез триптофана аллостерически ингибируется конечными продуктами, которые действуют на ферменты, катализирующие начальные этапы превращений, связанные с образованием хоризмовой кислоты. Для смещения метаболических реакций по пути преимущественного образования триптофана необходимо блокировать превращение хоризмовой кислоты в префеновую, что достигается действием мутагенных факторов.

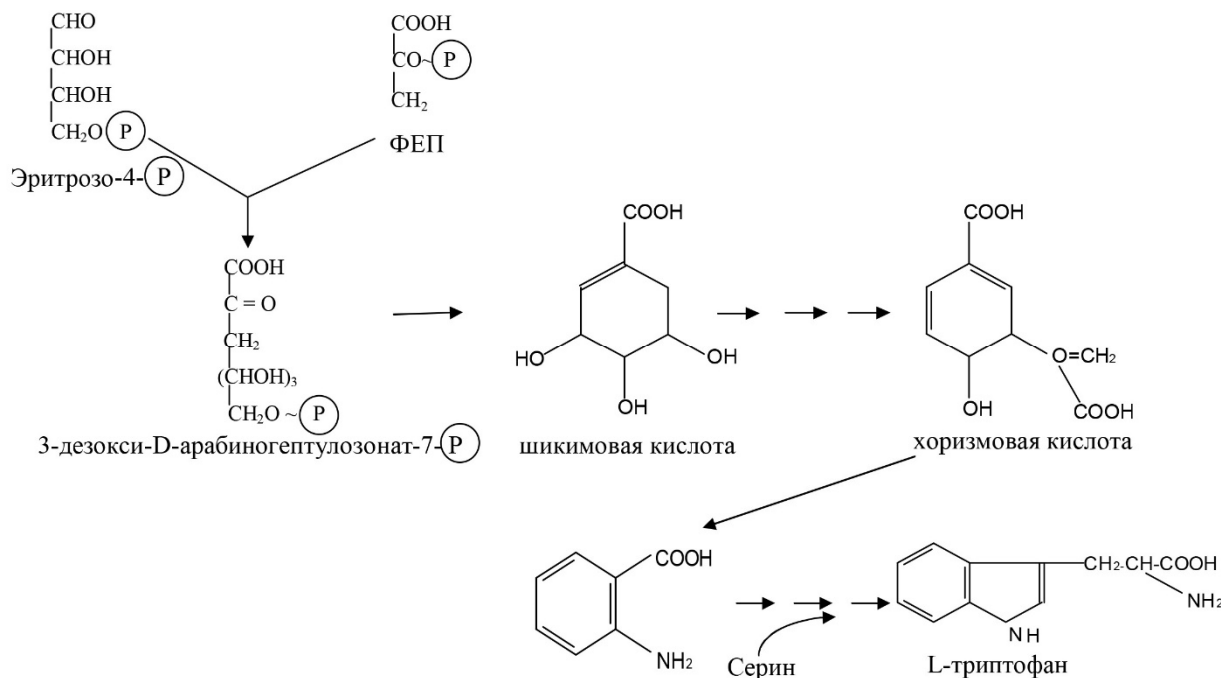


Рисунок 17.3 – Схема синтеза триптофана

Все технологические процессы организованы по той же схеме, что и получение лизина. Ферментация длится 48 ч при 37–38°C, pH=7,0–7,2, при интенсивной аэрации, концентрация триптофана в культуральной жидкости достигает 10 г/л.

После отделения культуральной жидкости ее подвергают дополнительной очистке. Вначале ее подкисляют соляной кислотой до pH

Глава 17. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ, ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ И СПИРТОВ

1,0 и центрифугированием отделяют образовавшийся осадок. Далее центрифугат, содержащий триптофан, пропускают через катионообменные колонки, в результате происходит связывание аминокислоты и ее отделение от культуральной жидкости. После промывки колонок производят десорбцию триптофана 5 % раствором аммиака в смеси изопропанола и воды. Элюат направляют на вакуум-выпарительный аппарат, после кристаллизуют аминокислоту при 4–8°C. Выделенную в кристаллическом виде соль триптофана промывают этанолом и высушивают под вакуумом при 60°C. Высушенный кристаллический порошок содержит не менее 99 % триптофана в виде гидрохлорида. Осадок после отделения культуральной жидкости, содержащий клетки культуры бактерий, высушивают и используют как высокобелковую кормовую добавку.

Химико-энзиматический способ получения триптофана

Разработан метод биотрансформации анраниловой кислоты в L-триптофан ферментными системами клеток дрожжей *Candida utilis*. Процесс осуществляется при температуре 28–30°C; pH 7,5–8,0. Вначале методом химического синтеза получают предшественник триптофана – анраниловую кислоту, которую затем с участием ферментов микробного происхождения превращают в триптофан.

Производственный процесс биохимического превращения анраниловой кислоты в триптофан проводится в две стадии. На I стадии производится наращивание биомассы дрожжей, являющихся продуцентами ферментов. Питательная среда для выращивания дрожжей готовится из свекловичной мелассы, мочевины, минеральных солей. Ферментация продолжается в течение 24 ч при 30°C. Далее в ферментер начинают вводить спиртовой 5% раствор анраниловой кислоты и 50 % раствор мочевины. Через 3–4 ч после добавления анраниловой кислоты в ферментер дополнительно подается углеродный субстрат – меласса в виде 25 % раствора. На последующих этапах ферментации периодически производится подача анраниловой кислоты и мочевины через каждые 6 ч и раствора мелассы – через каждые 12 ч. Длительность ферментации около 120 ч, а с учетом времени наращивания биомассы дрожжей – 144 ч.

17.5 Препараты аминокислот, зарегистрированные в РФ

Тетракард (аргинина гидрохлорид, лизина гидрохлорид, таурин, ацетилсалициловая кислота) – в составе комплексной терапии стабильной стенокардии (II-III ФК) у пациентов без перенесенного инфаркта миокарда.

Аспаркам (калия и магния аспартат) – применяется при дефиците калия и магния в организме, в составе комплексной терапии ишемической болезни сердца, аритмии и т.п.

Алкогро (треонин и пиридоксин) – для улучшения работоспособности и внимания, для лечения абстинентного синдрома.

Лейаргунал (лейцин, аргинина гидрохлорид, инозин) – в составе комплексной терапии хронического периодонтита, у пациентов с клиникой затяжных пневмоний и хронических бронхитов.

Аспаргит (аргинина гидрохлорид и ацетилсалициловая кислота) – антиагрегантная терапия и повышение толерантности к физической нагрузке у пациентов со стабильной стенокардией.

Триптофан – желатиновые капсулы, применяется для лечения расстройства сна, в комплексной терапии для лечения алкогольной и наркотической зависимости.

Громецин – таблетки, применяется в составе комплексной терапии функциональных и органических заболеваний нервной системы.

Лейцин – таблетки, применяется в качестве корректора аминокислотного дисбаланса у пациентов с онкологическими заболеваниями при проведении специфического лечения.

Тавамин (валин, лейцин, изолейцин, таурин) – капсулы для лечения заболеваний печени.

17.6 Получение органических кислот на примере лимонной кислоты

Органические кислоты широко используются в пищевой и фармацевтической промышленности, в технике и в качестве химического сырья. Отдельные органические кислоты (лимонную, яблочную) можно получать экстракцией из природного растительного сырья; другие (уксусную, молочную) – в процессах органического синтеза. Более 50 органических кислот могут быть получены на основе микробиологического

Глава 17. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ, ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ И СПИРТОВ

синтеза. Биотехнологические методы их получения к настоящему времени детально разработаны. Более того, принято считать, что органические кислоты, полученные в результате микробиологического синтеза, для использования человеком предпочтительнее в сравнении с синтетическими кислотами. Для технических нужд органические кислоты получают химическим путем; применяемые в пищевой и фармацевтической промышленности – в различных биотехнологических процессах. Это производство лимонной, молочной, уксусной, итаконовой, пропионовой и глюконовой органических кислот (молочная и уксусные кислоты производятся также и химическим путем).

Продуценты органических кислот

Способность продуцировать ту или иную кислоту – широко распространенное среди микроорганизмов свойство. В качестве производственных культур используют специально подобранные штаммы, продуцирующие целевую кислоту в виде монопродукта с высокими выходами и эффективным усвоением углеродного субстрата. При многих производствах органических кислот экономический коэффициент по углероду достигает 90% и выше. В качестве продуцентов используют бактериальные, дрожжевые и грибковые культуры (*Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*).

Органические кислоты в системе микробного метаболизма являются продуктами деградации источника энергии и углерода. Так, лимонная, изолимонная, кетоглутаровая, янтарная, фумаровая и яблочная кислоты – промежуточные продукты цикла трикарбоновых кислот у большинства аэробных микроорганизмов. Таким образом, возможности микроорганизмов для получения на основе их метаболизма органических кислот велики. Для сверхсинтеза отдельных кислот нужны селективные, строго определенные условия. При сбалансированном росте микроорганизмов на полноценной среде накопления органических кислот не происходит, так как, будучи промежуточными продуктами в системе микробного метаболизма, органические кислоты – исходный материал для синтеза других макромолекул. Сверхсинтез органических кислот наблюдается при торможении скорости роста продуцента и блокировании процессов биосинтеза, требующих участия кислот в качестве субстрата. Большинство органических кислот получают, лимитируя рост клеток-продуцентов дефицитом азота или фосфора при избытке углеродсодержащего субстрата. Поэтому микробиологические процессы

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

получения органических кислот двухфазные: на первом этапе обеспечивается так называемый сбалансированный рост при максимальном накоплении биомассы и потреблении углеродного и энергетического субстрата, а также лимитирующего биогена; на втором – происходит замедление скорости роста клеток. В результате этого прирост биомассы прекращается и начинается интенсивное кислотообразование. Длительность фазы интенсивного кислотообразования определяется наличием углеродсодержащего субстрата в среде. Важным условием кислотообразования большинства органических кислот (за исключением молочной) является хороший режим аэрации, а также величина рН среды.

Способы ферментации в микробиологических процессах производства органических кислот разнообразны. Среди них – поверхностные жидко- и твердофазные процессы, а также глубинные, включая проточные культуры. В последние годы разработаны принципиально новые и эффективные биотехнологии с использованием иммобилизованных целых клеток и ферментов. Также разнообразны и субстраты, используемые в производстве органических кислот. Применяемые в начале прошлого века глюкоза и сахароза со временем стали заменять более доступными комплексными средами (мелассой, гидролизным крахмалом); в 60-е годы были разработаны новые процессы получения органических кислот на жидких парафинах нефти.

Получение лимонной кислоты

Лимонная кислота ($\text{CH}_2\text{--COOH--CONCOOH--CH}_2\text{COOH}$) – трехосновная оксикислота, широко распространенная в плодах и ягодах. Она применяется в пищевой промышленности при производстве кондитерских изделий и напитков, в фармацевтической, химической и текстильной промышленности. Лимонная кислота была идентифицирована в качестве продукта метаболизма плесневых грибов в 1893 году *Вемером*. В настоящее время эта кислота по объемам производства (свыше 350 тыс. т/г) занимает первое место среди всех органических кислот.

У микроорганизмов синтез лимонной кислоты реализуется в цикле дикарбоновых кислот и осуществляется в результате конденсации щавелево-уксусной кислоты и уксусной кислоты, то есть образование лимонной кислоты включает реакции гликолиза и ряд реакций цикла Кребса. При каждом обороте цикла молекула щавелево-уксусной кислоты взаимодействует с уксусной, образуя лимонную кислоту.

Глава 17. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ, ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ И СПИРТОВ

В промышленном производстве лимонной кислоты в качестве продуцента в основном используют *Aspergillus niger*, но также применяют и *A.wentii*. Процесс ферментации достаточно сложен, так как лимонная кислота – продукт первичного метаболизма грибов. Рост продуцента и синтез кислоты обычно регулируют составом среды (сахара, P, Mn, Fe, Zn). Сверхсинтез лимонной кислоты реализуется при больших концентрациях сахаров в среде (14–24 %) и является ответной реакцией продуцента на дефицит фосфора. Оптимум pH на стадии кислотообразования составляет 1,7–2,0. В более щелочной среде процесс сдвигается в сторону накопления щавелевой и глюконовой кислот. В качестве основы среды обычно используют глюкозный сироп, гидролизаты крахмала или мелассу. Источником азота служат соли аммония (0,2 %), концентрация фосфатов (0,01–0,02 %). В качестве пеногасителей используют природные масла с высоким содержанием жирных кислот. Очень существенное значение имеет уровень аэрации культуры.

В производстве лимонной кислоты применяют несколько вариантов процесса. Поверхностный способ реализуется на твердой сыпучей среде и в жидкой фазе. При жидкофазной поверхностной ферментации питательную среду разливают в кюветы слоем от 8 до 18 см. Кюветы размещают на стеллажах в предварительно простерилизованной парами формалина бродильной камере. Через специальные воздухопроводы с током стерильного воздуха поверхность среды засевают исходной музейной культурой. В качестве посевного материала используют предварительно полученные также в условиях поверхностной культуры и высушенные споры (конидии) из расчета 50–75 мг конидий на 1 м² площади кювет. Известно несколько вариантов процесса: непрерывный, полупериодический с доливками и метод пленок. При непрерывном режиме процесс осуществляется на одной среде от момента засева спор до завершения стадии кислотообразования. При использовании метода пленок через 7 суток после завершения кислотообразования сброженный раствор мелассы сливают из кювет, мицелий промывают стерильной водой и в кюветы заливают новую среду. Полупериодический способ с доливом характеризуется дробными добавками мелассы под пленку гриба на стадии кислотообразования (30–35 % от исходного объема), так называемый режим с подпиткой субстратом. Это позволяет повысить выход лимонной кислоты на 15–20 % с единицы поверхности при сокращении затрат сахаров на 10–15 % по сравнению с другими методами. В ходе стадии ферментации на первом этапе (первые 24–36 ч) происходит интенсивный рост мицелия. Температура среды в этот

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

период стабилизируется на уровне 32–34°C, интенсивность аэрации составляет 3–4 м³ воздуха в ч/м мицелия. В период активного кислотообразования подачу воздуха увеличивают в 5–6 раз. В результате более интенсивного термогенеза температуру снижают до 30–32°C. По мере снижения процесса кислотообразования режим аэрации становится менее интенсивным. Контроль процесса ведут по показателям титруемой кислотности среды. Процесс считают законченным при остаточной концентрации сахаров около 1–2 % и уровне титруемой кислотности 12–20 %. Содержание лимонной кислоты от уровня всех кислот достигает 94–98 %. Сброженный раствор сливают в сборник и направляют на обработку; промытый мицелий используют в кормопроизводстве.

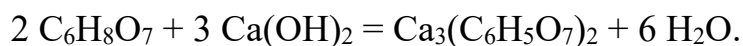
Твердофазная ферментация имеет много общего с поверхностно-жидкофазным процессом. Разработанный в Японии процесс Коджи предусматривает использование в качестве среды пористого материала (багасса, картофель, пульпа сахарной свеклы, пшеничные отруби). Материал предварительно стерилизуют, после охлаждения инокулируют суспензией спор. Ферментация происходит в лотках при 25–30°C в течение 6–7 дней. Образованную лимонную кислоту экстрагируют водой. В Японии 20 % общего объема производства лимонной кислоты получают методом Коджи. Начиная с 1950 года, промышленные процессы получения лимонной кислоты стали переводить в условия глубокой культуры. Стабильный процесс возможен при его организации в две стадии: рост мицелия на полной среде в ходе первой стадии и на второй (при отсутствии фосфора в среде) – образование лимонной кислоты.

Глубинная ферментация проводится в аппаратах емкостью 50 м³ с заполнением на 70–75 %. В качестве посевного материала используют мицелий, подрощенный также в условиях глубокой культуры. В производственном аппарате, куда подрощенный мицелий передается по стерильной посевной линии, питательная среда содержит 12–15 % сахаров. Ферментацию проводят при 31–32°C при непрерывном перемешивании. В ходе процесса кислотообразования (5–7 суток) реализуют интенсивный режим аэрации (до 800–1000 м³/ч) с дробным добавлением сахаров, 2–3 подкормки. Выход лимонной кислоты составляет от 5 до 12 %, остаточная концентрация сахаров – 0,2–1,5 %, доля цитрата – 80–98 % от суммы всех органических кислот.

Готовый продукт – высокоочищенную кристаллическую лимонную кислоту – получают в ходе постферментационной стадии. В сброженных растворах содержатся, помимо целевой кислоты, также глюконовая и

Глава 17. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ, ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ И СПИРТОВ

щавелевая кислоты, остатки несброженных сахаров и минеральные соли. Для выделения лимонной кислоты из данного раствора ее связывают гидроокисью кальция с образованием труднорастворимого цитрата кальция:



Одновременно образуются кальциевые соли глюконовой и щавелевой кислот, глюконат кальция $\text{Ca}(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)_2$ и оксалат кальция CaC_2O_4 . Кальциевые соли лимонной и щавелевой кислот выпадают в осадок, а глюконат кальция и основная часть органических и минеральных компонентов мелассы остаются в растворе. Осадок отделяется на вакуум-фильтре, промывается и высушивается. Далее для перевода лимонной кислоты в свободное состояние и освобождения от оксалата кальция осадок обрабатывают серной кислотой с последующей фильтрацией. Раствор лимонной кислоты фильтруют, концентрируют вакуум-выпарной сушкой и затем подвергают кристаллизации при медленном охлаждении до 8–10°C. Полученные кристаллы отделяют в центрифуге от маточника и высушивают в пневматических сушилках при 30–35°C. Готовый продукт содержит не менее 99,5 % лимонной кислоты (в пересчете на моногидрат), зольность – не выше 0,1–0,35 %.

Лекарственные средства на основе лимонной кислоты

Блемарен (Германия, Esparma) – лимонная кислота, калия дигидрокарбонат, натрия цитрат. Лекарственное средство для лечения нефроуролитиаза. Растворяет и предупреждает образование мочекислых камней за счет ощелачивания мочи до значений pH 6,6–6,8. Снижает выведение кальция, улучшает растворимость кальция оксалата в моче, ингибирует образование кристаллов и препятствует образованию кальций-оксалатных камней – *зарегистрирован в РБ*.

Лимонтар (РФ, «Биотики») – янтарная кислота и лимонная кислота. Стимуляторы аппетита. Является регулятором тканевого обмена, усиливает окислительно-восстановительные процессы, образование АТФ. Показан для повышения неспецифической реактивности организма беременных женщин, профилактики опьянения, уменьшения токсического влияния алкоголя, комплексной терапии запойных состояний – *не зарегистрирован в РБ*.

17.7 Получение и контроль качества спирта этилового

По современной номенклатуре технология производства спирта относится к биотехнологии. Процессы получения спирта основаны на превращении крахмала в сахар, и далее сахара в этиловый спирт под действием биологических катализаторов (ферментов). Так как ферменты для гидролиза крахмала до сахаров вырабатываются плесневыми грибами и бактериями, а для превращения сахаров в спирт – дрожжами, технология спирта неразрывно связана с технической микробиологией.

Технология спирта включает в себя следующие процессы: подготовку сырья к развариванию, разваривание зерна и картофеля с водой для разрушения клеточной структуры и растворения крахмала; охлаждение разваренной массы и осахаривание крахмала ферментами солода (пророщенного зерна) или культур плесневых грибов; сбраживание сахаров дрожжами в спирт; отгонку спирта из бражки и его ректификацию, а также приготовление солода путем проращивания зерна или культивирования плесневых грибов и бактерий для получения амилолитических и протеолитических ферментных препаратов, выведение и размножение засевных дрожжей.

Осахаривание разваренной массы, как правило, осуществляют непрерывным способом и лишь на некоторых заводах малой мощности - периодическим.

Независимо от способа процесс осахаривания складывается из следующих операций:

- охлаждение разваренной массы до определенной температуры, которая после смешивания массы с солодовым молоком (микробной культурой) понизится до заданной для осахаривания;
- смешивание разваренной массы с солодовым молоком (микробной культурой);
- осахаривание крахмала;
- охлаждение сусла до температуры «складки» - начальной температуры брожения сусла;
- перекачивание сусла в бродильное и дрожжевое отделения завода.

Все эти операции, кроме перекачивания сусла, при периодическом процессе выполняются в одном аппарате, называемом заторным баком; при

Глава 17. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ, ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ И СПИРТОВ

непрерывном процессе – или в отдельных аппаратах, установленных последовательно, или в одном аппарате (сочетается несколько операций).

При получении спирта из мелассы перерабатывается содержащаяся в ней сахара, поэтому процессы разваривания и осахаривания исключаются.

Ферментативная диссимиляция углеводов в анаэробных условиях, происходящая с выделением энергии и приводящая к образованию продуктов неполного окисления, называется брожением. В этом процессе акцептором водорода служат органические соединения, получающиеся в реакциях окисления (например, уксусный альдегид при спиртовом брожении); кислород в этих реакциях не участвует.

Бражка, получаемая при спиртовом брожении – сложная многокомпонентная система, состоящая из воды (82–90 % м/м), сухих веществ (4–10 % м/м) и этилового спирта с сопутствующими летучими примесями (5–9 % м/м, или 6–11 об. %). В бражке всегда содержится некоторое количество диоксида углерода: в 1 л, взятом непосредственно из бродильного аппарата, – 1–1,5 г. При перекачке бражки в ректификационное отделение 35–45 % его теряется. Состав бражки в значительной мере изменяется в зависимости от вида исходного сырья и принятых технологических режимов ее приготовления.

Сухие вещества бражки представлены как взвешенными частицами (дрожжи, дробина), так и растворенными в водно-спиртовой смеси органическими и неорганическими веществами (декстрины, несброженные сахара, белки, кислоты, минеральные вещества и др.). В зерно-картофельной бражке находится значительное количество взвешенных частиц, она более вязкая, чем мелассная, однако общее содержание сухих веществ в мелассной бражке обычно больше (8–10 %), чем в зерновой (5–7 %) и особенно в картофельной (3–4 %).

Летучие примеси, сопутствующие спирту, характеризуются большим разнообразием, в настоящее время их идентифицировано более 70, но общее содержание невелико – обычно не превышает 0,5 % от количества этилового спирта.

Все летучие примеси можно в основном разделить на четыре группы: спирты, альдегиды, кислоты и эфиры. Кроме того, выделяют группу азотистых веществ (аммиак, амины, аминокислоты), серосодержащих веществ (сероводород, сернистый ангидрид, сульфокислоты, меркаптаны) и др.

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

Состав и содержание летучих примесей зависят от вида и качества сырья, принятых технологических режимов его переработки. Примеси частично переходят из сырья, воды, вспомогательных материалов, частично образуются в процессе приготовления сусла, однако основная часть их появляется в процессе брожения.

Больше всего примесей (0,35–0,45% к количеству этилового спирта) приходится на долю спиртов – метилового, пропилового, изобутилового, изоамилового.

Спирт из бражки выделяют с помощью ректификации на сырцовых ректификационных установках. При этом вместе с ним отгоняется и значительная часть сопутствующих летучих примесей, получаемый при этом продукт называется спиртом-сырцом.

Ректификованный спирт получают путем очистки спирта сырца от примесей ректификацией. Различают четыре вида ректификованного спирта: люкс, экстра, высшей очистки, I сорта.

Помимо спирта-сырца и ректификованного спирта спиртовой промышленностью вырабатывается небольшое количество абсолютного спирта. Не следует смешивать понятия: безводный (100%-ный) и абсолютный спирт, в котором допускается содержание воды до 0,2 об. %. Безводный спирт промышленностью не вырабатывается.

Контроль качества спирта этилового

Описание. Бесцветная, прозрачная, летучая, легковоспламеняющаяся жидкость. Гигроскопична. Смешивается с водой. Горит голубым, бездымным пламенем.

Идентификация. Сравнивают ИК-спектр со спектром стандарта. Определяют относительную плотность. При проведении качественных реакций добавляют перманганат калия и серную кислоту в пробирку, накрывают фильтровальной бумагой, смоченной натрием нитропруссидом и пиперазином гидратом. Бумага окрашивается в интенсивно синий цвет, который быстро исчезает. В щелочной среде спирт с раствором йода образует желтый осадок.

Посторонние примеси. Определяют прозрачность, цветность, кислотность/щелочность, оптическую плотность, летучие примеси, тяжелые металлы, остаток после выпаривания.

Подробное описание испытаний спирта этилового изложено в Государственной фармакопее Республики Беларусь (07/2016:РБ0032; 07/2016:1317).

Глава 18

Технология получения и стандартизация декстранов

Вопросы для самоподготовки

- 1. Общая характеристика микробных полисахаридов.*
- 2. Технология получения декстранов.*
- 3. Стандартизация лекарственных средств на основе декстранов.*
- 4. Лекарственные средства на основе декстранов, зарегистрированные в РБ.*

18.1 Общая характеристика микробных полисахаридов

Полисахариды (или гликаны) – полимеры, построенные не менее чем из 11 моносахаридных единиц. Они могут состоять из одного или нескольких типов моносахаров. Соответственно различают гомополисахариды и гетерополисахариды. Полисахариды – обязательные компоненты всех организмов, составляют большую часть углеводов, встречающихся в природе, преобладающую долю в биомассе растений, а, следовательно, и основную массу органического вещества на Земле.

Полисахариды встречаются в виде самостоятельных полимеров, а также в комплексах с нуклеиновыми кислотами, белками, липидами, фосфатом. Разнообразны они по мономерному составу и структуре. Особым разнообразием отличаются полисахариды микроорганизмов. Некоторые из них близки или идентичны полисахаридам растений и животных. Но подавляющее большинство микробных полисахаридов имеет уникальную структуру, специфическую для вида или для серологической группы вида. В микробных гликанах часто обнаруживаются ранее неизвестные моносахара, которые не встречаются ни у животных, ни у растений.

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

О том, что слизь, образуемая многими микроорганизмами, может иметь углеводную природу, знали еще во времена Пастера. Однако особое внимание микробным полисахаридам стали уделять лишь с начала 20-х годов нашего столетия, когда узнали, что вещества, определяющие серологическую специфичность пневмококков, являются полисахаридами. В настоящее время исследование микробных полисахаридов приобрело особое значение в связи с открывшейся возможностью широкого применения их в медицине и ряде областей народного хозяйства.

Полисахариды микроорганизмов в соответствии с локализацией делятся на внутриклеточные и внеклеточные. К внутриклеточным относят обычно полисахариды цитоплазмы, мембран и клеточных стенок, а к внеклеточным – полисахариды капсул, чехлов (пристеночные структуры) и свободной слизи, не прилегающей к клеточной стенке.

Термин «экзогликаны» применяют в основном к полисахаридам свободной слизи. Иногда экзогликанами называют также капсульные полисахариды.

Характеристика декстранов

Декстраны $((C_6H_{10}O_5)_n)$ являются группой бактериальных полисахаридов, состоящих из остатков α -D-глюкопиранозы. Молекулы декстранов имеют разветвленные цепи, линейная часть которых содержит главным образом 1-6-связи и небольшое количество 1-3-связей. Разветвления в молекуле декстранов образуются с помощью 1-2-, 1-3- или 1-4-связей. Боковые ветви молекулы состоят обычно из одного или двух остатков глюкозы, реже встречаются более длинные боковые цепи (рисунок 18.1).

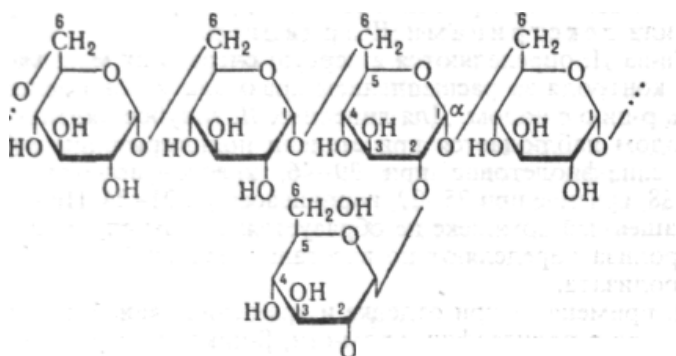


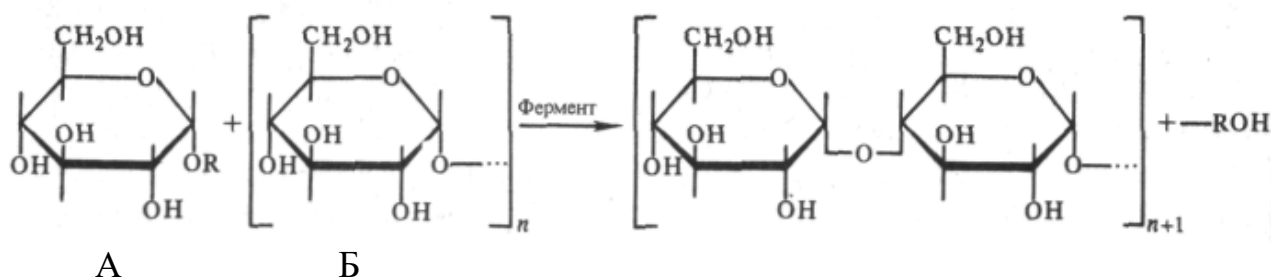
Рисунок 18.1 – Молекула декстрана

Наиболее активные продуценты декстранов - представители молочнокислых бактерий *Leuconostoc mesenteroides* и *L. dextranicum*.

Глава 18. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ДЕКСТРАНОВ

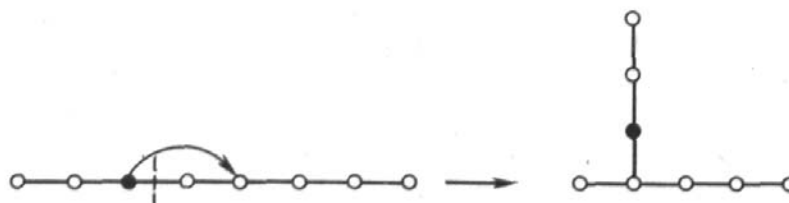
Декстраны синтезируются также некоторыми видами *Streptococcus* (*Str. sanguis*, *Str. mutans*), *Brevibacterium*, *Lactobacillus*. Практически каждый продуцент синтезирует свой, несколько отличный от других видов декстран. Некоторые штаммы образуют одновременно два различных по структуре декстрана.

Бактерии расщепляют сахарозу на глюкозу и фруктозу. Фруктоза сбраживается по типу гетероферментативного молочнокислого брожения с образованием молочной и уксусной кислот, маннита и CO_2 . Глюкоза полимеризуется в декстран. Реакцию образования полисахарида катализирует фермент декстрансахараза, который индуцируется субстратом. Продуцент образует ферменты в больших количествах. В общем виде это можно представить так: гликозильный донор передает гликозил на акцептор-затравку, а сам высвобождается (рисунок 18.2). Полимеризация идет вплоть до образования готового полисахарида. Процесс ветвления полимеров катализируется специфическими «ветвящими» гликозилтрансферазами, отщепляющими фрагменты линейной цепи недостроенного полисахарида и переносящими их на ту же или аналогичную цепь в определенное положение (рисунок 18.3). Образование декстрана происходит с высокой скоростью, и продукт можно выделить уже через 24 ч.



А – донор; Б – акцептор

Рисунок 18.2 – Схема образования гликозидной связи



Особенностью *L. mesenteroides* является то, что они синтезируют

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

экзополисахариды, так как субстрат не проникает в клетки. Экзогликаны образуются, как правило, в значительно большем количестве, чем внутриклеточные полисахариды, легче отделяются от биомассы и очищаются от примесей. Акцепторами при биосинтезе декстранов часто бывают олигосахара, могут быть ими и недостроенные гликаны. Донором моносахаридного остатка может быть сахароза, изредка это олигосахара.

18.2 Технология получения декстранов

Питательная среда

Источник углерода. Большинство микроорганизмов синтезирует полисахариды из всех источников углерода, обеспечивающих их рост: углеводов, спиртов, карбоновых кислот, аминокислот, углеводородов, C₁-соединений. Особенностью *L. mesenteroides* является то, что бактерии могут расти, потребляя различные углеводы, но синтезируют декстран только на средах с сахарозой. В промышленности используют среду с 10–30 % сахарозы.

Для получения декстранов с желаемой степенью полимеризации можно использовать в качестве затравки низкомолекулярные полисахариды. Кроме природы акцептора глюкозы, молекулярная масса определяется концентрацией сахарозы и температурой реакции. Так, при высокой концентрации (70 % по весу) образуются низкомолекулярные декстраны.

Замена сахарозы более дешевым сырьем – мелассой – способствует синтезу более разветвленных декстранов, содержащих менее 70 % α -1,6-гликозидных связей, которые обладают наивысшей биологической активностью, но не пригодны для производства заменителей плазмы крови.

Источник азота. Образование полисахаридов возможно, как правило, при использовании источников азота, способных поддерживать активный рост продуцента. Но природа источника азота может, не изменяя рост микроорганизма, влиять на количественный выход гликанов. Существуют микроорганизмы, для роста которых предпочтительнее один источник азота, а для биосинтеза полисахарида – другой. Для *L. mesenteroides* часто используют органический источник азота.

Повышенные концентрации азота в среде, как правило, отрицательно сказываются на синтезе полисахаридов.

Другие компоненты среды. На биосинтез декстранов могут влиять и другие необходимые для роста микроорганизмов компоненты среды.

Глава 18. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ДЕКСТРАНОВ

Большое значение имеет фосфор. Среда должна содержать неорганический фосфат. Однако повышенное содержание фосфора тормозит синтез многих полисахаридов.

Важное значение имеют различные ионы, необходимые в качестве кофакторов биосинтеза полисахаридов. Так, для *L. mesenteroides* магний способствует синтезу разветвленных декстранов. Поэтому для образования формы, используемой в качестве плазмозаменителя (линейного глюкана), содержание в среде магния ограничивают.

Для обеспечения роста *L. mesenteroides* в среду добавляют также дрожжевой экстракт либо пептон.

Образование гликанов, как правило, не требует дополнительных количеств витаминов сверх необходимого для нормального роста продуцента.

Кислотность среды. Оптимальное значение pH для роста *L. mesenteroides* лежит в пределах 6,5–8,0, а для накопления декстрансахаразы – около 7,0. Обычно значение pH среды задают в интервале 7,0–8,0.

Условия культивирования

Аэрация и температура. Режимы аэрации и температуры, благоприятные для образования того или иного гликана, могут сильно различаться. Большинство микроорганизмов, образующих экзогликаны, – аэробы или факультативные анаэробы, поэтому в условиях хорошей аэрации выход экзогликанов в культурах таких микроорганизмов выше. Однако накопление полисахарида в среде приводит к ограничению доступа кислорода к клеткам, что у аэробных микроорганизмов тормозит синтез гликанов. Избыточное аэрирование может угнетать биосинтез вследствие быстрого окисления углеродного субстрата.

Аэрации при использовании *L. mesenteroides* не требуется, что значительно упрощает технологический процесс.

Максимальное образование гликанов часто происходит при температуре ниже оптимальной для роста культуры. Так, количество декстрана в культуре *L. mesenteroides* увеличивается с уменьшением температуры с 30 до 10°C.

18.3 Технология выделения и очистки декстранов

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

Повышенная вязкость среды делает невозможным отделение полисахарида от клеток продуцента из нативной культуральной жидкости. Поэтому при крупномасштабном производстве не производят удаления продуцента из культуральной жидкости, а пастеризуют ее нагреванием.

Продукт извлекают из культуральной жидкости относительно мягким и простым способом – осаждением органическим растворителем (спиртом). Таким образом, уменьшается вероятность разрушения или модификации полимера.

Однако нативный декстран не пригоден для использования в качестве плазмозамещающего средства, так как имеет очень большую молекулярную массу (ММ) (достигающую сотен миллионов дальтон), значительную вязкость, обладает токсическим действием и изменяет иммунореактивные свойства организма. Высокомолекулярные декстраны (более 150 тыс.) могут привести к агрегации крови. В тоже время препараты с ММ от 40 тыс. и ниже не увеличивают скорость агглюцинации. Поэтому с целью снижения ММ декстран подвергается частичному гидролизу. Можно при необходимости деполимеризовать выделенный декстран ферментативно, термической обработкой или ультразвуком. Из полученной смеси выделяют средномолекулярную фракцию, очищают и на ее основе изготавливают лекарственную форму с заданным молекулярно-массовым распределением. По этому критерию плазмозамещающие средства на основе декстрана делят на две основные группы:

- низкомолекулярные декстраны (ММ 30000–40000);
- средномолекулярные декстраны (ММ 50000–70000).

Осаждать фракции клинического декстрана с нужной ММ из смеси декстранов можно, используя определенные приемы. Так, например, более высокие концентрации спирта позволяют осаждать из раствора декстраны с меньшей ММ, декстраны же с большей степенью полимеризации осаждаются, напротив, при меньших концентрациях спирта.

Для очистки декстран неоднократно растворяют в воде, переосаждают спиртом и фракционируют. Для удаления нежелательных примесей используют также многократную обработку раствора активированным углем. При этом варьируют уровень рН, что способствует изменению растворимости различных присутствующих в растворе веществ.

Технология получения декстрана 40

Глава 18. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ДЕКСТРАНОВ

Продуцентом декстрана 40 является культура *Leuconostoc mesenteroides* (факультативные анаэробы). На жидкой синтетической среде образуют капсулы углеводного происхождения.

Накопление посевного материала (ПМ) производят в два этапа:

1. Выращивание ПМ в пробирках. Массовая доля сахара в среде должна составлять $9,5 \pm 0,5\%$, рН – $6,6 \pm 0,2$. Поддержание штамма в активном состоянии производят путем пересева культуры один раз в двое суток из пробирки в пробирку на свежеприготовленную среду.

2. Выращивание ПМ в колбах. Для выращивания ПМ в колбах вместимостью 1000 мл используют 30 ± 6 часовую культуру *Leuconostoc mesenteroides*, выращенную в пробирках, в количествах 25 ± 1 мл на каждую колбу. Состав среды аналогичный. Засеянную среду в колбах культивируют в течение 30 ± 6 ч.

Ферментация. Питательная среда состоит из 10 компонентов: $MgSO_4$, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NH_4Cl , KCl , соль Мора ($FeSO_4 \times (NH_4)_2SO_4 \times 6H_2O$), парааминобензойная кислота, пептон, сахар и вода для инъекций.

Технологический процесс ферментации состоит из следующих стадий:

1) выращивание посевного материала в инокуляторе. Для засева инокулятора используют ПМ из колб в количестве 10% к объему среды в инокуляторе (3 колбы по 700 мл). ПМ в колбах должен соответствовать следующим требованиям:

- а) внешний вид – мутная густая жидкость;
- б) морфология культуры – цепочки кокков с капсулами;
- в) отсутствие посторонних микроорганизмов;

2) получение нативного декстрана в биореакторе.

Выделение и очистка продукта. Осаждают нативный декстран спиртом этиловым, затем растворяют в воде осадок нативного декстрана и пересаждают декстран спиртом этиловым. После чего растворяют очищенный декстран в воде и проводят гидролиз. Обработывают раствор частично гидролизованного декстрана непирогенным углем и фильтруют через аппарат для выделения высокомолекулярной фракции декстрана. Также отдельно выделяют среднемoleкулярную фракцию. В последующем проводят стерилизацию. Выделяют первичную стерилизацию с активированным углем, фильтрацию и ионообменную очистку раствора декстрана 40 и вторичную стерилизацию раствора с активированным углем,

фильтрацию, корректировку раствора декстрана 40.

Получение декстранов другими методами

Поскольку декстрансахараза в значительной степени выделяется в среду и синтез полимера идет вне клетки, декстраны получают и ферментативным путем. Для этого продуцент выращивается в условиях, обеспечивающих наиболее высокую активность внеклеточного ферментного комплекса. В период максимальной активности декстрансахаразы культуральную жидкость отделяют от клеток и консервируют, снижая значение рН до 5,0–5,2. При такой кислотности и температуре около 15°C декстрансахараза, содержащаяся в культуральной жидкости, сохраняет активность не менее месяца. Ферментационная среда должна содержать сахарозу и декстран-«затравку». Процесс синтеза продолжается около 8 ч. Ферментативный способ удобнее микробиологического, так как он поддается более надежному контролю и регулированию, позволяет одним только варьированием исходных концентраций сахарозы и фермента, а также температуры процесса сразу получать декстран необходимой ММ. Это значительно упрощает и удешевляет последующие технологические операции. Широкое применение в промышленности может найти использование иммобилизованных декстрансахараз.

18.3 Стандартизация лекарственных средств на основе декстранов

Эксклюзионная хроматография (статья Государственной фармакопеи Республики Беларусь второго издания том первый 2.2.30).

Эксклюзионная хроматография представляет собой хроматографический метод, в котором процесс разделения молекул в растворе происходит в соответствии с их размерами. В случае использования органической подвижной фазы метод называют гелепроникающей хроматографией, а в случае использования водной подвижной фазы геле-фильтрационной хроматографией. Проба вводится в колонку, заполненную гелем или пористыми частичками наполнителя, и переносится подвижной фазой через колонку. Разделение в соответствии с размерами происходит в процессе движения и многократных обменов молекул растворенного вещества между молекулами растворителя

Глава 18. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ДЕКСТРАНОВ

подвижной фазы и тем же самым растворителем, находящимся в порах материала, которым заполнена колонка (неподвижная фаза). Диапазон размеров распределенных молекул определяется диапазоном размеров пор наполнителя.

Достаточно маленькие молекулы, способные проникать во все поры материала, элюируются в полном проникающем объеме колонки (V_t , объем пор). Молекулы с размерами, превышающими размер всех пор материала колонки, мигрируют лишь сквозь пространство между частицами наполнителя, не препятствуя им, и элюируются в свободном объеме колонки или объеме эксклюзии (V_0 , объем пустот). Разделение молекул в соответствии с размерами происходит между объемом эксклюзии и полным проникающим объемом колонки; наиболее эффективное разделение происходит в первые две трети данного диапазона.

Специфичной частью оборудования является хроматографическая колонка с различными длиной и внутренним диаметром, заполненная материалом, который обеспечивает разделение молекул соответствующих размеров в необходимом диапазоне. При необходимости колонку термостатируют. Через колонку с постоянной скоростью пропускают элюент. К одному концу колонки обычно присоединяют приспособление для введения пробы, например, инжектор с прерывателем потока, шприцевой инжектор с мембраной или инжектор с клапаном. К этому же концу колонки также может быть присоединен соответствующий насос для подачи элюента с контролируемой скоростью. Проба может также наноситься непосредственно на сухую поверхность материала колонки или, если вязкость пробы превышает вязкость элюента, может наслаиваться на поверхность материала колонки под элюент. Другой конец колонки обычно присоединяют к соответствующему детектору с приспособлением, регистрирующим и обеспечивающим контроль соответствующих концентраций распределенных компонентов пробы. Обычно используют следующие детекторы: фотометрический, рефрактометрический или люминесцентный. В качестве наполнителя может использоваться или мягкий носитель, такой как набухший гель, или твердый – пористое стекло, силикагель или подходящий для данного растворителя поперечносшитый органический полимер.

Определение относительного компонентного состава смеси. По возможности постоянно контролируют элюирование компонентов и измеряют площади соответствующих пиков. Если контроль пробы

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

проводится по физико-химическим свойствам, по которым все интересующие компоненты обладают одинаковыми откликами (например, они имеют одинаковое удельное оптическое поглощение), относительное содержание каждого компонента рассчитывают, как отношение площади пика соответствующего компонента к сумме площадей пиков всех компонентов. Если отклики компонентов по детектируемому свойству отличаются, содержание каждого компонента рассчитывают с помощью градуировочных графиков, полученных с использованием соответствующих стандартных образцов.

Определение молекулярных масс. Для молекулярных масс стандартных образцов строят график зависимости объема удерживания от логарифма молекулярных масс. На основании этого графика могут быть рассчитаны молекулярные массы.

Молекулярно-массовое распределение декстранов (статья Государственной фармакопеи Республики Беларусь второго издания том первый 2.2.39).

Контроль качества декстрана 40, 60 и 70 для инъекций (статьи Государственной фармакопеи Республики Беларусь второго издания том второй 07/2016:0999, 07/2016:1000 и 07/2016:1001).

Описание. Белый или почти белый порошок. Очень легко растворим в воде, очень малорастворим в 96% спирте.

Идентификация. Удельное оптическое вращение от +195 до +201. Спектрометрия в ИК-области. Молекулярно-массовое распределение декстранов.

Испытания на чистоту: прозрачность, цветность, кислотность/щелочность, азотсодержащие вещества, остаточные количества органических растворителей, молекулярно-массовое распределение декстранов, тяжелые металлы, потеря в массе при высушивании, сульфатная зола, бактериальные эндотоксины, микробиологическая чистота.

18.4 Лекарственные средства на основе декстранов, зарегистрированные в РБ

Лекарственные средства на основе декстранов могут применяться:

1. При нарушении капиллярного кровотока. Для профилактики и лечения травматического, операционного и ожогового шока.

Глава 18. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ДЕКСТРАНОВ

2. При нарушении артериального и венозного кровообращения. Для профилактики и лечения тромбозов и тромбофлебитов, эндартериитов, болезни Рейно.

3. При операциях на сердце, проводимых с использованием аппарата искусственного кровообращения для добавления к перфузионной жидкости.

4. В сосудистой и пластической хирургии. Для улучшения местной циркуляции и уменьшения тенденции к тромбозам в трансплантате.

5. Для дезинтоксикации при ожогах, перитоните и др. Препарат противопоказан при тромбоцитопении, при заболеваниях почек, сопровождающихся анурией, при сердечной недостаточности и в случаях, когда нельзя вводить большие объемы.

Как показали исследования, реополиглюкин теряет свои свойства при замораживании. Устойчив при комнатной температуре. Выдерживает стерилизацию при температуре 120°C в течение 30 мин.

Реополиглюкин (Rheopolyglucinum), реодекс, реомакродекс – 10 % коллоидный раствор полимера (частично гидролизованного декстрана, синтезируемого штаммом *Leuconostoc mesenteroides*) с молекулярным весом 30000-40000 с добавлением 0,9 % хлорида натрия.

Декстран 40. Раствор для инфузий во флаконах объемом 200 и 400 мл. Содержит активное вещество: декстран 40 и вспомогательные вещества: натрия хлорид, вода для инъекций.

Белреополиглюкан. Раствор для инфузий 100 мг/мл.

Микродез. 10 % раствор декстрана модифицированного в растворе натрия хлорида (400 мл).

Полиглюкин. Раствор декстрана водного 6 %.

Неорондекс. 6 % водный раствор декстрана модифицированного.

Декстран 60. Раствор для инфузий во флаконах объемом 200 и 400 мл. Содержит активное вещество: декстран 60 и вспомогательные вещества: натрия хлорид, вода для инъекций.

Полиглюкин. Раствор для инфузий 60 мг/мл.

Глава 19

Технология получения и стандартизация ферментов

Вопросы для самоподготовки

1. *Общая характеристика, номенклатура лекарственных средств на основе ферментов.*
2. *Биотехнологические способы получения ферментов.*
3. *Способы выделения и очистки ферментов.*
4. *Иммобилизация ферментов, способы иммобилизации.*
5. *Методы оценки активности ферментов.*

19.1 Общая характеристика, номенклатура лекарственных средств на основе ферментов

Ферменты, или энзимы – это биологические катализаторы, обладающие способностью специфично влиять на многие химические превращения как в живой клетке, так и вне организма. Ферменты практически нетоксичны, работают при нормальных условиях (значение рН близко к нейтральной реакции среды, температура от 20 до 40 °С) с высокой скоростью, обладают стереоспецифичностью, избирательностью (образуется небольшое количество побочных продуктов, один фермент, как правило, катализирует одну реакцию или группу реакций) и высокой эффективностью действия, сохраняют свои свойства вне клетки. Ферменты – это высокомолекулярные вещества с молекулярной массой от 10000 до 1000000.

Ферменты, как и другие белки, чувствительны к изменениям рН и температуры, т.е. реакции, катализируемые ферментами, протекают при строго определенных оптимальных диапазонах рН и температуры (при которых скорость ферментативной реакции максимальна). При изменениях

Глава 19. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

pH и температуры, выходящих за пределы оптимума, скорость реакции снижается.

Номенклатура и применение в медицине лекарственных средств на основе ферментов

В настоящее время около 100 из 3000 известных ферментов применяются в производстве. Фармацевтическая промышленность выпускает примерно 50 ферментных лекарственных средств, представляющих собой индивидуальные ферменты или смеси.

Ферменты широко используют для заместительной терапии при лечении большого числа заболеваний. Амилазы, липазы, пепсин, трипсин и химотрипсин (в виде ферментных лекарственных средств и их комбинаций – фестал, панзинорм, мезим и др.) применяют для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта и печени. Протеазы – для лечения злокачественных новообразований; плазмин (фибринолизин), стрептокиназу, стрептодеказу, урокиназу, целиазу – для растворения тромбов в кровеносных сосудах; 3-галактозидазу – для восстановления способности к усвоению молочных продуктов у людей, страдающих недостаточностью этого фермента в желудочно-кишечном тракте. Эластаза задерживает развитие атеросклероза. Рибонуклеаза используется как антифлогистик при заболеваниях дыхательных путей; аспераза, террилитин, терридеказа, профезим, ораза – как протеолитические средства, пенициллиназа – антиаллергическое средство.

Изменение уровня активности определенного фермента или соотношения его множественных форм и изоферментов позволяет проводить диагностику заболевания того или иного органа (энзимодиагностика). Например, повышение в сыворотке крови активности фруктозо-1,6-дифосфатаальдозазы свидетельствует об инфекционном гепатите, раке печени, инфаркте миокарда; повышение в плазме крови активности креатинкиназы – о мышечной дистрофии, а возрастание активности аланинаминотрансферазы – о болезнях печени и т.д.

19.2 Биотехнологические способы получения ферментов

Источниками для крупномасштабного выделения ферментов служат организмы, в которых содержание требуемого фермента составляет не менее 1%. К ним относятся бактерии, некоторые растения (проростки злаков,

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

бобовых), отдельные ткани и органы животных (слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта).

Однако с точки зрения технологии получения и по экономическим соображениям выгоднее получать ферменты с помощью микроорганизмов, которые продуцируют более двух тысяч ферментов в больших количествах за короткое время с использованием дешевых исходных веществ.

Культивирование продуцентов ферментов

Амилазы продуцируются различными микроорганизмами (*Bacillus*, *Aspergillus*); декстраназа синтезируется *Penicillium purpurogenium*; инвертаза синтезируется многими представителями рода *Aspergillus*.

Среди продуцентов протеиназ встречаются *Aspergillus*, *Actinomyces*, *Clostridium* и *E. coli*. Продуценты липаз – микроорганизмы (*Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Candida*).

При культивировании микроорганизмов, продуцирующих ферменты, имеет место катаболическая репрессия (глюкозный эффект) – подавление синтеза многих ферментов (α -амилазы, целлюлазы, глюкоамилазы, инвертазы) легкоусвояемыми углеводами (глюкозой, фруктозой, маннозой и т.п.).

Синтез ферментов, катализирующих превращение азотсодержащих субстратов, репрессируется ионами аммония и быстроусвояемыми аминокислотами. В анаэробных условиях аминокислоты индуцируют синтез декарбоксилаз. Большая концентрация мочевины индуцирует синтез уреазы, введение в среду аргинина – аргиназы. Источниками органического азота для культуральных сред при получении ферментов служат пептон, триптон, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина и их смеси.

Биополимеры способствуют одновременному накоплению комплекса протеаз, амилаз, нуклеаз и липаз.

Ионы железа и магния активируют и стабилизируют протеазы. Ионы железа и меди влияют на биосинтез ферментов, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях. Недостаток данных ионов негативно сказывается на метаболизме и биосинтезе ферментов, катализирующих такие превращения.

Биотехнологическое производство ферментов реализуется двумя способами: поверхностным и глубинным. Твердофазная поверхностная ферментация заключается в выращивании продуцента на поверхности тонкого слоя сыпучей среды. Глубинная ферментация в жидкой среде может

Глава 19. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

быть реализована как в условиях периодического процесса, так и с применением проточных систем.

При *поверхностной ферментации* для получения инокулята споровый материал размножают поверхностным способом или выращивают музейную культуру в условиях глубинной жидкой культуры. Далее посевной материал направляют на стадию ферментации, которая осуществляется на поверхности сыпучей среды в металлических лотках или вертикальных перфорированных с обеих сторон кюветах. Культура развивается на поверхности рыхлой среды, основу которой составляют пшеничные отруби, зерновая шелуха, являющиеся источником ростовых веществ. Для разрыхления среды в отруби добавляют древесные опилки (5–10%), овсяную шелуху. Смесь перед автоклавированием увлажняют до 20–40% содержания влаги и подкисляют для улучшения условий стерилизации. Прогрев сыпучей среды осуществляют острым паром в специальных стерилизаторах при непрерывном перемешивании среды; длительность процесса – 60–90 минут при 105–140°C. В охлажденную до 30°C среду вносят стерильные термолабильные компоненты, инокулят (0,02–0,1% от массы среды), быстро перемешивают ручным способом и раскладывают слоем 2–3 см в лотки, которые устанавливают в герметичные аэрируемые камеры, предварительно простерилизованные. Исходная влажность среды – 58–60%, температура культивирования 28–32°C, длительность ферментации около 36–48 ч.

В течение первых 10–12 ч происходит прорастание конидий при 28°C. В последующие 14–18 ч реализуется быстрый рост мицелия, в этот период потребляется основное количество питательных веществ из среды при максимальном термогенезе. Аэрация становится максимальной (до 60 объемов стерильного воздуха на объем камеры/ч). Для предотвращения высыхания конидий в результате повышения температуры влажность воздуха повышают практически до 100%. Вследствие больших расходов воздуха принята его рециркуляция. В этот период скорость образования фермента достигает максимальных значений. В последующие 12–18 ч процессы метаболизма ослабевают, но синтез ферментов еще продолжается. Мицелий обволакивает и прочно скрепляет твердые частицы среды, поэтому для нормального транспорта и окисления веществ среда должна быть достаточно рыхлой и влажной. Эффективный транспорт кислорода из газовой фазы и растворение в среде происходит при условии хорошей аэрируемости довольно тонкого слоя твердой сыпучей среды. Это приводит к необходимости использования больших объемов производственных

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

площадей. Поверхностный метод ферментации является экстенсивным методом с большой долей ручного труда. При этом, однако, он не энергоемок и обеспечивает более высокий выход продукта на единицу массы среды по сравнению с глубинной ферментацией.

Поверхностная ферментация с использованием вместо лотков кювет более совершенна. Конструкция обеспечивает более эффективную аэрацию и позволяет частично механизировать процесс. Применяемые в промышленности колонные аппараты объемной аэрации еще более улучшают процесс твердофазной ферментации. Такой аппарат разделен на секции перфорированными пластинами, закрепленными на поворотных осях. Среда в ходе ферментации разрыхляется с помощью вращающихся перемешивающих устройств. Это позволяет увеличить высоту слоя до 30 см. Режим перегрузки среды на тарелках задается автоматически. Производительность аппарата достигает 1 т культуры в сутки.

После завершения стадии ферментации выросшая культура представляет собой корж (пек) из набухших частиц среды, плотно связанных разросшимся мицелием. Данную массу измельчают с помощью дробилок различного типа (барабанно-зубчатых, шнековых, молотковых) до частиц размером 5–6 мм.

Глубинный способ микробиологического получения ферментов имеет преимущества по сравнению с поверхностным, так как проходит в контролируемых условиях ферментации, исключает ручной труд, позволяет автоматизировать процесс. Питательная среда для ферментации готовится, исходя из потребностей используемой микробной культуры, а также из типа целевого фермента. Основным углеродным сырьем служат различные сорта крахмала (кукурузный, пшеничный, картофельный), кукурузный экстракт, свекловичный жом, а также редко глюкоза, мальтоза, декстрины. В качестве источника азота применяют органические соединения (гидролизаты казеина или микробных биомасс), а также минеральные соли (NaNO_3 , NH_4NO_3 , NH_4HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

На предферментационной стадии технологическое оборудование и питательная среда подвергаются стерилизации. После охлаждения среды до 30°C в нее вносят выращенный инокулят (2–5 % от объема производственной культуры). Процесс проводят в цилиндрических аппаратах объемом до 100 м^3 . Синтез фермента в глубинной культуре протекает в течение 3–4 суток при непрерывной подаче стерильного воздуха, стабилизации рН и температуры среды на строго определенных

Глава 19. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

уровнях. Небольшие изменения данных параметров могут вызвать многократное снижение ферментативной активности.

В течение первого периода (24–30 ч) мицелий бурно развивается и идет быстрое потребление легкоусвояемого субстрата. Далее в среду вносят индуктор. После этого начинается интенсивный синтез целевого фермента. Периодически в среду вносят стерильный пеногаситель, добавку углеродного субстрата, раствор для коррекции и стабилизации pH.

Процесс образования биомассы продуцента не совпадает во времени с максимумом продукции фермента, при этом условия для образования фермента могут существенно отличаться от условий для оптимального режима синтеза биомассы. Поэтому условия среды в ходе протекания процесса ферментации контролируются и изменяются. Известны стадийные процессы в двух последовательных аппаратах. В первом создают условия для развития мицелия; во втором – для синтеза и накопления фермента. На промышленном уровне реализованы также проточные режимы.

После завершения ферментации для предотвращения инактивации ферментов культуральную жидкость охлаждают до 3–5°C и направляют на обработку. После отделения мицелия культуральную среду освобождают от грубых взвешенных частиц и концентрируют под вакуумом или подвергают ультрафильтрации. В связи с термолабильностью многих ферментов процессы обработки ведут при контролируемых, часто пониженных температурах.

19.3 Способы выделения и очистки ферментов

Большинство ферментов являются внеклеточными (т.е. накапливаются в культуральной жидкости). Но некоторые могут содержаться внутри клеток.

Процесс выделения и очистки ферментов состоит из следующих стадий: отделение культуральной жидкости от биомассы (сепарация), концентрирование и фракционирование, хроматографическая очистка.

Фильтрация. При пропускании вязкой и склонной к гелеобразованию культуральной жидкости, содержащей биополимеры (ферменты), через фильтры осадок сжимается и закупоривает поры фильтра. Во избежание этого применяют крупнопористые материалы: диатомит, кизельгур, бентонит и т.п. При фильтрации может происходить денатурация

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

и сорбция некоторых ферментов, во избежание этого добавляют этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА).

Сепарацию осуществляют при помощи центрифугирования.

Ферменты в клетке находятся в виде комплексов с другими биополимерами.

Дезинтеграция осуществляется при помощи механического воздействия (баллистических, ультразвуковых, экструзионных и ферментативных методов). Для удаления взвешенных нерастворимых частиц после дезинтеграции (ферменты находятся в растворенном состоянии) применяют высокоскоростное центрифугирование. При этом образуется прозрачный раствор, содержащий ферменты и низкомолекулярные соединения.

Собственные протеазы после удаления сопутствующих белков в растворе инактивируют ферменты, которые остаются единственными белковыми субстратами, что ведет к потере каталитической активности.

Удаление клеточных протеаз, которые способны разрушить целевые ферменты, осуществляют обработкой ингибиторами-комплексонами (ЭДТА, о-фенантролином, оксихинолином), солями ртути или серебра. Также протеазы удаляют при помощи аффинной хроматографии. Если фермент термостабилен, а протеазы термолабильны, то последние удаляют нагреванием.

Удаление нуклеиновых кислот. Для осаждения нуклеиновых кислот в виде комплексов используют бромистый цетилтриметиламмоний, стрептомицинсульфат, протаминосульфат, полиэтиленмин. Полнота осаждения зависит от рН, ионной силы, концентрации осадителя и белка. Также нуклеиновые кислоты удаляют путем их гидролиза нуклеазами (панкреатические ДНК-аза и РНК-аза).

Широко используют метод *фракционирования белков нейтральными солями* или *органическими растворителями*. Соль (аммония сульфат), растворяясь, связывает воду, в результате изменяется степень гидратации молекул белка, что приводит к их агрегации и образованию осадка. Аммония сульфат стабилизирует многие ферменты.

При смешивании с водой органического растворителя (этанола, ацетона) изменяется ее диэлектрическая константа и происходит замена молекул воды на молекулы растворителя, в результате ускоряется образование нерастворимых белковых агрегатов. Эти операции проводят при температуре не выше – 10°C, используя охлажденные сухим льдом

Глава 19. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

растворители. Растворители удаляют диализом или ультрафильтрацией через гель.

Для хроматографического фракционирования используют ионообменную, аффинную хроматографию и гель-фильтрацию. При этом к сорбентам, образующим гели, относят кальция фосфат, алюминия гидроксид, цинка гидроксид, древесный уголь. Значение рН слабокислое (5,0–6,0).

Ионообменная хроматография. Сорбенты – сополимеры метакриловой кислоты и различных гидрофобных мономеров, натуральные и синтетические полисахаридные иониты (гранулированные ионообменные целлюлозы, которые являются не только анионитами, но и катионитами).

Для удаления неактивных белков, пигментов и т.п. колонку промывают щелочами, водой, кислотами и затем снова водой, иногда для удаления липофильных веществ промывку проводят органическими растворителями или детергентами. Конечный этап – промывка буферным раствором. Таким образом, сорбент регенерируют.

Аффинная хроматография – метод, где сорбентом служит полимерный гель, с которым фермент или группа ферментов взаимодействуют избирательно с образованием стабильной связи. В результате чего из многокомпонентной смеси белков лишь один фермент (группа ферментов) задерживается на колонке (переходит из раствора в нерастворимый сорбент), а все сопутствующие вещества выходят с током растворителя. Чем больше белков связывает сорбент, тем меньше его селективность (идеальный вариант – связывание одного фермента). Центром связывания служат лиганды, присоединенные к матрицам (субстраты, их аналоги, обратимые ингибиторы, коферменты, антитела и др.). Лиганд специфически взаимодействует с активным центром фермента.

В качестве матрицы используют полимеры с крупнопористой (для проникновения молекул фермента внутрь) гидрофильной (для обеспечения отсутствия взаимодействия белков со специфическими гидрофобными центрами) гелевой структурой, отсутствием заряженных групп (для исключения образования неспецифических электростатических связей) и достаточной химической, механической, микробиологической стойкостью. В качестве таких сорбентов широко применяют модифицированные агарозы (недостаток: низкая механическая и микробиологическая стойкость, дороговизна).

Гель-фильтрация проводится на сефадексах – модифицированных производных линейного полисахарида декстрана. Для разделения

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

крупномолекулярных смесей применяют поперечно сшитые акриламидные гели (ультрагели) и поперечно сшитую агарозу. Сефакрилы – декстраны, поперечно сшитые акриламидом – используют для разделения белков с молекулярной массой 10^5 и 10^7 . Используют как натуральные и полусинтетические гели, так и синтетические (оксиакрилметакрилатные гели-сфероны).

Метод имеет следующие преимущества: не требует обессоливания пробы, корректировки рН и наличия корректирующих буферов. Продвигаясь по гелю, смесь освобождается от солей и распределяется в порядке уменьшения молекулярной массы: сначала выходят самые крупные молекулы, затем меньшие и в конце – соли.

19.4 Иммобилизация ферментов, способы иммобилизации

Лекарственные средства чистых ферментов имеют ряд недостатков: они достаточно дороги, нестабильны (чувствительны к действию температуры и рН), инактивируются в организме и при выделении, быстро разрушаются при хранении либо требуют специальных условий хранения (низкая отрицательная температура до -80°C , добавление коферментов и субстратов), их невозможно использовать многократно, трудно отделить от исходных субстратов и продуктов реакции. Ферменты как и другие белки могут являться для организма чужеродными антигенными структурами.

Иммобилизованными называют такие ферменты, которые выделены из клетки, искусственно закреплены на носителе и сохраняют свойственную им каталитическую активность.

Иммобилизация – это технология, согласно которой молекулу фермента включают в какую-либо фазу или соединяют с нерастворимым носителем. Комплекс «фермент – носитель» отделен от раствора, но при этом может обмениваться с ним молекулами субстрата, эффектора или ингибитора. Иммобилизацию проводят в строго асептических условиях.

По сравнению со свободными ферментативными лекарственными средствами, иммобилизованные ферменты имеют существенные преимущества:

Глава 19. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

- они обладают высокой стабильностью, в несколько тысяч раз превышающей стабильность свободных ферментов;

- они легко отделимы от реакционной среды, что позволяет получать более чистые продукты реакции;

- иммобилизация дает возможность многократно использовать ферментативное лекарственное средство;

- иммобилизованные ферменты технологичны, что позволяет либо вести процесс непрерывно, регулировать его скорость и, соответственно, выход продукта, либо в любой момент остановить реакцию;

- с помощью подбора носителей и методов иммобилизации можно целенаправленно изменять некоторые свойства ферментов (специфичность, рН- и температурозависимость, стабильность) для оптимизации процесса.

Носители для иммобилизации ферментов должны обладать определенными свойствами:

- высокой биологической и химической стойкостью;

- нерастворимостью;

- высокой механической прочностью;

- значительной гидрофильностью, которая обеспечивает связывание фермента с носителем в водной среде;

- достаточной проницаемостью для ферментов, коферментов, субстратов и продуктов реакции, пористостью, большой удельной поверхностью;

- легкостью активации комплекса «фермент – носитель»;

- возможностью создания различных структур (мембран, пластин, трубочек, гранул);

- низкой стоимостью.

В зависимости от структуры, носители подразделяют на природные и синтетические, органические и неорганические, полимерные и низкомолекулярные.

Природные полимерные носители по своей химической природе подразделяют на белковые (кератин, фиброин, коллаген, желатин); полисахаридные (целлюлоза, декстран, агароза, каррагинин, альгиновые кислоты и их соли); аминополисахаридные (хитин, хитозан) и липидные (фосфолипиды).

Синтетические полимерные носители подразделяют на три группы: полиметиленовые, полиамидные и полиэфирные. При производстве

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

синтетических полимеров можно значительно разнообразить их форму (гранулы, трубочки и т.д.), варьировать величину пор, вводить различные функциональные группы.

Носители неорганической природы могут быть представлены материалами из глины, стекла, керамики, силикагеля, графитовой сажи, а также оксидами металлов и т.д. Преимущества этой группы носителей состоят в легкости регенерации, возможности получения любой их формы при производстве и вариабельности размера пор.

Методы иммобилизации ферментов

Иммобилизацию ферментов можно осуществлять физическими и химическими методами.

Физические методы основаны на адсорбции фермента на нерастворимом носителе, на включении фермента в поры поперечносшитого геля, в полупроницаемые структуры.

Адсорбция ферментов на нерастворимом носителе. Молекула фермента удерживается на поверхности носителя благодаря электростатическим, гидрофобным, дисперсионным взаимодействиям или возникновению водородных связей. Прочность связывания фермента с носителем небольшая. Поэтому при незначительных изменениях условий (рН, ионной силы, температуры, растворителя) может происходить десорбция фермента.

Фермент и носитель смешивают, инкубируют и отделяют нерастворимый компонент смеси от растворимого центрифугированием или фильтрованием. Это мягкий способ иммобилизации, слабо влияющий на каталитическую активность фермента.

Материалы для получения носителей: сефадекс, алюминия оксид, бентонит, кальция карбонат, кальция фосфат (гель), активированный уголь, целлюлоза, глина белая, ионообменные смолы, силикагель.

Иммобилизация ферментов путем включения в гель (обычно – полимерный гель). Метод обеспечивает равномерное распределение фермента в объеме носителя. Достаточно прост и применяется для иммобилизации отдельных молекул определенного энзима, мультиферментных комплексов и интактных клеток. Однако он непригоден для работы с ферментами, которые воздействуют на водонерастворимые субстраты.

Гель должен иметь хорошую систему пор для газообмена. Наиболее часто используют полиакриламидные гели, т.к. они не обладают ионными

Глава 19. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

свойствами и не изменяют рН. При этом важным моментом остается полная полимеризация геля (полная сшивка) и удаление из него кислорода.

Также используют гель кальция альгината, каррагинина и агара. При работе с каррагинином и агаром фермент должен быть устойчив к нагреванию до 40°C. Агар, нагретый до температуры, когда он остается жидким, смешивают с ферментом в реакторе с непрерывным режимом работы или в режиме псевдооживления. При таком способе фермент оказывается заключенным внутри ячеек геля. При этом должен обеспечиваться доступ к ферменту субстрата.

Иммобилизация в полупроницаемые структуры. В этом случае раствор фермента и раствор субстрата разделяют с помощью полупроницаемой мембраны (микрокапсулирование, включение в липосомы).

Использование **химических методов** приводит к возникновению ковалентных связей между ферментом и носителем. Этот способ получения промышленных биокатализаторов наиболее распространен. Химическое присоединение энзима к носителю отличается высокой эффективностью и прочностью связи. Однако химические методы иммобилизации сложны и дороги. Важным остается защита активного центра фермента от взаимодействия с носителем, что предотвращает потерю активности.

Иммобилизация на носителях, несущих гидроксильные группы. В этой группе наиболее распространен бромциановый метод, который позволяет связывать фермент с полисахаридным или синтетическим носителем.

Иммобилизация на носителях, несущих аминогруппы. Аминогруппы носителя превращают в соли диазония, к которым впоследствии присоединяют молекулы ферментов за счет взаимодействия с фенольными, аминными, имидазольными, тиольными, гуанидиновыми группами этих ферментов.

Иммобилизация на носителях, несущих сульфгидрильные группы. Если и носитель, и фермент несут сульфгидрильные группы, то под воздействием кислорода воздуха эти группы легко окисляются с образованием дисульфидных связей.

Иммобилизация металлохелатным методом. Переходные металлы (титан, цирконий, хром, железо, ванадий, олово) образуют с производными целлюлозы и силикагелями гелеобразные гидратированные комплексы, в которые включается фермент. При этом не происходит потери его ферментативной активности.

19.5 Методы оценки активности ферментов

Активность фермента выражается в стандартных единицах активности. Стандартная единица активности – эта величина для любого фермента обозначает то количество его, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при заданных регламентированных условиях. Эта единица обозначается буквой E или U.

Условия при установлении активности фермента: температура 30°C; определение активности по начальной скорости реакции, когда концентрация субстрата достаточна для насыщения фермента и соответствует кинетике реакции нулевого порядка. Концентрации субстрата, фермента и pH выбирают оптимальными для каждого фермента.

Если количество прореагировавшего субстрата очень мало или велико, допускается выражение результатов в миллиединицах (мЕ или мU) и килоединицах (кЕ и кU).

Содержание фермента в лекарственном средстве условно выражается в стандартных единицах активности фермента на 1 мл ферментного раствора или 1 г средства. Активность ферментного средства выражается в микромолях субстрата, прореагировавшего в присутствии 1 мл ферментного раствора или 1 г средства в заданных условиях за 1 мин. Число микромолей и будет равно числу стандартных единиц. Если фермент гомогенен, то его удельная активность может быть выражена в стандартных единицах на 1 мг фермента. Если же средство содержит балласт в виде неактивного белка, его удельная активность выражается в стандартных единицах на 1 мг белка в ферментном средстве.

Молекулярная активность представляет собой число миллимолей субстрата или эквивалентов затронутой реакцией групп, прореагировавших в течение 1 мин с 1 ммоль фермента при оптимальных концентрациях субстрата, или число стандартных единиц, содержащихся в 1 ммоль фермента.

Способы оценки активности

Спектрофотометрические методы. Эти методы отличаются высокой чувствительностью, быстротой определения, малым расходом фермента, реактивов и позволяют следить за протеканием реакции во времени. Для этого реакционную смесь помещают в термостатируемую кювету. Через малый промежуток времени после добавления фермента (или субстрата) и быстрого перемешивания измеряют

Глава 19. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

оптическую плотность при длине волны, характерной для используемого субстрата или конечного продукта, образующегося в данной реакции.

Необходимо иметь произвольно выбранную единицу фермента, с помощью которой можно было бы количественно выразить чистоту и активность различных фракций. В большинстве случаев выбор единицы зависит от избираемого метода определения. В случае спектрофотометрического метода такой единицей может служить количество фермента, которое вызывает определенное изменение в оптической плотности за определенное время при данных условиях опыта; если определяется продукт реакции, то единицей будет количество фермента, которое вызывает образование определенного количества вещества в 1 минуту, и т.п. Тогда удельную активность фермента, которая является мерой чистоты ферментного средства, выражают числом единиц в 1 мг вещества (белка).

К разновидностям таким методов относят метод Горнелла (измеряют поглощение продукта биуретовой реакции в диапазоне длин волн: от 550 до 650 нм), биуретовые микрометоды, метод Фолина-Чокальтеу (основан на взаимодействии фермента с фосфорномолибденово-вольфрамовым реактивом в слабощелочной среде с образованием продуктов, окрашенных в синий цвет).

Для целей определения ферментов могут быть использованы не только измерение поглощения света, но также измерения флуоресценции – *спектрофлуориметрические методы*. Такое определение активности фермента в ряде случаев по чувствительности превосходит спектрофотометрические методы на целый порядок. Некоторые коферменты и субстраты обладают сильной флуоресценцией. НАД и НАДФ в восстановленном состоянии имеют сильную флуоресценцию и не флуоресцируют в окисленном состоянии.

Манометрические методы. Эти методы используют при определении активности фермента в тех случаях, когда в исследуемых реакциях один из компонентов находится в газообразном состоянии. К таким реакциям относятся, главным образом, те, которые связаны с процессами окисления и декарбоксилирования, сопровождающимися поглощением или выделением кислорода, или углекислого газа, а также реакции, в которых выделение или связывание газа происходит в результате взаимодействия продуктов ферментативного превращения с добавленным в систему реактивом. Наблюдение за ходом реакции во времени проводится в специальных приборах – манометрических аппаратах Варбурга.

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

Также используются и *другие методы*: титриметрия, поляриметрия, вискозиметрия, потенцио- и кондуктометрические измерения и т.п. Определение активности можно выполнять, используя методы хроматографии и электрофореза. Эти методы высокочувствительны и специфичны, что делает их во многих случаях незаменимыми; они позволяют значительно сократить расход фермента на измерение активности, но не всегда применимы ввиду продолжительности разделения веществ в процессе хроматографирования или электрофореза.

Определение амилалитической активности панкреазима (не менее 5600 амилалитических ЕД)

Измельченные таблетки без оболочки растворяют в фосфатном буферном растворе с рН 6,8. Смешивают с раствором крахмала и выдерживают при 25°C в течение 10 мин. Аналогично поступают с раствором стандартного образца амилазы. По истечении времени добавляют раствор соляной кислоты. Затем добавляют раствор йода и порциями раствор щелочи. Оставляют на 15 мин в темном месте, затем прибавляют раствор серной кислоты и титруют натрия тиосульфатом до обесцвечивания.

Определение липолитической активности панкреазима (не менее 8000 липолитических ЕД)

Измельченные таблетки без оболочки смешивают с буферным раствором с рН 9,0, охлажденным до 5°C. При перемешивании получают суспензию, которую затем растворяют в большем объеме этого же раствора. Испытуемый раствор смешивают с оливковым маслом и выдерживают при 37°C в течение 5 мин. Затем прибавляют спирт и охлаждают. Титруют раствором щелочи в присутствии фенолфталеина до появления розовой окраски. Аналогично поступают со стандартным образцом липазы.

Определение протеолитической активности панкреазима (не менее 370 протеолитических ЕД)

Измельченные таблетки без оболочки смешивают с раствором кальция хлорида, охлажденным до 1°C. Прибавляют раствор энтерокиназы и выдерживают при 35°C в течение 15 мин. Затем добавляют боратный буфер с рН 7,5. Добавляют раствор казеина и выдерживают при 35°C в течение 30 мин. По истечении времени добавляют раствор трихлоуксусной кислоты. Проводят также опыты со стандартным образцом протеазы и холостой опыт. Проводят измерение оптической плотности при длине волны 275 нм.

Глава 20

Технология получения и стандартизация тромболитиков и антикоагулянтов

Вопросы для самоподготовки

1. *Общая характеристика тромболитиков.*
2. *Получение тромболитиков.*
3. *Общая характеристика антикоагулянтов.*
4. *Получение и стандартизация гепаринов.*

20.1 Общая характеристика тромболитиков

Предпосылки к развитию данного вида терапии появились в 1933 году, когда на руках у врача *W.S. Tillet* умирает дочь. Уже тогда он смог связать заболевание своей дочери с несворачивающейся кровью в чашке Петри, в которую она сплевывала мокроту. В 1938 году было доказано выделение β -гемолитическим стрептококком группы А фермента стрептокиназы. В 1940 году описан механизм действия фермента, основанный на его связывании с плазминогеном в крови, приводящей к его переводу в активную форму – плазмин.

1976 год считается годом рождения тромболитической терапии, когда впервые была опубликована статья *Е.И. Чазова* о внутрикороном лизисе тромба при помощи стрептазы. Позже, в 1979 году, эти данные были подтверждены *К.Т. Rentrop*.

Тромболитическая терапия – вид фармакологической терапии, направленный на восстановление кровотока в сосуде за счет лизиса тромба внутри сосудистого русла. Активация фибринолитической активности крови за счет перевода плазминогена в его активную форму – плазмин – основа данной терапии.

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

Средства для тромболитической терапии называют тромболитиками. В отличие от гепаринов, которые только замедляют формирование тромботических масс, данная терапия способствует их разрушению и восстановлению кровотока по закупоренным сосудам. Тромболитическая терапия наиболее эффективна в период до 72 часов от образования тромба.

Применяют ее при: остром коронарном синдроме (инфаркт миокарда), ишемическом инсульте, тромбоэмболии легочной артерии, тромбозах нижних конечностей и клапанного протеза сердца.

Общая характеристика тромболитиков

В настоящее время разработаны *пять поколений тромболитиков*:

I поколение – системные тромболитики: природные активаторы плазминогена (стрептокиназа, урокиназа);

II поколение – фибриноселективные тромболитики: рекомбинантный тканевый активатор плазминогена (rt-PA, альтеплаза, актилиза), рекомбинантная проурокиназа;

III поколение – усовершенствованные rt-PA и другие активаторы плазминогена: фибринспецифичная форма rt-PA – тенектеплаза, негликозилированная форма rt-PA – ретеплаза, rt-PA с длительным периодом полувыведения – ланотеплаза, ацилированный комплекс «стрептокиназа + плазминоген», обеспечивающий направленную доставку к тромбу, фибринактивированный человеческий плазминоген;

IV поколение – усовершенствованные активаторы плазминогена III поколения (биосинтетические);

V поколение – композиции тромболитиков (rt-PA + конъюгат «урокиназа-плазминоген» и др.).

Тромболитики I поколения ограничено применяются в клинических условиях из-за системного действия на гемостаз и высокой частоты геморрагических осложнений. Основную роль в клинической практике играют тромболитики II поколения: rt-PA и рекомбинантная проурокиназа, обладающие малым системным тромболитическим эффектом, действующие преимущественно на свежий тромб и не активирующие факторы свертывания крови V и VII, что существенно снижает риск развития генерализованных геморрагических осложнений.

Рекомбинантный тканевый активатор плазминогена рекомендован к применению в первые 180 мин после развития ишемического инсульта. Следует использовать дозу 0,9 мкг/кг, максимально – 90 мг/сут; 10 % дозы вводится внутривенно струйно, оставшиеся 90 % – внутривенно капельно в

Глава 20. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ТРОМБОЛИТИКОВ И АНТИКОАГУЛЯНТОВ

течение 60 мин.

Применение рекомбинантной проурокиназы сопровождается реканализацией сосуда, но вызывает геморрагические осложнения. Рекомбинантную проурокиназу применяют интраартериально, в сопровождении низких доз внутривенно вводимого гепарина.

Тромболитики III–V поколений пока проходят доклинические и клинические испытания.

20.2 Получение и стандартизация тромболитиков

Получение t-PA (тканевого активатора плазминогена). Содержание данного вещества варьирует в широких диапазонах в различных тканях. Вещество, полученное из матки человека, имеет молекулярную массу (ММ) 69000 и состоит из двух разных по размеру полипептидных цепей, а полученное из сосудов человека – ММ 60000 и состоит из двух одинаковых по размеру цепей. Могут существовать и одноцепочечные формы. Активирует превращение плазминогена в плазмин (протеолитический фермент), который вызывает лизис тромба.

Источник получения mt-PA (меланомный активатор) – клетки меланомы человека. ММ такого полипептида составляет 72000. Могут быть получены одно- и двуцепочечные формы. Клетки меланомы культивируют на среде Игла с добавками натрия гидрокарбоната, L-глутамина и инактивированной нагреванием телячьей сыворотки. Культивируют в монослое. Очистку проводят аффинной хроматографией. Сорбенты: конканавалин А, п-аминобензамидин, имидинодиуксусная кислота, борная кислота, лизин (5 сорбентов).

Имеется рекомбинантная технология получения (rt-PA – рекомбинантный активатор). Используют рекомбинантные штаммы *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*. Ген t-PA локализован в 8-й хромосоме человека. Индуцируют синтез t-PA культурой меланомы, выделяют мРНК, на основе которой получают кДНК. кДНК лигируют с плазмидой pBR322. Полученную рекомбинантную ДНК трансформируют в *E. coli* и определяют полученные трансформанты.

Культивирование рекомбинантного штамма *E. coli* осуществляют в стандартных условиях (L-бульон, 30°C, pH=7,0–7,2, перемешивание, аэрация). Биомассу отделяют от культуральной жидкости центрифугированием, затем ресуспензируют в буферном растворе и

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

обрабатывают ультразвуком для разрушения клеток. Из надосадочной жидкости rt-PA выделяют при помощи аффинной хроматографии. Затем проводят дополнительную очистку при помощи ионообменной хроматографии.

Меланомный и рекомбинантный тканевые активаторы плазминогена фармакологически идентичны.

Определение rt-PA проводят иммуноферментным методом, прямым и непрямым функциональным методом. В прямом функциональном методе синтетический хромогенный или флуорогенный специфический субстрат t-PA инкубируют с образцом и измеряют скорость образования продукта гидролиза субстрата под действием rt-PA. В непрямом функциональном методе плазминоген активируют под действием rt-PA в присутствии субстрата плазмينا и активность rt-PA определяют по гидролизу субстрата образующимся плазмином. К непрямым функциональным методам, в которых используют природный субстрат плазмينا фибрин, относятся методы, основанные на измерении площади зоны лизиса фибриновой пластины или времени полного лизиса фибринового сгустка.

Получение урокиназы. Содержится в моче человека в форме двух полипептидных цепей, соединенных дисульфидными мостиками. Различают высоко- и низкомолекулярную формы с ММ 55000 и 34000 соответственно. Вызывает лизис внутри тромба и не вызывает аллергических реакций. Выделяют одноцепочечную форму (проурокиназа), которая состоит из 411 аминокислот. Содержится в плазме крови.

Получают из культуры клеток почки эмбриона человека или генной инженерией (используют ген урокиназы, локализованный в 10 хромосоме человека, и *E. coli*). Продукт содержит одну или две цепи, что зависит от присутствия протеаз при получении. Рекомбинантная урокиназа обладает лучшей тромбоселективностью и меньшим числом побочных эффектов, чем природный фермент.

Для получения урокиназы используют первичную культуру почки эмбриона человека. Культивирование проводят на среде 199 или RPMI при температуре 35–37°C с добавкой сыворотки эмбриона крупного рогатого скота. После формирования сплошного слоя клеток проводят их промывку физиологическим раствором и добавляют консервирующую жидкость (натрий лактальбумин, натрий гидрокарбонат и глюкоза). В консервирующей смеси выдерживают в течение 9 суток. Затем консервирующую жидкость удаляют, добавляют фенилаланин и пополняют новой средой, которую меняют каждые трое суток в течение 10 дней

Глава 20. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ТРОМБОЛИТИКОВ И АНТИКОАГУЛЯНТОВ

культивирования после добавки фенилаланина. Культивируют в присутствии 5 % углекислого газа. Определяют титр урокиназы в культуральной жидкости. Культуральную жидкость с достаточным содержанием фермента пропускают через колонку, заполненную пористым кремнеземом или лигнином. Колонку промывают буферным раствором с рН 8,0–10,0 от примесей. Сорбированную урокиназу десорбируют 4 % раствором аммиака.

Анализ урокиназы производят путем двухступенчатого метода с помощью йодированной фибрином плитки. В первой стадии урокиназа действует на плазминоген с образованием плазмина, во второй стадии плазмин гидролизует радиоактивно меченый сгущенный фибриноген (фибрин) с выделением фибринопептидов в раствор, количество которых измеряют при помощи гамма-счетчика. Активность урокиназы относят пропорционально к радиоактивности, выделенной в раствор. Единицу активности урокиназы определяют, как количество фермента, который гидролизует один мкг фибрина за час.

20.3 Общая характеристика антикоагулянтов

Антикоагулянты – лекарственные средства, снижающие свертываемость крови путем угнетения образования фибрина. Различают антикоагулянты прямого и непрямого действия.

Антикоагулянты прямого действия

Антикоагулянты прямого действия тормозят образование фибрина как при введении их в организм, так и *in vitro*. К средствам этой группы относят средне- и низкомолекулярные гепарины, концентрат антитромбина III (кибернин) и натрия гидроцитрат.

Среднемолекулярные гепарины представляют собой средства стандартного нефракционированного гепарина – натриевую и кальциевую его соли (гепарин натрий и гепарин кальций). Это биологические лекарственные средства. Низкомолекулярные гепарины, полученные из стандартного гепарина путем деполимеризации, включают дельтапарин натрий, эноксапарин натрий, надропарин кальций, ревиварин натрий и парнапарин натрий. Это биотехнологические лекарственные средства.

Механизм действия стандартного нефракционированного гепарина связан с торможением активности тромбина и в меньшей степени – с

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

инактивацией других факторов системы свертывания крови. Гепарин уменьшает агрегацию тромбоцитов, несколько повышает фибринолитические свойства крови. При внутривенном введении антикоагуляционный эффект гепарина натрия развивается быстро (в течение нескольких минут) и продолжается 4–5 ч (в зависимости от дозы). При подкожном введении этого средства эффект наступает через 40–60 мин, достигает максимума через 3–4 ч и продолжается 8–12 ч.

Низкомолекулярные гепарины по сравнению со стандартным гепарином в большей степени угнетают Ха фактор свертывания крови и в меньшей – тромбин. Антитромбин III угнетает активность тромбина и других факторов свертывания крови. Натрия гидроцитрат, используемый только для консервирования крови, связывает свободные ионы кальция, которые участвуют в образовании тромбопластина и в процессе перехода протромбина в тромбин.

Общее показание к применению антикоагулянтов: склонность к тромбообразованию. В частности, среднемолекулярные гепарины используют при остром инфаркте миокарда для предотвращения или ограничения тромбообразования, при тромбозах и эмболиях магистральных вен и артерий, сосудов головного мозга, глаза, переливании крови в послеоперационном периоде у больных с тромбоэмболией в анамнезе, при операциях на сердце и сосудах, для предупреждения свертывания крови в аппаратах искусственного кровообращения. Низкомолекулярные гепарины применяют главным образом для профилактики и лечения тромбоза глубоких вен. Антитромбин III показан для лечения и профилактики тромбоэмболических осложнений при врожденной и приобретенной недостаточности этого фактора, в т.ч. при проведении гемодиализа.

Лекарственные средства на основе гепаринов

Гепарин натрий (гепарин, тромбофоб и др.) – раствор для инъекций в ампулах по 0,25 мл и 5 мл (5000 МЕ в 1 мл); раствор для внутримышечного и внутривенного введения в ампулах по 1 мл (5000 МЕ в 1 мл); раствор во флаконах по 5 мл (5000, 10000 и 20000 МЕ в 1 мл).

Гепарин кальций (кальципарин) – раствор для инъекций в ампулах по 0,2 и 0,5 мл (25000 МЕ в 1 мл) в комплекте с градуированными шприцами.

Дальтепарин натрий (фрагмин) – раствор для инъекций в ампулах по 1 мл (10000 МЕ в 1 мл) и в шприцах-тюбиках по 0,2 мл (2500 МЕ и 5000 МЕ в 1 шприце).

Надропарин кальций (фраксипарин) – раствор для инъекций в

Глава 20. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ТРОМБОЛИТИКОВ И АНТИКОАГУЛЯНТОВ

градуированных шприцах по 0,3 мл (2850 МЕ), 0,6 мл (5700 МЕ) и 1 мл (9500 МЕ).

Парнапарин натрий (флуксум) – раствор для инъекций в шприцах по 0,3 мл (3200 МЕ); 0,4 мл (4250 МЕ); 0,6 мл (6400 МЕ) и 1,2 мл (12800 МЕ).

Ревипарин натрий (кливарин) – раствор для инъекций в шприцах по 0,25 мл (1750 анти-Ха МЕ в 1 шприце).

Эноксапарин натрий (клексан) – раствор для инъекций в шприцах по 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1 мл (100 мг в 1 мл).

Антитромбин III (кибернин) – лиофилизированное сухое вещество для инъекций во флаконах (500 МЕ и 1000 МЕ) в комплекте с растворителем (1 мл готового раствора содержит 50 МЕ действующего вещества).

Антикоагулянты непрямого действия

Антикоагулянты непрямого действия отличаются от гепарина и других антикоагулянтов прямого действия прежде всего тем, что их эффект не проявляется *in vitro*, а развивается только при их введении в организм. По химическому строению антикоагулянты непрямого действия относятся к двум разным классам химических соединений – производным индандиона (фенилин) и производным 4-оксикумарина (аценокумарол, фепромарон, этил бискумацетат). Их получают химическим синтезом. Механизм действия этих веществ связан с торможением синтеза в печени факторов свертывания крови, образование которых зависит от витамина К. Витамин К превращается в активную форму в микросомах печени под влиянием эпоксидредуктазы. Антикоагулянты непрямого действия блокируют данный фермент и вследствие этого препятствуют синтезу некоторых факторов свертывания крови.

Антикоагулянты непрямого действия назначают внутрь. Их эффект развивается после длительного латентного периода и имеет значительную продолжительность. Антикоагулянты непрямого действия применяют для длительного снижения свертывания крови в целях профилактики и лечения тромбозов, тромбофлебитов, тромбоэмболических осложнений при инфаркте миокарда, для предупреждения тромбообразования в послеоперационном периоде.

Аценокумарол (синкумар, тромбостоп) – таб. по 2 и 4 мг.

Фенилин (фениндион) – порошок; таб. по 0,03 г.

Фепромарон – таблетки по 0,01 г.

Этил бискумацетат (неодикумарин, пелентан) – таб. по 50; 100 и 300 мг.

20.4 Получение и стандартизация гепаринов

Получение гепарина. Легкие крупного рогатого скота измельчают, проводят экстракцию водно-солевым раствором с рН 8,5–8,8 при 60–100°C и соотношении твердой и жидкой фаз 1 к 2. Затем отделяют остатки измельченной ткани фильтрованием и выделяют гепарин из жидкой фракции ионообменным методом на анионите. Также могут использовать слизистую оболочку кишечника крупного рогатого скота и свиней.

Получение низкомолекулярного гепарина. Готовят раствор гепарина в ацетатном буфере с рН 6,0 и перемешивают с иммобилизованным ферментом (микробная гепариназа). Суспензию перемешивают при 37°C в течение 3 часов. Иммобилизованное средство отделяют центрифугированием, промывают раствором натрия хлорида и водой. Промывную жидкость присоединяют к супернатанту и обессоливают на колонке с сефадексом G-10. Сушат лиофильным способом.

Иммобилизацию ферментативного комплекса из *Streptomyces kurssanovii* осуществляют, используя реакцию азосочетания. К аминокрильному производному силохрома добавляют соляную кислоту и раствор NaNO₂ при температуре 4°C, перемешивают в течение 30 мин. Затем промывают фосфатным буфером с рН 7,8, переносят в колбу и добавляют культуральную жидкость *Streptomyces kurssanovii*. Перемешивают при 4°C в течение 16 часов. Промывают водой, раствором натрия хлорида и снова водой.

Стандартизация гепаринов

На примере гепарина натрия (статья Государственной фармакопеи Республики Беларусь второго издания том второй 07/2017:0333).

Описание. Белый или почти белый порошок. Гигроскопичен. Легко растворим в воде.

Идентификация. 1). Замедление сворачивания овечьей плазмы, обогащенной кальцием и цитратом. 2). Спектрометрия ядерного магнитного резонанса. 3). Жидкостная хроматография. 4). Реакции на ион натрия.

Чистота: прозрачность, цветность, рН, белки, белковые и нуклеотидные примеси, тяжелые металлы, потеря в массе при высушивании, бактериальные эндотоксины, пирогенность,

Глава 20. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ТРОМБОЛИТИКОВ И АНТИКОАГУЛЯНТОВ

микробиологическая чистота. Сопутствующие примеси определяют методом жидкостной хроматографии.

Количественное определение проводят согласно статье Государственной фармакопеи Республики Беларусь второго издания том первый 2.7.5. Антикоагулянтную активность гепарина определяют *in vitro* путем сравнения его способности в заданных условиях замедлять свертывание обогащенной кальцием и цитратом овечьей плазмы с аналогичной способностью стандартного образца гепарина, калиброванного в международных единицах.

Количественное определение выполняют одним из следующих методов установления начала свертывания с использованием пробирок:

- 1) прямое визуальное наблюдение, предпочтительно в отраженном свете на черном матовом фоне;
- 2) спектрофотометрическая регистрация изменения оптической плотности при длине волны около 600 нм;
- 3) визуальная фиксация изменения текучести путем опрокидывания пробирок;
- 4) механическая запись изменения текучести, определяемого по перемешиванию, направленного на минимизацию возмущений раствора в начальной стадии свертывания.

Глава 21

Технология получения и стандартизация стероидных гормонов и инсулина

Вопросы для самоподготовки

1. *Общая характеристика, классификация гормонов.*
2. *Инсулин: строение, получение, стандартизация.*
3. *Стероидные гормоны. Структура. Классификация.*
4. *Частные технологии получения стероидов. Контроль качества.*

21.1 Общая характеристика, классификация гормонов

Гормоны – (др. греч. ὀρμάω – возбуждаю, побуждаю) – биологически активные вещества органической природы, вырабатываемые в небольших количествах железами внутренней секреции, доставляющиеся кровью в ткани–мишени, где они связываются со специфическими рецепторами и оказывают регулирующее действие на метаболизм или физиологические функции.

В настоящее время наиболее распространенными вариантами классификации гормонов являются анатомическая (по железе внутренней секреции, в которой гормон вырабатывается) и химическая (по общим признакам строения молекул гормонов) классификации. В биотехнологии наиболее приемлемой считается **химическая классификация гормонов**:

- **Белковые и пептидные** гормоны (инсулин, глюкагон, соматотропин, кортикотропин и др.).
- **Стероидные** гормоны (гестагены, кортикостероиды, андрогены, эстрогены).
- Производные **полиненасыщенных (полиеновых) жирных кислот** (простагландины, тромбоксаны и лейкотриены).

Глава 21. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ И ИНСУЛИНА

- **Аминные** гормоны (адреналин, норадреналин, тироксин).

21.2 Инсулин: строение, получение, стандартизация

Строение и механизм действия

Инсулин (лат. *insula* – остров) – гормон пептидной природы, образуется в бета-клетках островков Лангерганса поджелудочной железы.

Молекулярная масса: 5807 Да. Инсулин состоит из двух полипептидных цепей: А-цепь состоит из 21 аминокислотного остатка и В- цепь состоит из 30 аминокислотных остатков.

Эти две цепи связаны двумя дисульфидными S-S связями, которые обеспечивают пространственную структуру инсулина, а также имеется одна дисульфидная связь в цепи. При синтезе инсулина в поджелудочной железе вначале образуется предшественник инсулина, так называемый проинсулин. Проинсулин состоит из А-цепи, В-цепи и С-пептида, состоящего из 35 аминокислотных остатков. С-пептид отщепляется под действием карбоксипептидазы и трипсина, в результате чего проинсулин переходит в активный инсулин.

Основное действие инсулина заключается в снижении концентрации глюкозы в крови. Инсулин увеличивает проницаемость плазматических мембран для глюкозы, активирует ключевые ферменты гликолиза, стимулирует образование в печени и мышцах из глюкозы гликогена, усиливает синтез жиров и белков. Кроме того, инсулин подавляет активность ферментов, расщепляющих гликоген и жиры.

Нарушение секреции инсулина вследствие деструкции бета-клеток – абсолютная недостаточность инсулина – является ключевым звеном патогенеза сахарного диабета 1-го типа. Нарушение действия инсулина на ткани – относительная инсулиновая недостаточность – имеет важное место в развитии сахарного диабета 2-го типа.

23 января 1922 года *Ф. Бантинг* и *Ч. Бест* сделали инъекцию очищенного экстракта поджелудочной железы, полученного по методу Дж. Коллипа, подростку Леонарду Томпсону, который страдал сахарным диабетом. Эта была вторая инъекция (первая состоялась 11 января, однако из-за плохой очистки экстракта повлекла за собой побочные эффекты) увенчалась успехом: получен положительный результат без значительных

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

токсических эффектов. За открытие инсулина *Ф. Бантинг* и *Дж. Маклеод* в 1923 г. были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине.

Классификации лекарственных средств инсулина

Различают:

- моновидовые (одновидовые) – включают в себя экстракт поджелудочных желез или инсулин животных только одного вида, например, свиньи;
- комбинированные – состоят из экстрактов поджелудочных желез или инсулинов животных разных видов, например, свиньи и быка.

По видовому признаку:

- человеческий;
- свиной – отличается от человеческого одной аминокислотой: в 30-м положении В-цепи вместо аминокислоты треонин – аланин;
- крупного рогатого скота – отличается тремя аминокислотами;
- китовый – отличается более, чем на три аминокислоты.

По степени очистки:

- традиционные – экстрагируются кислым этанолом, а в процессе очистки фильтруются, высаливаются и многократно кристаллизуются (метод не позволяет очистить лекарственное средство от примесей других гормонов, содержащихся в поджелудочной железе);
- монопиковые (МР) – после традиционной очистки фильтруются на геле (при проведении гель-хроматографии образуют всего один «пик»: содержание примесей не более 1×10^{-3} ; 99,9 %);
- монокомпонентные (МС) – подвергаются еще более глубокой очистке с помощью молекулярного сита и метода ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе, что позволяет добиться высокой степени их чистоты (1×10^{-6} ; 99,9999 %).

По началу действия, «пику» и продолжительности:

- ультракороткого действия;
- короткого действия;
- пролонгированного действия;
- среднего срока действия;
- длительного действия;
- сверхдлительного действия.

Классификация основана на том, что инсулин вырабатывается

Глава 21. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ И ИНСУЛИНА

прандиально (в ответ на поступление глюкозы в кровь) и базально (в небольших количествах инсулин присутствует постоянно в крови с целью нейтрализации действия контринсулярных гормонов (глюкагон, кортикостероиды и др.).

Пролонгирование действия инсулина достигается увеличением содержания в нем кристаллической формы, т.е. чем больше кристаллического инсулина, тем выше продолжительность его действия. Комбинируя аморфный и кристаллический инсулин, можно получать лекарственные средства различной продолжительности действия. Как правило, растворы инсулина – это лекарственные средства короткого действия, а суспензии – продленного. Для пролонгирования действия инсулина к нему добавляют протамин (белок рыбьих молок) и цинк (для образования кристаллических форм).

Лекарственные средства инсулина на фармацевтическом рынке РБ

На территории РБ производителем всех препаратов инсулина является РУП «Белмедпрепараты». Кроме выпускаемых РУП «Белмедпрепараты» в РБ зарегистрированы и препараты других производителей, которые можно классифицировать по продолжительности действия.

Моноинсулин человеческий рекомбинантный, раствор для инъекций 100 МЕ/мл (Актрапид НМ, Хумилин регуляр, Инсуман рапид, Белрапид, Генсулин Р).

Инсулин короткой продолжительности действия.

Начинает действовать **быстро** (в пределах получаса) и оказывает максимальный эффект между 1-м и 3-м часом; продолжительность действия – примерно 8 часов.

Протамин-инсулин человеческий, суспензия для инъекций 100 МЕ/мл (Биосулин Н, Гансулин Н, Инсуман Базал ГТ, Инсуран НПХ, Протафан НМ).

Инсулин пролонгированного действия.

Начинает действовать в пределах 1,5 часов и оказывает максимальный эффект между 4-м и 12-м часом; продолжительность действия – до 24 часов.

Биотехнологическое производство рекомбинантного инсулина человека

До внедрения в промышленность метода получения инсулина с использованием рекомбинантных микроорганизмов существовал только

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

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

Кроме того, для получения 1 килограмма инсулина требуется 35 тысяч голов свиней (если известно, что годовая потребность в инсулине – 1 тонна лекарственного средства). С другой стороны, биосинтетическим путем можно получить такое же количество инсулина, проведя биосинтез в 25 кубовом ферментере, используя рекомбинантный микроорганизм *Escherichia coli*.

Схема получения рекомбинантного инсулина (фирма «Eli Lilly», США):

1 этап. Путем химического синтеза были созданы последовательности нуклеотидов, которые кодируют образование А- и В-цепей, т.е. созданы синтетические гены. Это этап получения нужных генов.

2 этап. Каждый из синтетических генов вводят в плазмиды (в одну плазмиду вводят ген, синтезирующий цепь А, в другую плазмиду вводят ген, синтезирующий цепь В). Это этап конструирования рекДНК.

3 этап. Вводят ген, кодирующий образование фермента бетагалактозидазы. Этот ген включают в каждую плазмиду для того, чтобы добиться бурной репликации плазмид (интенсификация процесса репликации). Этот этап также относится к конструированию рекДНК.

4 этап. Вводят плазмиды в клетку *Escherichia coli* – кишечной палочки – и получают две культуры продуцента, одна культура синтезирует А-цепь, вторая В-цепь. Данный этап относится к генетической трансформации. Затем проводят молекулярную селекцию, связанную с идентификацией рекомбинантных бактерий.

5 этап. Помещают две культуры в ферментер. В среду добавляют галактозу, которая индуцирует образование фермента бетагалактозидазы. При этом плазмиды активно реплицируются, образуя много копий плазмид и, следовательно, много генов, синтезирующих А и В цепи. Среда для выращивания трансгенного штамма – L-бульон (содержит натрия хлорид, кальция хлорид, магния сульфат, фосфаты, глюкозу). Условия культивирования: 30°C; рН около 7,0; перемешивание и аэрация

Глава 21. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ И ИНСУЛИНА

необходимы.

6 этап. Проводят сепарацию путем центрифугирования. Клетки лизируют ультразвуком, выделяют А и В цепи, которые связаны с бетагалактозидазой. Обработывают бромцианом для отщепления А и В-цепи от бетагалактозидазы. Затем производят дальнейшую очистку и выделение А и В цепей. Очистку проводят высаливанием и многократной перекристаллизацией, для получения монопиковых и многокомпонентных инсулинов дополнительно могут очищать гель-хроматографией, ионообменной хроматографией и методом молекулярных сит соответственно.

7 этап. Окисляют остатки цистеина для образования дисульфидных связей, в результате цепи связываются и получается человеческий рекомбинантный инсулин.

Контроль качества инсулина человеческого

Контроль качества инсулина человеческого проводят согласно Государственной фармакопее Республики Беларусь.

Инсулин человеческий (фармакопейная статья 07/2016:2038) – белый порошок. Не растворим в воде и спирте. Растворим в разведенных минеральных кислотах. Растворяется в растворах щелочей с разрушением.

Инсулин изофан для инъекций (фармакопейная статья 07/2016:0833) – суспензия инсулина человеческого и протамина. Суспензия белого цвета, при отстаивании которой образуется осадок белого цвета.

Инсулин изофан двухфазовый для инъекций (фармакопейная статья 07/2016:0832) – смесь инсулина изофана и инсулина для инъекций.

Инсулин аспартам (фармакопейная статья 07/2016:2084) в отличие от человеческого в 28 положении В-цепи вместо пролина находится аспарагиновая кислота.

Белый порошок, не растворимый в спирте, метаноле и водных растворах с рН около 5, снижение рН способствует растворимости.

Инсулин лизпро (фармакопейная статья 07/2016:2085) отличается последовательностью аминокислот в положениях 28 и 29 В-цепи: пролин-лизин у человеческого: лизин – пролин – у данного. Белый порошок. Не растворим в воде и спирте. Растворим в разведенных минеральных кислотах. Растворяется в растворах щелочей с разрушением.

Инсулин растворимый для инъекций (фармакопейная статья 07/2016:2034) – бесцветная прозрачная жидкость.

Общие принципы контроля качества инсулина человеческого
Селективное расщепление пептидных связей

Происходит ограниченный протеолиз молекулы инсулина, при котором идет распад на 4 части молекулы. Т.е. получают так называемую «пептидную карту», которую сравнивают со стандартным образцом. Расщепление происходит под действием протеазы стафилококка золотистого.

Сопутствующие примеси

Определение примесей, превышающих молекулярную массу инсулина (его димеры, тримеры и полимеры). Эксклюзионная хроматография. Образуются при нарушении технологии производства и в процессе хранения.

Родственные белки (инсулиноподобные пептиды: проинсулин; глюкагон, панкреатический полипептид). ВЭЖХ.

Проинсулин-подобные иммунореактивные примеси. Иммунохимический метод (ИФА, радиоиммунологический анализ). Ppt – количество частиц примесей на 1 млн. частиц инсулина: до 30000 ppt – традиционные инсулины; 500 – 1000 ppt – монопиковые инсулины; до 20 ppt (по Европейской фармакопее до 10) – монокомпонентные инсулины.

Осложнения при приеме инсулина, связанные с наличием примесей: липодистрофия; аллергические реакции (на чужеродные белки) и инсулинорезистентность (антитела, связываясь с инсулином, уменьшают его концентрацию и соответственно вводимую дозу).

Цинк. Атомно-абсорбционная спектрометрия.

Кроме перечисленных примесей проводят испытания на бактериальные эндотоксины, потерю в массе при высушивании, сульфатную золу и микробиологическую чистоту.

Количественное определение. Проводят методом ВЭЖХ. Активность гормона оценивают в международных единицах.

Кроме инструментальных методом по статье ГФ РБ можно провести определение биологической активности инсулина.

Активность испытуемого образца инсулина определяют путем сопоставления его гипогликемического (сахаропонижающего) действия с гипогликемическим действием стандартного образца инсулина. Перед испытанием растворы разводят до концентрации 1 ЕД/мл.

Определение биологической активности инсулина проводят на здоровых кроликах массой 2,5–3,5 кг.

Предварительно определяют чувствительность к инсулину. Для этого кроликам дважды с интервалом 7–8 суток после 18 ч голодания вводят

Глава 21. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ И ИНСУЛИНА

подкожно раствор стандартного образца инсулина из расчета 0,5 ЕД на 1 кг массы тела животного и определяют величину снижения концентрации сахара в крови в процентах. Кровь для исследования берут из краевой вены уха животных до введения инсулина и через 1,5 и 2,5 часа после его введения. Исключают животных с исходной концентрацией сахара в крови ниже и выше пределов, установленных для используемого метода определения содержания сахара в крови (феррицианидный и глюкооксидазный методы), а также тех животных, которые реагируют на введение инсулина судорогами или у которых снижение концентрации сахара в крови составляет менее 15 % по отношению к исходной концентрации.

Отобранных для опытов кроликов лишают корма (но не воды) на 18 ч, предшествующих введению инсулина. Животных распределяют на две группы не менее 9 кроликов. Непосредственно перед введением инсулина кроликов взвешивают и определяют исходную концентрацию сахара в крови. Кроликам одной группы вводят подкожно по 0,5 ЕД стандартного образца инсулина (S) на 1 кг массы тела, кроликам другой группы – такую же дозу испытуемого образца инсулина (T). Через 1,5 и 2,5 ч после введения инсулина у животных снова определяют концентрацию сахара в крови.

Для каждого кролика рассчитывают снижение концентрации сахара в крови в процентах по формуле:

$$(a - b)/a \times 100 \%,$$

где a – исходная концентрация сахара в крови в миллиграмм-процентах;

b – средняя концентрация сахара в крови в миллиграмм-процентах из двух определений, проведенных через 1,5 ч и 2,5 ч после введения инсулина.

Через 3–5 суток на этих же кроликах проводят повторное испытание с той разницей, что животным из группы, получавшей стандартный образец инсулина (S), вводят испытуемый образец инсулина (T), а животным группы, получавшей (T), вводят (S).

Рассчитывают среднюю величину снижения концентрации сахара в крови на стандартный образец ($\%S$) и на испытуемый образец ($\%T$) по данным всего опыта. Отношение $\%T$ и $\%S$ выражает относительную активность (R) испытуемого образца (T). Для выражения активности испытуемого образца (T) в ЕД его предполагаемую активность (A)

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

умножают на относительную активность ($T = R \times A$).

Определение проводят не менее 2 раз с каждым испытуемым образцом (T). При расчете окончательного результата должны быть использованы данные, полученные не менее чем на 30 кроликах.

Радиоиммунный метод или анализ (РИА) – высокочувствительный метод, основанный на реакции антиген – антитело с применением антигенов или антител, меченных радионуклидом (^{125}J , ^{14}C , ^3H , ^{51}Cr и др.). После их взаимодействия отделяют образовавшийся радиоактивный иммунный комплекс и определяют его радиоактивность в соответствующем счетчике (бета- или гамма-излучение). Интенсивность излучения прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.

Этот метод количественного определения биологически активных веществ, (гормонов, ферментов и др.) в биологических жидкостях, основан на конкурентном связывании искомым стабильных и аналогичных им меченных радионуклидом веществ со специфическими связывающими системами (например, антитело). В связи с тем, что меченый антиген добавляют в определенном количестве, можно определить часть вещества, которая связалась с антителами, и часть, оставшуюся несвязанной в результате конкуренции с выявляемым немеченым антигеном.

Исследование выполняют *in vitro* и проводят в несколько этапов: смешивают биологический материал с реагентами, инкубируют смесь в течение нескольких часов, разделяют свободное и связанное радиоактивное вещество, осуществляют радиометрию проб, рассчитывают результаты.

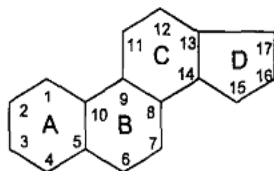
В ряде случаев исследования выполняют на фоне нагрузочных функциональных проб (например, определение содержания инсулина в сыворотке крови на фоне пробы на толерантность к глюкозе) либо в динамике (например, определение в крови половых гормонов на протяжении менструального цикла).

21. 3 Стероидные гормоны. Структура. Классификация

Структура стероидных гормонов. Все они характеризуются наличием в молекуле специфического циклического скелета (ядра) – циклопентанпергидрофенантрена (гонан, стеран), построенного из четырех колец, три из которых шестичленные (А, В и С) и одно пятичленное (D). Сочлененные кольца АВ имеют название декалин, CD – гидриндан. Сочленение колец АВ, как правило, транс; ВС – транс; CD – как правило, транс, но у сердечных гликозидов (АВ и CD) и желчных кислот (АВ) – цис.

Глава 21. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ И ИНСУЛИНА

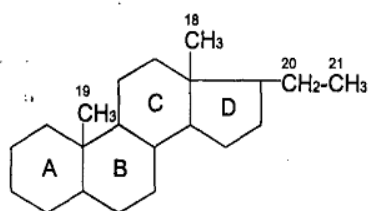
Структура неплоская, ахиральная, т.е. в положениях 9, 11 и 14 могут быть четыре различных заместителя. Выделяют также 5α - и 5β -стероиды (диастериомеры).



К стеролам относятся стероиды, у которых в положении С-3 имеется гидроксильная группа

Основные представители *стероидных лекарственных средств*:

Производные прегнана: в структуре прегнана содержится 21 атом углерода.



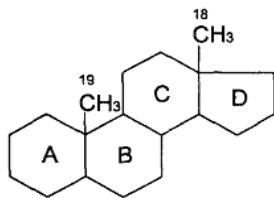
Кортикостероиды и их аналоги (бетаметазона валериат и дипропионат, дексаметазона натрия фосфат, гидрокортизон и его ацетат, преднизолон). Кортикостероиды вырабатываются корой надпочечников.

Глюкокортикоиды обладают противовоспалительным, иммуносупрессорным, антиаллергическим, гипергликемическим, анаболическим и липидемическим (увеличивает содержание жирных кислот в плазме крови) действием.

Гестагены и их синтетические аналоги (прогестерон, оксипрогестерона капроат, медроксипрогестерона ацетат (депо-провера), норэтистерон (норколут), линестренол (постинор)). Гестагены (прогестины) вырабатываются желтым телом, плацентой плода и частично корой надпочечников. Обеспечивают поддержание беременности, подготавливают матку к оплодотворению и способствуют имплантации в нее оплодотворенной яйцеклетки. Обеспечивают лактацию, оказывают антиминералокортикоидный эффект (снижают реабсорцию натрия).

Гестагены и кортикостероиды принадлежат к замещенным прегнанам, то есть при C_{17} содержат гидроксизамещенную ацетильную группу. Отличие кортикостероидов в том, что они имеют кислородную группу при C_{11} .

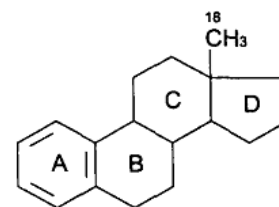
Андрогены и их полусинтетические аналоги (тестостерон (андрогель), метилтестостерон, нандролон деканоат (ретаболил)) – производные андростана, содержащего в структуре 19 атомов углерода.



Вырабатываются в семенниках, надпочечниках и яичниках. Обеспечивают половую дифференцировку, развитие вторичных половых признаков, формируют половое поведение. Оказывают анаболическое действие.

Эстрогены и их аналоги (этинилэстрадиол, эстрадиола гемикрат, эстриол) – производные ароматической структуры – эстрана, содержащей 18 атомов углерода.

Вырабатываются в яичниках из андрогенов. Обеспечивают половую дифференцировку, развитие вторичных половых признаков, формируют половое поведение. Уменьшают резорбцию кости. Как лекарственные средства используются как контрацептивы.



Андрогены и эстрогены, как правило, содержат при C_{17} карбонильную или гидроксильную группу. Их аналоги при C_{17} имеют алкильную или этильную группу.

В ряду производные прегнана – андрогены – эстрогены уменьшается количество атомов углерода в структуре и эстрогены уже являются ароматическими соединениями.

Проблема сырья для получения стероидных лекарственных средств.

Традиционные источники их получения

Одним из наиболее важных и изученных стероидов является *холестерол* (класс *зоостеринов*, стерин животных). Спинной мозг и мозг рогатого скота является наилучшим материалом для промышленного получения холестерина.

Эргостерин имеет отличие от холестерина в дополнительной метильной группе при C_{24} и двух дополнительных двойных связях при C_7 и $C_{22,23}$. Эргостерин является провитамином витамина D_2 . Особенно много эргостерина у дрожжевых микроорганизмов, в пекарских дрожжах.

Класс фитостеринов (стерины растений).

Стигмастерин содержится в соевом масле, в сахарном тростнике и отличается от холестерина наличием этильной группы при C_{24} .

Глава 21. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ И ИНСУЛИНА

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

Диосгенин содержится в растении диоскорея nipпонской – это импортное сырье, дорогостоящее.

Соласодин содержится в паслене дольчатом, который растет в Казахстане. Это сырье дорогое и не рентабельное для производства.

21.4 Частные технологии получения стероидов. Контроль качества

История биотехнологических модификаций стероидных структур

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

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

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

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

И, наконец, в 1955 году ученый *Нобил* сообщил о возможности микробиологического 1,2-дегидрирования, в результате чего из кортизона при помощи *Corinebacterium simplex* был получен широко известный преднизолон, который более активен и менее токсичен.

Получение андрогенов и их аналогов

Для практического решения вопроса об использовании *β-ситостерина* в производстве стероидных гормонов необходимо осуществить направленное окисление боковой цепи стерина с образованием 17-кетоандростана (АД) с помощью мутантных штаммов *Mycobacterium vacca*.

Но, возникает одна проблема. Так как стероиды трудно растворимы в воде, то и целевой продукт трансформации – АД практически на 99 % выделяется в виде кристаллов.

Поэтому культуральную жидкость необходимо отфильтровать и отделить биомассу с целевым продуктом – АД, затем добавить ацетон и еще раз отфильтровать, отделяя от биомассы 17-кетоандростан (АД) – целевой продукт. Затем ацетоновый раствор концентрируют и выделяют АД для последующей перекристаллизации. Полученный АД уже химическим способом превращают в лекарственные средства – это тестостерон и его эфиры: метилтестостерон, оксипрогестерон капронат, стериналактон и др.

Микробиологический синтез гидрокортизона и получение из него преднизолона путем биоконверсии

Субстратами для проведения трансформаций могут служить и сами модифицированные стероиды. Например, ключевым веществом в синтезе гидрокортизона, кортизона и преднизолона служит «вещество S Рейхштейна» (4-прегнен-17- α ,21-диол-3,20-дион), которое короче принято называть «вещество S». Это вещество само должно быть модифицировано с помощью биотрансформации из моноацетата «вещества R» (21-ацетат-5-прегнен-3- β ,17 α , 21-триол-20-дион) с помощью культуры *Corynebacterium mediolanum*.

Процесс превращения моноацетата «вещества R» в «вещество S Рейхштейна» с помощью культуры *Corynebacterium mediolanum* состоит из следующих стадий:

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

Трансформация заканчивается количественным выходом «вещества S Рейхштейна» (рисунок 21.1).

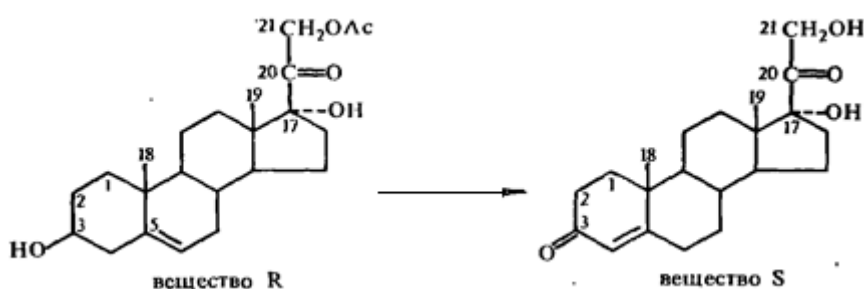


Рисунок 21.1 – Биотрансформация «вещества R» в «вещество S Рейхштейна»

Глава 21. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ И ИНСУЛИНА

При получении кортизола применяется давно и успешно с хорошим выходом продукта реакция биотрансформации – это 11 α -гидроксилирование (рисунок 21.2). В качестве микроорганизма трансформатора применяются грибы *Rhizopus nigricans* или *Curvularia lunata*.

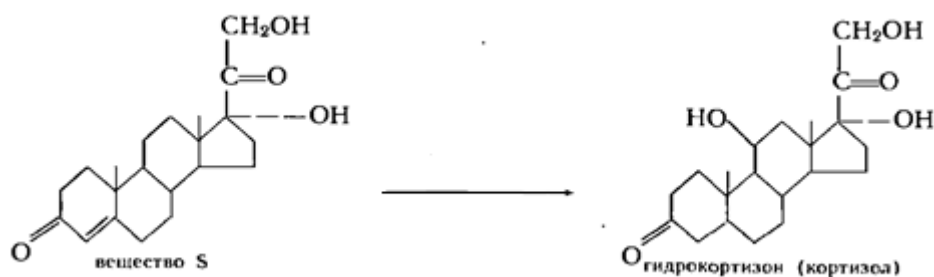


Рисунок 21.2 – Биотрансформация «вещества S Рейхштейна» в кортизол

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

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

Применяя дегидрогенизацию стероидов можно получить лекарственное средство преднизолон (обладает более сильным противовоспалительным и антиаллергическим действием, меньше проявляет токсических и побочных эффектов) из кортизона и преднизолон из гидрокортизона с выходом до 86 %, используя реакцию дегидрогенизации с помощью бактерий (рисунок 21.3), особенно часто используют такие микоформы как *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Nocardia* (актиномицеты).

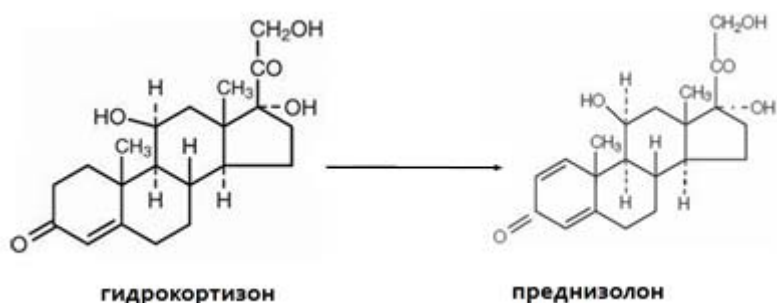


Рисунок 21.3 – Биотрансформация гидрокортизона в преднизолон

Особенности технологии 1,2-дегидрирования при получении преднизолона

Arthrobacter globiformis выращивают на питательной среде, содержащей кукурузный экстракт и глюкозу.

Через сутки клетки выделяют центрифугированием и промывают фосфатным буфером.

Далее клетки ресуспендируют из раствора и иммобилизируют путем включения в полиакриламидный гель.

Экстракцию конечного продукта проводят практически несмешивающимся с водой растворителем (например, этилацетатом).

Контроль качества стероидных гормонов и их аналогов

Контроль качества субстанций стероидных гормонов и их аналогов проводят согласно Государственной фармакопее Республики Беларусь второго издания, том 2.

Беклометазона дипропионат безводный (фармакопейная статья 07/2016:0654) и беклометазона дипропионат моногидрат (фармакопейная статья 07/2016:1709).

Бетаметазона валериат (фармакопейная статья 07/2016:0811) и бетаметазона дипропионат (фармакопейная статья 07/2016:0809).

Гидрокортизон (фармакопейная статья 07/2016:0335) и гидрокортизона ацетат (фармакопейная статья 07/2016:0334). С. 326–332.

Дексаметазона натрия фосфат (фармакопейная статья 07/2016:0549).

Преднизолон (фармакопейная статья 07/2016:0353).

Тестостерон (фармакопейная статья 07/2016:1373) и тестостерона пропионат (фармакопейная статья 07/2016:0297).

Описание. Белые кристаллические порошки, практически нерастворимы в воде, умеренно растворимы, растворимы или легко растворимы в органических растворителях (ацетон, спирт и т.п.).

Дексаметазона натрия фосфат легко растворим в воде, гигроскопичен, обладает полиморфизмом.

Бетаметазона валериат плавится с разложением.

Преднизолон гигроскопичен, обладает полиморфизмом.

Подлинность. Спектрофотометрия в УФ- и видимой областях. Образуется окрашенный в желтый цвет продукт с фенилгидразином в серной кислоте Р (рисунок 21.4).

Глава 21. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ И ИНСУЛИНА

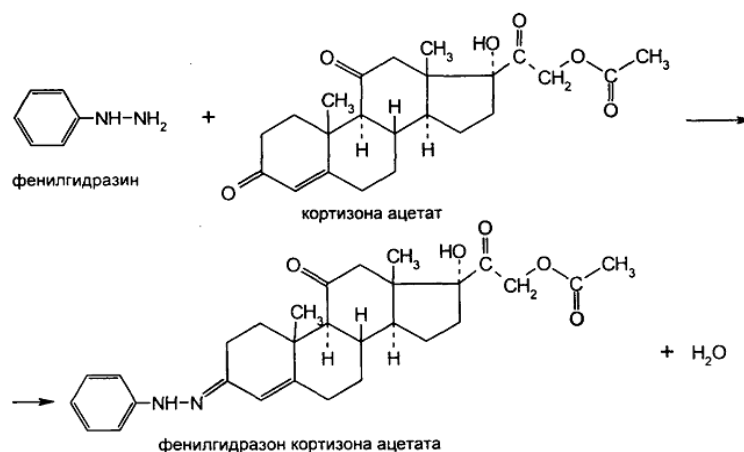


Рисунок 21.4 – Реакция взаимодействия фенилгидразина и стероидных гормонов с образованием окрашенного продукта

ИК-спектрометрия. Сравнивают спектры испытуемого образца и стандартного образца.

ТСХ. Пластинка со слоем силикагеля F₂₅₄. До проявления просматривают в УФ-свете при 254 нм.

Проявляют раствором кислоты серной спиртовой Р при 120°С. Затем просматривают в УФ-свете при 365 нм.

Беклометазон дипропионат после сжигания в колбе и поглощения продуктов раствором натрия гидроксида дает реакцию на хлориды.

Примеси.

Удельное оптическое вращение. От +162 до +168 (гидрокортизон); от +113 до +119 (преднизолон); от +108 до +115 (беклометазон дипропионат); +77 до +83 (бетаменазон валериат); от +106 до +114 (тестостерон).

Сопутствующие примеси. ВЭЖХ.

Потеря в массе при высушивании.

Микробиологическая чистота.

Неорганические фосфаты (дексаметазона натрия фосфат).

Количественное определение.

Спектрофотометрия в УФ-области. Готовят спиртовой раствор, оптическую плотность которого измеряют при 242±2 нм, что соответствует максимумам поглощения.

ВЭЖХ. Беклометазон дипропионат. Дексаметазона натрия фосфат. Преднизолон.

Лекарственные средства на основе стероидных гормонов и их аналогов белорусского производства

Гидрокортизон – гель в тубах 10 мг/г по 7, 15, 30 и 50 г, мазь 10 мг/г в тубах по 30 г (ООО «Фармтехнология»).

Гидрокортизон – мазь 10 мг/г в тубах по 10 г (РУП «Белмедпрепараты»).

Дексаметазон – капли глазные 1 мг/мл в тубик-капельницах 1 и 5 мл (РУП «Белмедпрепараты»).

Преднизолон – мазь 5 мг/г в тубах по 10 г (РУП «Белмедпрепараты»).

Преднизолон – мазь 5 мг/г в тубах по 10 г (ОАО «БЗМП»).

Преднизолон-Белмед – таблетки 5 мг (РУП «Белмедпрепараты»).

Глава 22

Технология получения и стандартизация антибиотиков

Вопросы для самоподготовки

1. *Общая характеристика, классификация антибиотиков.*
2. *Общие принципы получения антибиотиков.*
3. *Частные технологии получения антибиотиков.*
4. *Биологические и инструментальные методы стандартизации антибиотиков.*

22.1 Общая характеристика, классификация антибиотиков

Термин «антибиотик» предложен *А. Вьюменом* в 1889 году для обозначения действующего агента антибиоза.

Антибиотики - специфические продукты жизнедеятельности организмов, их модификации, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов (бактериям, грибам, водорослям, простейшим), вирусам и злокачественным опухолям, избирательно задерживающие их рост или полностью подавляющие развитие.

Противомикробное действие антибиотиков носит избирательный характер: на одни организмы они действуют сильнее, на другие – слабее или вообще не действуют.

Образование антибиотиков – наследственно закрепленная особенность метаболизма микроорганизмов, проявляющаяся в том, что каждый вид способен продуцировать один или несколько определенных, строго специфичных для него антибиотических веществ, что обусловлено

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

определенным характером обмена, возникающим и закрепленным в процессе эволюции микроорганизма.

Классификация антибиотиков по способам получения:

- антибиотики, получаемые биосинтезом;
- антибиотики, получаемые путем химической или биотехнологической модификации природных антибиотиков;
- средства, получаемые химическим синтезом.

Классификация антибиотиков по химической структуре:

- беталактамы (пенициллины, цефалоспорины);
- макролиды и азалиды;
- аминогликозиды;
- тетрациклины;
- амфениколы;
- антибиотики другой структуры (линкозамиды, полиеновые вещества, гликопептиды).

Антибиотики относятся к вторичным метаболитам и синтезируются из первичных.

Биосинтез антибиотиков фазоспецифичен: процесс развития микроорганизмов продуцентов носит двухфазный характер.

Первая фаза развития (тропофаза или фаза сбалансированного роста) характеризуется тем, что в культуре продуцента антибиотика происходит быстрое накопление биомассы, сопровождаемое интенсивным потреблением основных компонентов субстрата (источников углерода, азота, фосфора и др.), снижением значения рН среды в результате образования кислых продуктов. Биосинтез антибиотика в этот период не происходит или осуществляется в незначительном количестве. Эта фаза должна быть быстрой, а питательная среда – дешевой.

Вторая фаза (идиофаза или фаза несбалансированного роста) характеризуется снижением общего количества биомассы. В этот период происходит развитие микроорганизма и образование новых клеток, но в культуре начинают преобладать автолитические процессы, приводящие к снижению общего количества биомассы. Среда обогащается продуктами обмена и продуктами автолиза клеток, возрастает значение рН, происходит интенсивный процесс биосинтеза антибиотика.

Большинство микроорганизмов в процессе тропофазы чувствительно к собственным антибиотикам, но во время идиофазы становятся к ним

Глава 22. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ

устойчивыми. Чтобы уберечь микроорганизмы, продуцирующие антибиотики, от самоуничтожения, важно быстро достичь идиофазы и культивировать микроорганизмы в этой фазе.

Биологическая роль антибиотиков как вторичных метаболитов

Физиологическое значение антибиотиков для продуцирующих их микроорганизмов неясно. Одни исследователи считают, что синтез антибиотика дает преимущества микроорганизмам-продуцентам в борьбе за существование в природных популяциях, и многие из них служат средствами нападения и защиты; антибиотики могут участвовать в процессах детоксикации вредных метаболитов, контролировать некоторые стороны обмена веществ и целые процессы развития, служить запасными питательными веществами.

Некоторые исследователи рассматривают антибиотики как случайные вещества, обладающие полезными свойствами; согласно другой точки зрения, антибиотики представляют «отбросы» обмена веществ микроорганизмов и не имеют приспособительного назначения.

Кроме того, ряд ученых считают антибиотики реликтовыми молекулами, вытесненными в ходе эволюции продуктами рибосомального синтеза, но до сих пор сохранившими способность вмешиваться в биохимические процессы.

22.2 Общие принципы получения антибиотиков

Продуценты антибиотиков, скрининг продуцентов

Все антибиотики выделены в ходе систематического скрининга микроорганизмов; их число было увеличено путем химической модификации, цель которой состоит в:

- расширении спектра действия и повышения эффективности;
- снижении токсичности и устранении нежелательных побочных эффектов;
- создании аналогов, устойчивых к разрушению микробами и обладающих поэтому большим временем «полужизни»;
- усовершенствовании способов их введения.

Способностью вырабатывать антибиотики обладают не все микроорганизмы, а лишь некоторые штаммы. Существуют различия между

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

штаммами продуцентов антибиотиков, причем эти различия могут быть количественными или качественными (один штамм дает максимальный выход данного антибиотика, когда культура растет на поверхности среды и находится в стационарных условиях, а другой – лишь когда его культура погружена в среду и постоянно встряхивается).

Некоторые микроорганизмы выделяют не один, а несколько антибиотиков (*Pseudomonas aeruginosa* образует пиоцианазу, пиоцианин, пиолипоевую кислоту др.). Один и тот же антибиотик может продуцироваться микроорганизмами разного рода (глиотоксин образуют виды *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Aspergillus fumigatus* и др.). Разные микроорганизмы могут вырабатывать разные химические формы одного и того же антибиотика (разные пенициллины и др.).

Основные группы продуцентов антибиотиков:

Неспорообразующие бактерии: Pseudomonas aeruginosa – пиоцианин и пиоцианазу.

Спорообразующие бактерии: штаммы Bacillus subtilis производят бацитрацин, субтилин; *B. brevis* – тиротрицин и др.

Актиномицеты: кроме пенициллина, наиболее важные антибиотики получены из актиномицетов. К настоящему времени выделено или описано более 200 таких соединений (стрептомицин, тетрациклины, эритромицин, новобиоцин, неомицин и др.).

Микроскопические грибки: цефалоспорин, гризеофульвин, микофеноловая и пенициллиновая кислота, глиотоксин, клавацин, аспергилловая кислота и др.

Водоросли способны вырабатывать вещества, обладающие антибиотическими свойствами, но пока ни одно из них не нашло клинического применения.

Лишайники: лихенин и усниновая кислота.

Высшие растения образуют антибактериальные вещества, сходные по своим свойствам с истинными антибиотиками: фитонциды – аллицин, томатин и др.

Животные: среди продуктов животного происхождения, обладающих антибактериальными свойствами, важное место занимает лизоцим.

Скрининг продуцентов антибиотиков

Для выделения микроорганизмов-продуцентов антибиотиков, берут пробы почвы, высушивают ее до воздушно-сухого состояния и делают посева на специальные питательные среды. Выделенные культуры микроорганизмов-антагонистов изучают по содержанию в них

Глава 22. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ

антибиотических веществ. При этом хроматографически определяют наличие известных антибиотиков. Если обнаруживают новый антибиотик, то вначале осуществляют его первичное выделение и химическую очистку, определяют токсичность и химико-терапевтические свойства на животных, зараженных возбудителями разных заболеваний. Выделенные штаммы-продуценты антибиотиков часто вариабельны и нестабильны, поэтому путем селекции отбирают наиболее перспективные штаммы, затем проводят отбор индуцированных мутантов. Мутанты культивируют на богатой по составу питательной среде. Процесс контролируют либо по концентрации биомассы, либо по концентрации питательных веществ в среде. По окончании получения антибиотиков их проверяют на активность по отношению к тест-штаммам. Этот метод в настоящее время не достаточно распространен. Используются методы создания высокоактивных продуцентов.

Методы создания высокоактивных продуцентов антибиотиков

1. *Испытание новых продуцентов*: например, активно исследуются миксобактерии, продуцирующие большое количество антимикробных агентов.

2. *Мутасинтез*: применяют мутантные штаммы, у которых блокирован синтез отдельных фрагментов молекулы антибиотика. В среду культивирования вносят аналоги этих фрагментов. Микроорганизм использует эти аналоги для биосинтеза, в результате получают модифицированный антибиотик.

3. *Клеточная инженерия*: получают гибридные антибиотики с новыми комбинациями агликона и сахаров.

4. *Генетическая инженерия* — введение в геном микроорганизма информации о ферменте, необходимом для модификации продуцируемого антибиотика. Таким методом получают антибиотики с уникальной структурой.

5. *Прямая ферментация продуцента* с подходящим предшественником, индуцирующая синтез ферментов вторичного метаболизма в идиофазе. Вводимый предшественник должен лимитировать скорость биосинтеза антибиотика. Аналогичный эффект вызывает применение ингибиторов.

Технология получения антибиотиков

Процесс промышленного производства антибиотиков включает следующие стадии:

1. *Подготовка питательной среды.* В технологии получения антибиотиков применяют агаризованные или сыпучие субстраты (пшено, ячмень, пшеничные отруби и т.п.) и жидкие питательные среды.

Условия синтеза антибиотиков заключаются в том, что в питательной среде должны присутствовать источники азота, углерода, фосфора, предшественники антибиотиков и витамины.

К источникам азота относятся: аминокислоты, аммонийные соли и нитраты; к источникам углерода – глюкоза и лактоза; также в питательной среде должны присутствовать сера, магний, марганец, железо, цинк, кобальт. Кроме того, при производстве антибиотиков в состав питательной среды должны входить соевая мука, кукурузный экстракт и жмых масленичных культур.

В зависимости от природы используемого микроорганизма в качестве источника углерода возможно применение различных субстратов (для получения пенициллина лучшим источником углерода является глюкоза и лактоза). При разработке состава питательной среды для каждого отдельного продуцента индивидуально подбирают не только тип углеродного субстрата, но и его концентрацию.

В качестве источника азота многие продуценты антибиотиков используют восстановленные формы азота (аммоний и аминокислоты). Большое значение имеет также концентрация в среде фосфора и других минеральных элементов (серы, марганца, железа, кобальта и др.). Увеличения выхода антибиотиков достигают в результате внесения в среду предшественников синтеза антибиотика.

Значение рН. Для бактерий рН питательной среды составляет 7,0, для грибов – 4,5–5,0, для актиномицетов – 6,7–7,5. Для большинства известных антибиотиков оптимальная величина рН близка к нейтральной. При значительном закислении или защелачивании среды процесс биосинтеза тормозится. Для регулирования рН в питательные среды для получения антибиотиков часто добавляют некоторое количество мела, который вступает в реакцию с возникающими в ходе процесса метаболизма кислотами, образуя при этом нейтральные соли и углекислый газ, впоследствии удаляемый из среды.

Температура. Для биосинтеза антибиотика требуется определенная температура: для биосинтеза пенициллина грибом рода пеницилиум

Глава 22. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ

оптимальной температурой является 25–26°C, в то время как при образовании антибиотиков актиномицетами обычно поддерживают более высокую температуру 27–29°C.

Перемешивание и аэрация. Т.к. продуценты антибиотиков являются аэробами, следовательно, требуется создать при их синтезе хорошую аэрацию. Кислород необходим для биосинтеза ряда антибиотиков, т.к. последний расходуется при замыкании β -лактамного и тиазолидинового колец во время биосинтеза β -лактамной структуры. В целом потребность в кислороде зависит от концентрации биомассы и ее метаболической активности. Назначение аэрации и перемешивания – снабжение культуры кислородом, но одновременно они способствуют поддержанию мицелия во взвешенном состоянии и выравниванию концентрации питательных веществ и продуктов обмена в культуральной жидкости.

Вспенивание. Питательные среды, применяемые при получении антибиотиков, содержат вещества, способные образовывать весьма стойкие пены. Аэрация и перемешивание среды вызывают образование слоя пены на поверхности жидкости, что ухудшает условия развития продуцента. В связи с интенсивным пенообразованием, сопровождающим процесс синтеза антибиотиков, в состав среды вводят пеногасители (растительные и животные жиры, минеральные масла, поверхностно активные вещества).

2. *Подготовка посевного материала* (продуценты-мутанты → колба на качалке → первый инокулятор (10 л) → второй инокулятор (100–500 л) → ферментер).

3. *Ферментация.* Для получения антибиотиков используют методы поверхностного и глубинного культивирования. В промышленном производстве антибиотиков используют аппараты разной емкости. В ходе ферментации культура непрерывно аэрируется стерильным подогретым воздухом. Температура среды, pH и ряд других параметров автоматически регулируются в соответствии с регламентом производства антибиотика. Процесс ферментации осуществляется в строго стерильной глубинной аэробной периодической культуре, носит выраженный двухфазный характер.

4. *Выделение антибиотиков.* Локализация антибиотика, сфера его применения определяют специфику приемов постферментационной стадии. Если антибиотик находится в клетках, на первом этапе обработки биомассу выделяют из культуральной жидкости (фильтрацией или центрифугированием); после разрушения клеток антибиотик экстрагируют

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

и переводят в растворимую фазу. Затем данный раствор и культуральные среды (если антибиотик выделяется из клеток в среду) подвергают разным методам экстракции, разделения, очистки и концентрирования для получения готового продукта. Цель всех процедур постферментационной стадии – получение стерильных средств высокой степени чистоты.

5. *Очистка антибиотиков.* Данная стадия технологического процесса включает в себя: осаждение, сорбцию, сушку. Помимо традиционных экстракционных и сорбционных методов при выделении и очистке антибиотиков все большее значение приобретает комплекс приемов, объединяемых названием мембранные технологии. При обезвоживании антибиотиков в зависимости от свойств используют лиофильную или распылительную сушку. Затем фасуют в стерильные флаконы с соблюдением условий, гарантирующих стерильность.

6. *Получение готового продукта.* Т.к. биосинтез антибиотиков ведется в асептических условиях, то при выделении, очистке и получении лекарственной формы также соблюдаются максимально возможные предосторожности против контаминации.

22.3 Частные технологии получения антибиотиков

Биотехнологическое производство пенициллина

Пенициллины относятся к β -лактамным антибиотикам, что обусловлено наличием в их структуре общего для всей группы четырехчленного лактамного кольца. Все пенициллины имеют одинаковое строение основной группы, представленной тиазолидиновым кольцом, соединенным с β -лактамным кольцом, и имеющим аминокислотную группу – 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК).

Для производства пенициллина применяют специально отобранные расы плесневых грибов-суперпродуцентов рода *Penicillium chrysogenum*.

Схема биосинтеза пенициллина представлена на рисунке 22.1.



Глава 22. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ

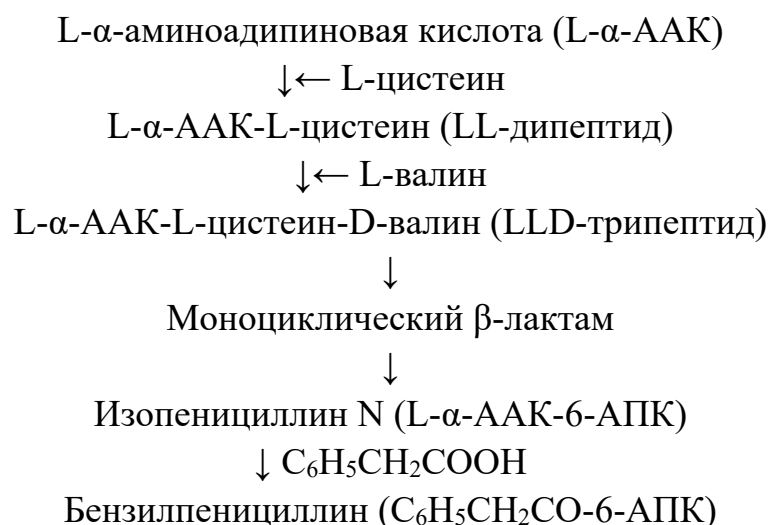


Рисунок 22.1 - Схема биосинтеза молекулы пенициллина

Для промышленного производства пенициллина применяют биореакторы с механическим перемешиванием. Питательная среда для производства пенициллина содержит: кукурузный экстракт (2–3 %), глюкозу (2 %) лактозу (1 %), сульфат аммония, фосфаты (0,5–1 %), производные фенилуксусной кислоты (0,3–0,6 %), гидрол. В качестве углеводов часто используют сахарозу или смесь лактозы с глюкозой (1:1). Глюкоза может снижать биосинтез антибиотика; на средах, содержащих лактозу или сахарозу, биосинтез антибиотика протекает активнее. Важную роль в процессе биосинтеза пенициллина играет сера, содержащаяся 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. *Penicillium chrysogenum* в качестве источника фосфора могут использоваться не только фосфаты, но и фитаты (антипитательные вещества, производные миоинозитгексафосфорной кислоты). Для стабилизации pH добавляют мел.

После стерилизации и охлаждения питательная среда засеивается проросшими спорами гриба, аэрируется путем пропускания через нее воздуха и перемешивается с помощью мешалки. Температура в период первой фазы – 30°C, во вторую фазу – 20°C, pH роста гриба – ниже 7,0, потребление углеводов должно быть медленным, что достигается использованием лактозы, либо дробным внесением глюкозы. Подготовка посевного материала: сначала размножаются споры на пшенице во флаконах

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

при 24–25°C в течение 4–5 сут. Полученным споровым материалом засевают инокуляторы, затем посевные аппараты (12–18 ч). В процессе ферментации необходимо соблюдение строгой асептики.

После окончания процесса ферментации мицелий гриба отделяют вакуум-фильтрованием или центрифугированием. Осадок на фильтре (мицелий гриба) промывают водой для максимального выхода пенициллина. Из культуральной жидкости, где антибиотик находится в виде кислоты, его выделяют экстракцией неполярными органическими растворителями (аминоацетатом, хлороформом, бутилацетатом и др.). Очистку антибиотика проводят путем замены растворителей. Экстрагированный пенициллин в виде кислоты переводят в водный раствор в виде соли, добавляя щелочь. Повторяя эти операции, пенициллин концентрируют и очищают. Большинство пенициллинов производят в виде натриевых и калиевых солей.

В сухой кристаллической форме пенициллиновые соли стабильны в течение длительного времени при температуре 4°C. Растворы быстро теряют активность (в течение 24 ч при температуре 20°C), их готовят непосредственно перед введением.

Биотехнологическое производство цефалоспорины

Из гриба *Cephalosporium acremonium* выделен ряд антибиотиков, в том числе цефалоспорин С. Его полусинтетические производные получили название цефалоспорины. К ним относятся цефалотин, цефалексин, цефаклор, цефотаксим, цефуроксим, цефоперазон, цефепим, цефтриаксон и др. По химическому строению цефалоспорин относится к β -лактамам соединениям, но β -лактамное кольцо конденсировано не с пяти, а с шестичленным гетероциклом.

В процессе развития *Cephalosporium acremonium* наряду с цефалоспорином С синтезируется и пенициллин N. Его образование идет тем же путем, что и образование изопенициллина N в процессе биосинтеза бензилпенициллина через ряд стадий из изопенициллина N образуется цефалоспорин С.

Продуцент целоспоринов может расти на средах, содержащих соевую муку, сухие дрожжи, жмыхи. Кроме того, в питательную среду добавляют аммонийные соли и фосфор, который способствует усвоению углеводов; цинк, марганец, магний, железо, мел.

Глава 22. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ

Посевной материал сначала готовят в качалочных колбах, затем переносят в инокулятор, в посевной аппарат большего объема, а после в ферментер (70 ч).

Процесс ферментации осуществляется глубинным способом, в условиях постоянной аэрации и непрерывного перемешивания, при температуре 26–28°C, в течение 7–8 суток. Процесс культивирования осуществляют в асептических условиях.

Постферментационная стадия, связанная с выделением и очисткой цефалоспоринов, осуществляется по той же схеме, что и в случае пенициллинов.

Биотехнологическое получение стрептомицина

Стрептомицин принадлежит к группе аминогликозидных антибиотиков. Стрептомицин – антибиотик, образующийся в процессе жизнедеятельности лучистых грибов *Streptomyces globisporus*. Культуры актиномицетов весьма переменчивы и каждому штамму должна соответствовать определенная среда и свой режим развития. На их изменчивость влияют условия культивирования, особенно состав сред.

Антибиотик выпускается в виде сульфата. Стрептомицина сульфат обладает широким спектром антимикробного действия. Антибиотик активен в отношении микобактерий туберкулеза и большинства грамотрицательных и некоторых грамположительных микроорганизмов; менее активен в отношении стрептококков, пневмококков; не действует на анаэробы, риккетсии и вирусы. Действует стрептомицин бактерицидно.

Для производства стрептомицина применяют штамм актиномицета *Streptomyces griseus*, образующего воздушный мицелий и споры.

В качестве основы питательных сред применяют гидролизаты растительных и животных белков. Основными компонентами питательных сред, применяющихся при промышленном получении стрептомицина, являются: соевая мука, гидролиз и аммонийные соли.

Для стабилизации признаков, связанных с антибиотикообразованием, при хранении и поддержании штамма в среды добавляют антимуутагены (пуриновые нуклеотиды, ионы марганца, L-метионины, гистидин, полиамины, кофеин и др.).

Среду стерилизуют при 120°C, охлаждают и засевают посевным материалом. При развитии продуцента различают 2 стадии. На первой стадии происходит быстрый рост и развитие микроорганизма с энергичным

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

использованием основных компонентов субстрата, максимальное потребление кислорода. В цитоплазме вначале высокое содержание РНК, ДНК не наблюдается и обнаруживается лишь через 12 ч развития. В среде происходит увеличение содержания аммонийного азота, обусловленное разложением белков соевой муки. рН вначале несколько снижается, затем повышается с 6,8 до 7,9. На этой стадии стрептомицин синтезируется в незначительном количестве. Через 28 ч масса мицелия прекращает увеличиваться, начинается вторая стадия, связанная с образованием стрептомицина. На 3 сутки рН с 7,9 уменьшается до 6,7, на 4–5 сутки – вновь возрастает до 7,7. Вторая стадия характеризуется медленным потреблением оставшихся в среде питательных веществ, замедлением роста актиномицета, снижением потребления кислорода, автолизом мицелия, максимальным образованием стрептомицина. Максимальное накопление стрептомицина наблюдается, когда автолитические процессы начинают преобладать над процессами роста. Количество аммонийного азота продолжает возрастать, что вероятно связано с разложением белков соевой муки и автолизом мицелия.

Культивирование проводится при 27–29°C и сопровождается аэрацией и перемешиванием, рН 7,5–8,0.

В культуральной жидкости находятся минеральные вещества, белки, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, полисахариды, жиры, стрептомицин и др. вещества. Основная часть стрептомицина выделяется в культуральную среду, но часть его остается в мицелии и на его поверхности. С целью извлечения стрептомицина из культуры продуцента культуральную жидкость вместе с биомассой обрабатывают минеральной кислотой. При этом весь антибиотик переходит в раствор. Мицелий отделяют фильтрованием или центрифугированием. Свободную от мицелия культуральную жидкость обрабатывают щавелевой кислотой. При этом достигается удаление белков и органических оснований, ионов металлов (кальция, магния, железа). Далее ведется выделение стрептомицина в чистом виде. Для выделения культуральной жидкости в чистом виде используются методы адсорбции на активированном угле и метод ионообменной хроматографии. Стрептомицин десорбируют с угля разбавленным спиртовым раствором соляной кислоты, после его нейтрализуют и концентрируют путем выпаривания. Полученный концентрат обрабатывается ацетоном, осаждающим солянокислый стрептомицин. Смесь фильтруется через фильтр-пресс, причем фильтрат поступает на регенерацию растворителя. К безводному спиртовому

Глава 22. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ

раствору соли стрептомицина добавляют спиртовой раствор кальция хлорида, чтобы получить кристаллическую соль стрептомицина.

В асептических условиях соль стрептомицина растворяют в воде, пропускают через бактериальный фильтр для удаления микроорганизмов, лиофильно высушивают, измельчают в порошок и фасуют.

Биотехнологическое получение тетрациклинов

В 1948 году из почвы был выделен новый вид актиномицета - *Streptomyces aureofaciens*, образующий антибиотики – хлортетрациклин, тетрациклин и другие вещества. Эти антибиотики обладают широким антибиотическим действием в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, риккетсий, спирохет, хламидий и т.д. Хлортетрациклин был первым из выделенных тетрациклинов. В зависимости от свойств штамма в качестве источника энергии могут быть использованы различные углеводы, однако для промышленного производства представляют интерес лишь сахароза, крахмал и глюкоза. Максимальные выходы антибиотика достигаются в результате ограничения содержания неорганического азота в среде и заменой его сложными веществами биологического происхождения (мукой масличных семян, арахисом, копррой – ядром кокосового ореха). В среду во многих случаях добавляют кровяную муку, рыбную муку и гидролизированный казеин. В ограниченных концентрациях используют кукурузный экстракт и барду при определенном содержании фосфатов. Содержание фосфатов является важным фактором, поскольку пока весь неорганический фосфат полностью не будет преобразован в нуклеиновые кислоты и другие продукты обмена, образование тетрацилина не происходит. Также в среде необходимо присутствие катионов микроэлементов (Co, Cu, Zn, Mn, Fe). Примерный состав питательных сред: крахмал (зерно в перемолотом и набухшем состоянии) 2–5 %, сахароза (в виде сахара или свекольной патоки) 1–3 %, мука из масличного семени (отходы с низким содержанием жиров, арахис или соя) 1–3 %, мясные отходы (кровяная или мясная мука) 0,2–0,5 %, кукурузный экстракт 0,2–1,0 %, аммониевые соли 0,1–0,5 %, известь 0,5 %, поваренная соль 0,1–0,5 %, соли микроэлементов. Для ферментации желательно применять ферментаторы, изготовленные из нержавеющей стали или другого стойкого материала. В течение четырех дней, пока длится процесс, среда должна аэрироваться. Окончательное значение выхода продукта приближается к 1 %. Антибиотик может быть

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

осажден добавлением извести до рН 8,8. Затем он отфильтровывается на фильтр-прессе, экстрагируется разбавленной кислотой и очищается посредством фракционного осаждения: после перекристаллизации можно получить продукт, достигающий 98 % чистоты. Окситетрациклин был впервые изготовлен в 1950 году при культивировании актиномицета *Streptomyces rimosus*. Среда и условия ферментации подобны используемым при производстве хлортетрациклина, за тем исключением, что в качестве источника азота могут быть использованы нитраты и кукурузный экстракт. Окситетрациклин образует нерастворимый комплекс с солями четвертичного аммониевого основания, и этот комплекс может быть легко отделен от субстрата, после чего его размягчают соляной кислотой и затем кристаллизуют в виде соли уксусной кислоты. Как и другие тетрациклины, он выпускается главным образом в виде таблеток или суспензии. Тетрациклин был получен после хлортетрациклина и окситетрациклина, причем почти одновременно как путем направленной ферментации с помощью отобранных штаммов *Streptomyces aureofaciens* в условиях низкого содержания хлоридов в питательной среде, так и путем каталитического восстановления хлортетрациклина. В методе направленной ферментации используется ряд организмов, в том числе и *Streptomyces vicidifaciens*, при этом полученный штамм в адекватной среде может обеспечить большие выходы тетрациклина или равные количества хлортетрациклина и тетрациклина пропорционально количеству присутствующих ионов хлора. В случаях, когда необходимо избежать образования хлортетрациклина, содержание хлорида в среде не должно превышать 17 ч/млн. Если необходимо использовать в качестве основных компонентов субстрата сложные биологические вещества, то в условиях промышленного производства для контроля уровня хлоридов имеются два способа: 1) удалять большую часть хлоридов, пропуская компоненты, такие, как сахар-сырец и кукурузный экстракт, через ионообменные смолы. Этот метод вполне эффективен, если применяется к разбавленным растворам; 2) вводить в среду вещества, замедляющие утилизацию хлоридов, например, бромиды. Оказалось, что при концентрациях от 10 до 350 ч/млн, ионы брома практически подавляют образование хлортетрациклина, даже в присутствии ионов хлора в концентрации 1500 ч/млн. На практике применяют натрия бромид (5 %).

Глава 22. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ

Биотехнологическое получение макролидов

Большую группу антибиотиков (эритромицин, олеандомицин и др.), содержащих в своей структуре макроциклический лактонный фрагмент и продуцируемых различными штаммами *Streptomyces*, составляют так называемые макролиды. Наиболее известным представителем этой группы является эритромицин, который по спектру антибактериального действия близок к пенициллину и применяется для лечения больных с повышенной чувствительностью к пенициллину и тетрациклину. Культивирование продуцента эритромицина (*Streptomyces erythraea*) длится 150 часов при pH~7 на среде, приготовленной на основе крахмала, соевой муки, масла, кукурузного экстракта, сухих дрожжей и извести. Культуральную жидкость фильтруют на кизельгуре, и антибиотик экстрагируют с помощью амилацетата. Обычно фильтрат культуры и растворитель пропускают через установленный в системе смеситель, а затем через обычную центрифугу. Антибиотик можно разбавить буферным раствором, осадить ацетоном и натрия хлоридом, и, наконец, кристаллизовать его из ацетонового раствора.

22.4 Биологические и инструментальные методы стандартизации антибиотиков

Стандартизация антибиотиков биологическими методами и определение их антимикробной активности

Количественное определение антибиотиков микробиологическим методом (статья 2.7.2. ГФ РБ, второе издание, первый том, С. 327-342)

Активность антибиотика определяют путем сравнения степени угнетения роста чувствительных микроорганизмов под действием испытуемого антибиотика и стандартного образца в известных концентрациях.

Метод диффузии

Питательную среду определенного состава расплавляют и заливают тонким слоем на чашку Петри для формирования однородного слоя толщиной от 2 до 5 мм. Среда может также состоять из двух слоев, из которых только верхний подвергнется инокуляции. Микроорганизмы, чувствительные к испытуемому антибиотику, выращивают на скошенном

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

агаре (суточная культура) и приготавливают суспензию, которую стандартизируют по единицам мутности (МакФарланду) в пробирке. Отбирают определенный объем суспензии из пробирки и засевают микроорганизмы на чашку Петри при подходящей температуре, например, при 48–50°C для вегетативных форм и при 65–70°C при использовании суспензии спор. Количество суспензии микроорганизмов выбирают таким образом, чтобы образовывались четко определенные зоны ингибирования требуемого диаметра при концентрациях антибиотика, используемых в определении.

Чашки хранят таким образом, чтобы не происходило заметного роста или гибели микроорганизмов до их использования, а поверхность среды была сухой к моменту использования.

Используя растворитель и буферный раствор, указанный в таблице ГФ РБ, готовят растворы стандартного образца антибиотика и испытуемого антибиотика, имеющие известные концентрации и предположительно равные активности. Для оценки достоверности количественного определения используют не менее трех доз стандартного образца и трех доз испытуемого антибиотика, имеющих равные предполагаемые активности. Растворы наносят на поверхность среды, например, в стерильных цилиндрах из фарфора, нержавеющей стали или другого подходящего материала, или в лунки, сделанные в агаре. В каждый цилиндр или лунку должны быть помещены равные объемы раствора.

Рекомендуемая последовательность внесения стандартного и испытуемого образцов в цилиндры или лунки каждой чашки: первыми вносятся растворы с малой концентрацией, затем со средней концентрацией, последними вносят растворы с большими концентрациями.

Все растворы стандартного и испытуемого образцов вносят в цилиндры или лунки одной чашки Петри таким образом, чтобы растворы с большими концентрациями не соприкасались между собой.

Чашки инкубируют при подходящей температуре около 16–20 ч. Чашки могут выдерживаться до инкубации при комнатной температуре или, если необходимо, при температуре 4°C в течение определенную промежутка времени, обычно от 1 до 4 ч для протекания диффузии, что уменьшает эффекты вариаций временных интервалов между нанесением растворов.

Измеряют диаметры (с точностью не ниже 0,1 мм) или площади кольцевых зон ингибирования (с соответствующей точностью).

Глава 22. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ

Метод турбодиметрии

Подходящую питательную среду с суспензией выбранного микроорганизма, обладающую чувствительностью к тестируемому антибиотику, инокулируют таким образом, чтобы в условиях определения происходило достаточно значительное ингибирование микробного роста.

Количество суспензии выбирают таким образом, чтобы получить после 4 ч инкубации помутнение, легко поддающееся количественной оценке.

Инокулированную среду используют немедленно после ее приготовления. Используя растворитель и буферный раствор, указанные в таблице ГФ РБ, готовят растворы стандартного образца и испытуемого антибиотика, имеющие известные концентрации и предположительно равные активности.

Для оценки достоверности количественного определения используют не менее трех доз стандартного образца и трех доз испытуемого антибиотика.

Помещают равные объемы каждого из растворов в идентичные пробирки и прибавляют в каждую пробирку равные объемы инокулированной среды.

Одновременно готовят две контрольные пробирки без антибиотика, содержащие инокулированную среду. В одну из них немедленно прибавляют формальдегид. Эти пробирки используют для настройки оптического прибора, используемого для измерения роста.

Все пробирки помещают в водяную баню или в другой подходящий аппарат, позволяющий быстро довести температуру всех пробирок до соответствующей температуры инкубации и поддерживать пробирки при этой температуре в течение 3–4 ч, обеспечивая однородность температурного режима и равное время инкубации.

По окончании инкубации рост микроорганизмов останавливают прибавлением формальдегида в каждую пробирку или тепловой обработкой и измеряют степень мутности, используя подходящий оптический прибор.

Стандартизация антибиотиков инструментальными методами

Бензилпенициллин натрия (статья ГФ РБ 07/2016:0114).

Описание. Белый кристаллический порошок. Легко растворим в воде, практически нерастворим в жирных и минеральных маслах.

Часть 3. Частные вопросы биотехнологии. Микробная биотехнология

Подлинность. Проводится методом ИК-спектрометрии, методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках со слоем силикагеля. Система растворителей: ацетон, раствор аммония ацетата в уксусной кислоте. Проявляют парами йода. Дает качественные реакции с раствором формальдегида в серной кислоте при нагревании (коричневое окрашивание), реакции на хлориды и натрий.

Посторонние примеси. Определяют значение рН, удельное оптическое вращение (от +285 до +310). Измеряют оптическую плотность при 264, 280 и 325 нм (должны быть установленные значения). Проверяют на наличие примеси 2-этилгексановой кислоты. Определяют стерильность, пирогенность, бактериальные эндотоксины, аномальную токсичность и антимикробную активность.

Сопутствующие примеси и количественное определение методом жидкостной хроматографии.

Цефазолин натрия (статья ГФ РБ 07/2016:0988).

Описание. Белый кристаллический порошок. Гигроскопичен. Легко растворим в воде, мало растворим в этаноле.

Подлинность. ИК-спектрометрия и качественные реакции на натрий.

Посторонние примеси. Прозрачность. Оптическая плотность при 430 нм. Удельное оптическое вращение от – 15 до – 24. Максимум поглощения при 272 нм с удельным показателем поглощения от 260 до 300. Определяют бактериальные эндотоксины, пирогенность, аномальную токсичность и стерильность.

Сопутствующие примеси и количественное определение методом жидкостной хроматографии.

Стрептомицина сульфат (статья ГФ РБ 07/2016:0053).

Описание. Белый кристаллический порошок. Гигроскопичен. Очень легко растворим в воде, практически нерастворим в этаноле.

Подлинность. Проводится методом ТСХ на пластинках со слоем карбомера. Система растворителей: раствор калия дигидрофосфата. Проявляют 1,2-дигидроксинафталином в среде серной кислоты. Качественные реакции с раствором хлорида железа (фиолетовое окрашивание), с раствором α -нафтола и натрия гипохлоритом (красное окрашивание), реакция на сульфаты.

Посторонние примеси. Цветность, прозрачность, значение рН. Определяют содержание метанола и стрептомицина В. Потеря в массе при

Глава 22. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ

высушивании. Сульфатная зола. Сульфаты. Колориметрическое испытание с железа аммония сульфатом и измерением оптической плотности при 525 нм. Бактериальные эндотоксины, аномальная токсичность, микробиологическая чистота.

Количественное определение проводят биологическим методом.

Тетрациклин (статья ГФ РБ 07/2016:0211).

Описание. Желтый кристаллический порошок. Мало растворим в воде, метаноле и этаноле, умеренно в ацетоне. Растворим в растворах кислот и щелочей.

Подлинность. Проводят методом ТСХ на пластинке со слоем силикагеля октадецилсилильного с люминофором (F₂₅₄). Система растворителей: смесь ацетонитрила, метанола, щавелевой кислоты в растворе аммиака разведенного. Просматривают в УФ-свете при 254 нм. Качественная реакция с серной кислотой (красно-фиолетовое окрашивание).

Посторонние примеси. Определяют значение рН, удельное оптическое вращение от – 260 до – 280. Тяжелые металлы. Потеря в массе при высушивании. Сульфатная зола. Микробиологическая чистота.

Сопутствующие примеси и количественное определение методом жидкостной хроматографии.

Эритромицин (статья ГФ РБ 07/2016:0179).

Описание. Белый или желтоватый порошок. Гигроскопичен. Мало растворим в воде, легко растворим в спирте.

Подлинность. Используют методы ИК-спектromетрии и ТСХ на пластинках со слоем силикагеля (система растворителей: смесь 2-пропанола в растворе аммиака с аммония ацетатом и этилацетат, проявляют анисовым альдегидом при нагревании). Качественные реакции с ксантогидролом в кислой среде (появляется красное окрашивание); при выдерживании в хлористоводородной кислоте появляется желтое окрашивание.

Посторонние примеси. Удельное оптическое вращение от – 71 до – 78. Определяют тиоцианаты, сульфатную золу, микробиологическую чистоту.

Сопутствующие примеси и количественное определение методом жидкостной хроматографии.

Литература

Албертс, Б. Молекулярная биология клетки / Б. Албертс [и др.]. – М.: Мир, 1994. – 444с.

Березин, И.В. Иммуобилизованные ферменты. Биотехнология. Кн. 7: учеб, пособие для вузов / И.В. Березин [и др.]. — М.: Высш. шк., 1987. — 159с.

Березин, И.В. Инженерная энзимология. Биотехнология. Кн. 8: учеб, пособие для вузов / И. В. Березин [и др.]. — М.: Высш. шк., 1987. — 143с.

Биотехнология лекарственных средств: учеб. пособие / под ред. В.А. Быкова, М.В. Данилина. — М.: Медбиоэкономика, 1991. — 303 с.

Биотехнология: учебное пособие к лабораторным работам для студентов V курса фармацевтического факультета. В 2-х частях. Часть 1. СПб.: Изд-во СПХФА, 2011. – 79 с.

Биотехнология: учебное пособие к лабораторным работам для студентов V курса фармацевтического факультета. В 2-х частях. Часть 2. СПб.: Изд-во СПХФА, 2011. – 96 с.

Блинов, Н.П. Основы биотехнологии / Н.П. Блинов. – СПб.: Наука, 1995. – 600 с.

Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебное пособие. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.

Быков, В.А. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов. Биотехнология. Кн. 6: учеб, пособие для вузов / В.А. Быков [и др.]. – М.: Высш. шк., 1987. – 143с.

Быков, В.А. Производство белковых веществ. Биотехнология. Кн. 5: учеб, пособие для вузов / В. А. Быков [и др.]. – М.: Высш. шк., 1987. – 142с.

Выделение и очистка продуктов биотехнологии. Методическое пособие / авт.: Д.А. Новиков – Минск: БГУ, 2014. – 256 с.

Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак // пер. с англ. — М.: Мир, 2002. — 589 с.

Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФ РБ II) : в 2-х т. / М-во здравоохранения Республики Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» ; под общ. ред. А. А. Шерякова. – Молодечно : тип. «Победа», 2012. – Т. 1 : Общие методы контроля качества лекарственных средств. – 1220 с.

Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФ РБ II) : в 2-х т. / РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» ; под общ. ред.

С. И. Марченко. – Молодечно : Победа, 2016. – Т. 2 : Контроль качества субстанций для фармацевтического использования и лекарственного растительного сырья. – 1368 с.

Грачева, И.М. Технология ферментных препаратов / И.М. Грачева, А.Ю. Кривова. – М.: Элевар, 2000. – 512с.

Данелия, Г.Н. Безбилетный пассажир / Г.Н. Данелия. – М.: Эксмо-Пресс, 2018 – 480 с.

Дебабов В.Г. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. Биотехнология. Кн. 2: учеб, пособие для вузов / В. Г. Дебабов, В.А. Лившиц. — М.: Высш. шк., 1988. — 208с.

Егоров, Н.С. Основы учения об антибиотиках / Н.С. Егоров. — М.: Наука, 2004. – 525с.

Загоскина, Н.В. Биотехнология: теория и практика: Учеб. пособие для вузов / Н.В. Загоскина [и др.]. – М.: Изд-во Оникс, 2009. – 496 с.

Иммобилизованные клетки и ферменты / под ред. Дж. Вудворта // пер. с англ. – М.: Мир, 1998. – 321с.

Иммобилизованные клетки микроорганизмов / А. П. Синицин [и др.]. — М.: МГУ, 1994. – 288с.

Катлинский, А.В. Лекарственные препараты направленного действия: история создания и механизмы действия / А.В. Катлинский. — М.: Изд-во Димитрейд график групп, 2003. — 228 с.

Контроль качества биотехнологических производств: краткий курс лекций для студентов III курса направления подготовки 19.03.01 Биотехнология / Сост.: Ковалева С.В., Фауст Е.А. // ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. – Саратов, 2015. – 57 с.

ЛАЛ-тест – современный метод определения пирогенности: методическое пособие для слушателей ЦПКС и студентов фармацевтических и медицинских ВУЗов. / Н.В. Глазова, А.В. Караваева, Е.П. Яковлева. - СПб.: Изд-во СПХФА, 2012. – 18 с.

Манаков, М.Н. Теоретические основы технологии микробиологических производств / М.Н. Манаков, Д.Г. Победимский. – М.: Агропромиздат, 1990. – 272с.

Матвеев, В.Е. Научные основы микробиологической технологии / В.Е. Матвеев. – М.: Агропромиздат, 1985. – 224с.

Молекулярные и клеточные аспекты биотехнологии / под ред. С.Г. Инге-Вечтомова. — Л.: Наука, 1986. — 256с.

Навашин, С.М. Перспективы современной биотехнологии в области антибиотиков. Биотехнология / С.М. Навашин, Ю.О. Сазыкин; под ред. А.А. Баева. – М.: Наука, 1984. – 309с.

Надлежащая клиническая практика: ТКП 184-2009 (02040). – Введ. 07.06.09. – Минск : М-во здравоохран. Респ. Беларусь, 2009. – 77 с.

Надлежащая лабораторная практика: ТКП 125-2008 (02040). – Введ. 28.03.08. – Минск : М-во здравоохран. Респ. Беларусь, 2008. – 35 с.

Надлежащая производственная практика: ТКП 030-2017 (33050). – Введ. 19.06.17. – Минск: М-во здравоохран. Респ. Беларусь, 2017. – 210 с.

Основы промышленной иммунобиотехнологии: учебное пособие / В.М. Безгин, Н.Н. Быкова, В.Е. Козлов, А.А. Нежута, А.В. Сверчков. Учебное пособие. — Курск: Изд-во КГСХА, 2011. — 512с.

Организация системы качества биотехнологических и фармацевтических производств: учебное пособие / авторы-составители Л.Д. Быстрицкий [и др.]. – Томск: Изд-во Томского политехнического ун-та, 2011. – 258 с.

Прищеп, Т.П. Основы фармацевтической биотехнологии: учеб. пособие / Т.П. Прищеп [и др.]. – Ростов-на-Дону: Феникс; Томск: Издательство НТЛ, 2006. – 256 с.

Проектирование биотехнологических производств: Методические указания к курсовому и дипломному проектированию для студентов IV и V курсов факультета промышленной технологии лекарств. СПб.: Изд-во СПХФА, 2005. – 64 с.

Производство лекарственных средств. Контроль качества и регулирование: Практическое руководство: пер. с англ. / Ш. К. Гэд [и др.]. – СПб.: ЦОП «Профессия», 2013. – 960 с.

Производство лекарственных средств. Химическая технология от R&D до производства / Д. Энде [и др.]; под ред., В.В. Береговых. - СПб: ЦОП «Профессия», 2015. - 1280 с.

Процессы и аппараты биотехнологических производств Учебное пособие / А.Г. Новоселов [и др.]. – СПб.: Университет ИТМО, 2018 . – 51 с.

Сазыкин, Ю.О. Биотехнология: учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. – 3-е изд., стер. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.

Фармацевтическая биотехнология: рук. к практ. занятиям: Учеб. пособие / С.Н. Орехов [и др.]; под ред. А.В. Катлинского. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. — 432 с.

Ферментационные аппараты для процессов микробиологического синтеза / под ред. В.А. Быкова. М.: ДеЛи Принт, 2005. – 278 с.

Учебное издание

**Моисеев Дмитрий Владимирович,
Лукашов Роман Игоревич,
Веремчук Оксана Александровна и др.**

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Пособие

Редактор Д.В. Моисеев
Технический редактор И.А. Борисов
Компьютерная верстка Д.В. Моисеев

Подписано в печать _____ г. Формат бумаги 64x84 1/16.

Бумага типографская №2. Гарнитура Times New Roman.

Усл. печ.л. 16. Уч.-изд. л. ____.

Тираж 350 экз. Заказ № ____.

Издатель и полиграфическое исполнение
УО «Витебский государственный медицинский университет»
ЛП 023330/453 от 30.12.2013
Пр. Фрунзе, 27, 210023, г. Витебск.