

OÑTÝSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Oñtýstik Qazaqstan medicina akademiasy» AҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 1 из 88	

ЛЕКЦИОННЫЙ КОМПЛЕКС

Дисциплина: ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Код дисциплины: FB 3308

Название и шифр ОП: 6В10106 - Фармация

Объем учебных часов/кредитов: 120 часов (4

кредита) **Курс и семестр изучения:** 3 курс, 6


семестр **Объем лекции:** 10 часов

Шымкент, 2024 год

OÑTÚSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 5 из 88

Лекционный комплекс разработан в соответствии с рабочей учебной программой дисциплины (силлабусом) «Фармацевтическая биотехнология» и обсужден на заседании кафедры.

Протокол № 10 31.05.2024 г.

**Заведующая кафедрой технологии лекарств,
 доктор фармацевтических наук, профессор**  **Сагиндыкова Б.А.**

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 6 из 88	

ЛЕКЦИЯ № 1

1. Тема: Современное состояние и перспективы развития биотехнологического производства лекарственных средств. Основные понятия и термины биотехнологии.

2. Цель: обучающийся должен усвоить современную биотехнологию. Связь с фундаментальными науками. Основные термины и понятия биотехнологии.

3. Тезисы лекции:

Биотехнология – одна из важнейших современных научных дисциплин, необходимых фармацевту, 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.

Основой, обеспечивающей благоприятную ситуацию для бурного развития биотехнологии, явились революционные открытия и разработки:

- доказательства роли нуклеиновых кислот в хранении и передаче наследственной информации в биологических системах (имеются в виду индивидуальные клетки и отдельные организмы, а не их популяции);
- расшифровка универсального для всех живых организмов генетического кода;
- раскрытие механизмов регуляции функционирования генов в процессе жизни одного поколения организмов;
- совершенствование существующих и разработка новых технологий культивирования микроорганизмов, клеток растений и животных;
- как логическое следствие из вышесказанного, явилось создание (возникновение) и бурное развитие методов генетической и клеточной инженерии, с помощью которых искусственно создаются новые высокопродуктивные формы организмов, пригодные для использования в промышленных масштабах.

Термин «биотехнология» был введен в 1917 г. венгерским инженером Карлом Эреки при описании процесса крупномасштабного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы.

По определению Эреки, **биотехнология – это «все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты».**

Абсолютно новым направлением является так называемая инженерная энзимология, возникшая вследствие развития современных методов изучения структуры и синтеза белков-ферментов и выяснения механизмов функционирования и регуляции активности этих соединений (важных элементов клетки).

Достижения в этой области позволяют направленно модифицировать белки различной сложности и специфичности функционирования, разрабатывать создание мощных катализаторов промышленно ценных реакций с помощью высоко стабилизированных иммобилизованных ферментов.

Все эти достижения вывели биотехнологию на новый уровень ее развития, позволяющий сознательно и целенаправленно управлять сложными клеточными процессами.

Данная новая область биологических знаний и ее последние достижения уже стали крайне важными для здоровья и благополучия человека.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 7 из 88	

Термин биотехнология включает составляющие «биос», «техне», «логос» греческого происхождения (от греч. «биос» – жизнь, «техне» – искусство, мастерство, умение и «логос» – понятие, учение).

Таким образом, из приведенных определений, биотехнология по существу сводится к использованию микроорганизмов, животных и растительных клеток или же их ферментов для синтеза, разрушения или трансформации (превращения) различных материалов с целью получения полезных продуктов для различных нужд человека.

В биотехнологии выделяют **медико-фармацевтическое, продовольственное, сельскохозяйственное и экологическое направления**. В соответствии с этим биотехнологию можно условно разделить на **медицинскую, сельскохозяйственную, промышленную и экологическую**.

Перспективы развития биотехнологии в различных отраслях:

- в промышленности (пищевая, фармацевтическая, химическая, нефтегазовая): использование биосинтеза и биотрансформации веществ на основе сконструированных методами геной инженерии штаммов бактерий и дрожжей с заданными свойствами;
- в сельском хозяйстве: биологических средств защиты растений, биоудобрений и регуляторов роста, микробиологических методов рекультивирования почв; в области животноводства – получение вакцин и сывороток, создание эффективных кормовых препаратов из микробной биомассы и отходов сельского хозяйства;
- в медицине: разработка медицинских биопрепаратов, диагностикумов, вакцин, развитие иммунобиотехнологии;
- в экологии: разработка экологически безопасных технологий очистки сточных вод, утилизация отходов, конструирование экосистем;
- в энергетике: применение новых источников биоэнергии, биоконверсия биомассы в биогаз и биотопливо.

Поэтому несмотря на то, что большие материальные затраты и длительное время уходит на фундаментальные исследования, основной целью биотехнологии является получение целевого продукта, рентабельного производства и, следовательно, того, что необходимо людям в большей или меньшей степени.

Биотехнологические направления имеют своей целью создание и практическое внедрение (т. е. практическое использование):

- новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов, используемых в здравоохранении для диагностики, профилактики и лечения различных заболеваний;
- биологических средств защиты сельскохозяйственных растений от возбудителей заболеваний и вредителей, бактериальных удобрений и регуляторов роста растений и животных;
- ценных кормовых добавок для повышения продуктивности сельскохозяйственных животных (кормового белка, аминокислот, витаминов, ферментов, способствующих повышению усвояемости кормов, и т. п.);
- новых биоинженерных методов для получения высокоэффективных препаратов различного назначения, используемых в сельском хозяйстве и ветеринарии;
- новых технологий создания и получения хозяйственно ценных продуктов для пищевой, химической и микробиологической промышленности;
- эффективных технологий переработки сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов для получения продуктов, которые могут использоваться в других отраслях хозяйственной деятельности человека (например, биогаза, удобрений, топлива для автомобилей и т. п.).

Биотехнологическое производство

Выделяют 5 стадий, этапов, или операций, биотехнологического производства.

Две начальные стадии включают подготовку необходимой культуры микроорганизма-продуцента (т.е., биологически действующего начала) и сырья. При осуществлении микробиологического синтеза необходимы стадии приготовления

питательной среды и поддержания чистой культуры, которая могла бы постоянно или по мере необходимости использоваться в процессе.

Третья стадия - стадия ферментации, на которой происходит образование целевого продукта. На этой стадии идет микробиологическое превращение компонентов питательной среды сначала в биомассу, затем, если это необходимо, в целевой метаболит.

На четвертом этапе из культуральной жидкости выделяют и очищают целевые продукты. Процессы

выделения и очистки, часто занимающие важное место среди др. технологических операций, определяются химической природой получаемого вещества и могут включать экстракционные и хроматографические методы, кристаллизацию, фильтрацию, осаждение и др.

Заключительная стадия промышленного производства - приготовление товарных форм продуктов. Общим свойством большинства продуктов микробиологического синтеза является их недостаточная стойкость к хранению, следовательно, на заключительной стадии производства крайне важны способы стабилизации и консервации целевых продуктов.



Центральной среди этапов промышленного производства является **стадия ферментации**. Под ферментацией понимают всю совокупность последовательных операций от внесения в заранее приготовленную и термостатированную среду инокулята до завершения процессов роста, биосинтеза или биотрансформации.

Выбор биотехнологических объектов

Принципы подбора биотехнологических объектов

Штамм-продуцент должен характеризоваться следующими свойствами:

- способностью расти в чистой культуре и генетической стабильностью;
- отсутствием патогенности и токсичности;
- высокой скоростью роста при массовом культивировании и способностью синтезировать продукт в большом количестве и за короткий промежуток времени (до 3 суток);
- устойчивостью к контаминации (например, за счет изменения физико-химических условий среды, способности к росту при повышенных температурах или к синтезу антибиотиков);
- способности расти на простых и дешевых питательных средах.

Биотехнологическое использование микроорганизмов

условно можно разбить на несколько основных групп:

- получение живой или инактивированной микробной биомассы (производство пекарских, винных, кормовых дрожжей; вакцин, белково-витаминных концентратов, средств защиты

OŃTŪSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «OŃTŪSTIK Qazaqstan medicina akademiasy» AҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 9 из 88	

растений, заквасок для получения кисломолочных продуктов и силосования кормов, почвоудобрительных препаратов и т.д.);

- получение продуктов метаболизма микроорганизмов (антибиотики, гормоны, аминокислоты, витамины, органические кислоты и т.д.);
- получение ферментов микробного происхождения;
- получение рекомбинантных продуктов;
- биотрансформация веществ;
- утилизация неприродных соединений.

Фармацевтическая биотехнология представляет собой отрасль по разработке, производству и продвижению на рынок лицензируемых лекарственных препаратов и медикаментов.

Эту отрасль отличает разнообразие форм законодательного и государственного регулирования в отношении патентирования, тестирования, обеспечения безопасности и эффективности производимых лекарств.

История развития фармацевтической биотехнологии

Первое упоминание о приготовлении лекарств - Гиппократ (400 лет до н.э.) – *apotheca* – место хранения.

К XIX веку многие аптеки в Европе и Северной Америке превратились в крупные фармацевтические компании.

Большая часть нынешних фармацевтических компаний образовалась еще в конце XIX – начале XX века.

В 1920–1930-х годах были открыты инсулин и пенициллин, ставшие важнейшими лекарствами, производимыми в массовых масштабах.

В те годы наиболее развитой фармацевтической промышленностью обладали Швейцария, Германия и Италия. За ними следовали Великобритания, США, Бельгия и Голландия.

К этому же времени относится разработка законодательства, регулирующего тестирование и процесс одобрения лекарств и требующего использования соответствующих брендов.

Стало возможным законодательно отделять рецептурные и безрецептурные лекарства.

В 1950-х годах было разработано и получило массовое распространение большое число новых лекарств, включая кортизон, различные сердечные средства.

В 1960-е годы появились *транквилизаторы и психотропные* препараты, такие как хлопромазин, халоперидол, диазепам, нашедшие исключительно широкое применение.

Одновременно были сделаны попытки усилить государственное регулирование, ограничить финансовые связи фармацевтических компаний с врачами, выписывающими лекарства, что выразилось, в частности, в создании американской Администрации пищевых продуктов и лекарств (FDA).

В 1964 году Международная медицинская ассоциация выпустила свою хельсинскую декларацию, устанавливающую стандарты для клинических исследований. Фармацевтические компании обязали доказывать эффективность новых лекарств в клинических условиях до запуска их в широкую продажу.

1970-е годы были периодом противораковых средств. С 1978 года Индия становится ведущим центром производства фармацевтической продукции без патентной защиты. С этого времени начинается период ее бурного роста фармацевтической промышленности. Большинство стран принимает жесткое патентное законодательство.

К середине 1980-х годов малые биотехнологические компании стали активно создавать альянсы и партнерства с крупными фармацевтическими корпорациями. Ужесточилось законодательство в области безопасности и экологии, а новые лекарства, направленные на борьбу с ВИЧ-инфекциями и заболеваниями сердца, стали визитной карточкой десятилетия.

ONTUSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 10 из 88	

1990-е годы ознаменовались ростом контрактов с исследовательскими организациями на проведение клинических испытаний и базовых исследований и разработок.

В США с принятием в 1997 году нового законодательства, либерализующего требования к рискам. Появилось новое поколение антидепрессантов, включая наиболее популярный Флуоксетин. Начали активно развиваться так называемая альтернативная медицина и производство пищевых добавок.

Современная биотехнология концентрируется на исследовании метаболических процессов, происходящих во время той или иной болезни или патогенных состояний, и использует молекулярную биологию и биохимию. Большая часть ранних стадий процесса открытия новых лекарств традиционно осуществляется университетами и исследовательскими организациями.

В 2006 году общий объем мирового фармацевтического рынка оценивался в 640 млрд долл., из которых почти 50% приходилось на США.

Фармацевтическая промышленность остается одной из самых прибыльных отраслей, с рентабельностью продаж на уровне 17%.

Самым продаваемым в мире лекарством являются таблетки против холестерина Липитор компании Pfizer, годовой объем продаж которых составил в 2008 году **13 млрд долл.**, более чем вдвое превышая объем продаж ближайших конкурентов – Плавикса, сердечно-сосудистого средства компании Bristol-Myers Squibb, и антиастматического препарата Адвер компании GlaxoSmithKline.

В табл. 1 приводятся данные по крупнейшим глобальным фармацевтическим и биотехнологическим компаниям (Big Pharma с объемом продаж свыше 3 млрд долл. и затратами на НИОКР свыше 500 млн долл.).

В табл. 1 приводятся данные по крупнейшим глобальным фармацевтическим и биотехнологическим компаниям (Big Pharma с объемом продаж свыше 3 млрд долл. и затратами на НИОКР свыше 500 млн долл.).

Все новые медицинские препараты, появляющиеся на рынке, – результат длительного, дорогого и рискованного процесса исследований и разработок, проводимых фармацевтическими компаниями.

Процесс исследований и разработок в фармацевтической промышленности складывается из нескольких стадий.

1. Первая стадия – это получение патента и начало доклинических исследований. Ее продолжительность составляет обычно четыре года.

2. Затем наступает стадия клинических испытаний, включающая в себя **три фазы**, которая длится около 7 лет.

3. Наконец, последняя стадия (или четвертая фаза) продолжительностью три года подразумевает получение разрешения на маркетинг лекарства, формирование цены и другие административные процедуры.

Весь процесс занимает в среднем 13–15 лет.

Из общих объемов затрат на НИОКР, составляющих в фармацевтических компаниях 18–20% от продаж,

примерно 27% направляется на доклинические исследования.

Почти 54% приходится на клинические испытания,

5% идет на получение различных разрешений от государственных органов

и 14% – на дополнительные испытания, необходимые уже после получения разрешительной документации

Задачи фармацевтической биотехнологии:

- изыскание новых лекарственных средств (ЛС) для предупреждения и лечения заболеваний
- изучение механизмов и эффектов действия лекарственных веществ,
- изучение особенностей поступления их в организм,

OŃTŪSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «OŃTŪSTIK Qazaqstan medicina akademiasy» AҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 11 из 88	

- изучение способов распределения в органах и тканях, реакций метаболизма и путей выведения,
- создание высокоэффективных лекарственных препаратов для профилактики и лечения заболеваний, что увеличивает продолжительность жизни и период трудоспособной активности людей.

Фармацевтическая биотехнология тесно связана с:

- зоологией и ботаникой,
- микробиологией,
- физиологией,
- химией,
- биохимией и молекулярной биологией,
- генетикой
- медициной,
- фармацией и другими науками.

Источники получения лекарственных веществ:

В арсенале лекарственных средств, помимо синтетических препаратов, значительное место занимают *препараты и индивидуальные вещества из лекарственного сырья* (растительного, животного происхождения и из минералов). Таким путем получены многие широко применяемые медикаменты не только в виде более или менее очищенных препаратов (*галеновы, новогаленовы, органопрепараты*), но также в виде индивидуальных химических соединений (*алкалоиды, гликозиды*).

Так, из *опия* выделяют алкалоиды *морфин, кодеин и папаверин*, из растения *раувольфии змеевидной* — *резерпин*, из *наперстянки* — сердечные гликозиды *дигитоксин, дигоксин*; из ряда *эндокринных желез* — *гормоны*.

Некоторые лекарственные вещества являются продуктами жизнедеятельности *грибов и микроорганизмов*. Из них наибольший интерес представляют *антибиотики*.

Лекарственные вещества растительного, животного, микробного и грибкового происхождения *часто служат основой для их синтеза*, а также последующих химических модификаций и получения полусинтетических и синтетических препаратов.

Алкалоиды — азотистые органические соединения, содержащиеся главным образом в растениях.

Свободные алкалоиды представляют собой основания (отсюда название алкалоидов: alqilī (арабск.) — щелочь, eidos (греч.) — вид). Многие алкалоиды обладают высокой биологической активностью (морфин, атропин, пилокарпин, никотин и др.).

Гликозиды — группа органических соединений растительного происхождения, распадающихся при воздействии ферментов или кислот на сахар, или гликон (от греч. glykys — сладкий), и несахаристую часть, или агликон. Ряд гликозидов используется в качестве лекарственных средств (*строфантин, дигоксин* и др.).

Пути поиска новых лекарственных средств, их клинические испытания

1. Химическая лаборатория
2. Фармакологическая лаборатория
3. Лаборатория готовых лекарственных форм
4. Фармакологический комитет
5. Клинические испытания
6. Управление по внедрению новых лекарственных средств
7. Химико-фармацевтическая промышленность
8. Внедрение в медицинскую практику

Поиск новых лекарственных средств развивается по следующим направлениям

I. Химический синтез препаратов

A. Направленный синтез:

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ		SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 12 из 88	

- воспроизведение биогенных веществ;
- создание антиметаболитов;
- модификация молекул соединений с известной биологической активностью;
- сочетание структур двух соединений с необходимыми свойствами;
- синтез, основанный на изучении химических превращений веществ в организме.

Б. Эмпирический путь:

- случайные находки;
- «скрининг».

II. Получение препаратов из лекарственного сырья и выделение индивидуальных веществ:

- животного происхождения;
- растительного происхождения;
- из минералов.

Качество препаратов, выпускаемых химико-фармацевтической промышленностью, обычно оценивают с помощью химических и физико-химических методов, указанных в *Государственной фармакопее*. В отдельных случаях, если строение действующих веществ неизвестно или химические методики недостаточно чувствительны, прибегают к так называемой **биологической стандартизации** (определение активности лекарственных средств на биологических объектах (по наиболее типичным эффектам)). Таким путем оценивают препараты *гормонов, сердечных гликозидов и др.* Выражается активность в условных единицах действия (ЕД). Для сравнения используют стандарт, имеющий постоянную активность. Методы биологической стандартизации и вещества, для которых они обязательны, указаны в Государственной фармакопее

4. Иллюстративный материал: презентация.

5. Литература: см.приложение 1.

6. Контрольные вопросы:

1. Современная биотехнология. Введение. Предмет и задачи.
2. Краткая историческая справка. Связь с фундаментальными науками.
3. Основные термины и понятия биотехнологии.

OÑTÜSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 13 из 88	

ЛЕКЦИЯ № 2

1. Тема: Биообъект как средство производства. Классификация биообъектов, их свойства. Методы биотехнологии. Физиологические подходы направленного биосинтеза целевых продуктов.

2. Цель: обучающийся должен усвоить методы биотехнологии. Физиологические подходы направленного биосинтеза целевых продуктов. Сохранение культуры.

3. Тезисы лекции:

1. Биообъект как средство производства. Классификация биообъектов, их свойства.
2. Методы биотехнологии.
3. Физиологические подходы направленного биосинтеза целевых продуктов.

Биообъект – центральный и обязательный элемент биотехнологического производства, определяющий его специфику.

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

Активность и стабильность в активном состоянии биообъектов – одни из важнейших показателей их пригодности для длительного использования в биотехнологии.

Таким образом, независимо от систематического положения биообъекта, на практике используют либо природные организованные частицы (фаги, вирусы) и клетки с естественной генетической информацией, либо клетки с искусственно заданной генетической информацией, то есть в любом случае используют клетки, будь то микроорганизм, растение, животное или человек.

Биообъекты – Микроорганизмы:

Эукариоты (простейшие, грибы, дрожжи)

Прокариоты(актиномицеты, зубактерии) вирусы,

Основой большинства современных биотехнологических производств до сих пор все еще является микробный синтез, т. е. синтез разнообразных биологически активных веществ с помощью микроорганизмов.

К сожалению, объекты растительного и животного происхождения в силу ряда причин еще не нашли столь широкого применения.

Независимо от природы объекта, первичным этапом разработки любого биотехнологического процесса является получение чистых культур организмов (если это микробы), клеток или тканей (если это более сложные организмы – растения или животные).

Биообъект как участник технологического процесса

макро-био-объекты (человек, животные, растения):

- высокоорганизованные живые системы, пластично приспособлены к абсолютно автономному существованию в условиях внешней среды
- получение биомассы (ткани, биожидкости, клетки) происходит в природных условиях (плантационное культивирование ЛР, разведение змей, пчел, пиявок).

микро-био-объекты

- не способны к автономному существованию во внешней среде, необходимо создать техногенную экологическую нишу для обеспечения:
- условий для существования био-объекта в монокультуре;
- экономически целесообразных темпов функционирования для получения необходимого количества биомассы;
- защиты культуры-продуцента от внешних неблагоприятных факторов;
- защиты культуры-продуцента от контаминации патогенной микрофлорой (*лизогенный фаг для коклюшных бактерий, онкогенные вирусы для вируса полиомиелита*);

ONTUSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 14 из 88	

- защиты окружающей среды от выбросов патогенных штаммов- продуцентов (*при получении ксантана фитопатогенный Xantomonas campestris, при получении витамина B2 гриб Eremothecium – паразит хлопчатника*).

Биообъекты

Макромолекулы:

- **ферменты всех классов** (чаще гидролазы и трансферазы);
- в т.ч. в иммобилизованном виде (связанные с носителем) обеспечивающем многократность использования и стандартность повторяющихся производственных циклов

- **ДНК и РНК** – в изолированном виде, в составе чужеродных клеток

2) Микроорганизмы:

- **вирусы** (с ослабленной патогенностью используются для получения вакцин);
- **клетки прокариоты и эукариоты**
- **продуценты первичных метаболитов:** аминокислот, азотистых оснований, коферментов, моно- и дисахаров, ферментов для заместительной терапии и т.д.);
- **продуценты вторичных метаболитов:** антибиотики, алкалоиды, стероидные гормоны, и др.
- **нормофлоры** – биомасса отдельных видов микроорганизмов применяемые для профилактики и лечения дисбактериозов
- **возбудители инфекционных заболеваний** – источники антигенов для производства вакцин
- **трансгенные м/о или клетки** – продуценты видоспецифичных для человека белковых гормонов, белковых факторов неспецифического иммунитета и т. д.

3) Макроорганизмы

- **высшие растения** – сырье для получения БАВ ;
- **Животные** - млекопитающие, птицы, рептилии, амфибии, членистоногие, рыбы, моллюски, человек

Трансгенные организмы

В качестве биологических объектов или систем, которые использует биотехнология, прежде всего необходимо назвать одноклеточные микроорганизмы, а также животные и растительные клетка.

Выбор этих объектов обусловлен следующими моментами:

Клетки являются своего рода «биофабриками», вырабатывающими в процессе жизнедеятельности разнообразные ценные продукты: белки, жиры, углеводы, витамины, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, антибиотики, гормоны, антитела, антигены, ферменты, спирты и пр.

Многие из этих продуктов, крайне необходимы в жизни человека, пока недоступны для получения «небиотехническими» способами из-за дефицитности или высокой стоимости сырья или же сложности технологических процессов.

2. Клетки чрезвычайно быстро воспроизводятся. так, бактериальная клетка делится через каждые 20-60 минут, дрожжевая - через каждые 1,5-2 ч, животная – через 24 ч, что позволяет за относительно короткое время искусственно нарастить на сравнительно дешевых и недефицитных питательных средах в промышленных масштабах огромные количества биомассы микробных, животных или растительных клеток.

Например, в биореакторе емкостью 100 м³ за 2-3-сут. можно вырастить 10¹⁶ – 10¹⁸ микробных клеток. в процессе жизнедеятельности клеток при их выращивании в среду поступает большое количество ценных продуктов, а сами клетки представляют собой кладовые этих продуктов.

3. Биосинтез сложных веществ, таких как белки, антибиотики, антигены, антитела и др. значительно экономичнее и технологически доступнее, чем химический синтез.

При этом исходное сырье для биосинтеза, как правило, проще и доступнее, чем сырье для других видов синтеза. Для биосинтеза используют отходы сельскохозяйственной,

OÑTÜSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 15 из 88	

рыбной,, пищевой промышленности, растительное сырье, дрожжи, древесина, меласса и др.).

4. Возможность проведения биотехнологического процесса в промышленных масштабах, т.е. наличие соответствующего технологического оборудования, доступность сырья, технология переработки и т.д.

Функция биообъекта — полный биосинтез целевого продукта, включающий ряд последовательных ферментативных реакций или катализ лишь одной ферментативной реакции, которая имеет ключевое значение для получения целевого продукта.

Биообъект, осуществляющий полный биосинтез целевого продукта, называется продуцентом.

Биообъект, являющийся индивидуальным ферментом или выполняющий функцию одной ферментативной реакции, используемой биотехнологом, называют промышленным биокатализатором.

Таким образом, к биообъектам относятся как макромолекулы, так микро- и макроорганизмы.

Биологический объект, способный осуществлять определенную модификацию исходного сырья, и образовывать необходимый продукт – **главное звено** биотехнологического процесса

Объекты биотехнологии - это клетки

- микроорганизмов,
- животных и растений,
- трансгенные животные
- растения
- многокомпонентные ферментные системы клеток и отдельные ферменты

В основе биотехнологических процессов – **микробный синтез**

(синтез разнообразных биологически активных веществ с помощью микроорганизмов).

Объекты растительного и животного происхождения не нашли столь широкого применения.

Первичный этап разработки биотехнологического процесса – **получение -чистых культур организмов** (в случае микроорганизмов), **-клеток или тканей** (растения и животные).

Культуры микробных клеток и культуры тканей растений и животных не отличаются друг от друга с методической точки зрения.

В настоящее время известно более 100 тыс. различных видов микроорганизмов

Прокариоты (бактерии, актиномицеты, риккетсии, цианобактерии)

Эукариоты (дрожжи, нитчатые грибы, некоторые простейшие, водоросли).

При большом разнообразии микроорганизмов весьма важной, проблемой является правильный выбор именно того организма, который способен обеспечить получение требуемого продукта, т. е. служить промышленным целям.

Биообъекты микробные клетки **прокариот** и **эукариот** в современном биотехнологическом производстве занимают доминирующее положение.

Они являются продуцентами используемых в качестве лекарственных средств первичных метаболитов: аминокислот, азотистых оснований, коферментов, моно- и дисахаров, ферментов медицинского назначения, применяемых в заместительной терапии.

Микроорганизмы образуют огромное количество вторичных метаболитов, многие из которых также нашли применение, на пример, антибиотики и другие корректоры гомеостаза клеток млекопитающих.

Пробиотики — препараты на основе биомассы отдельных видов микроорганизмов используются при дисбактериозах для нормализации микрофлоры желудочно-кишечного тракта.

Микроорганизмы необходимы также при производстве вакцин.

ONTUSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 16 из 88	

Наконец, микробные клетки методами генной инженерии могут быть превращены в продуценты видоспецифических для человека белковых гормонов, белковых факторов неспецифического иммунитета и т.д.

Модельные объекты при исследовании фундаментальных жизненных процессов:

Кишечная палочка (*E.coli*)

Сенная палочка (*Bac. Subtilis*)

Пекарские дрожжи (*S. Cerevisiae*)

Во многих биотехнологических процессах используется ограниченное число микроорганизмов, которые классифицируются как GRAS («generally recognized assafe» обычно считаются безопасными).

GRAS (общепризнанный безопасный)

Bacillus subtilis - Разновидность бациллы.

Bacillus amyloliquefaciens - Вид *bacillus amyloliquefaciens*

Streptomyces - Стрептомицеты

Aspergillus - Аспергилл уникальный

Penicillium - Пенициллин

Mucor - Мукор

Rhizopus - Ризопус

Sacchaomyces

Микробиологическая промышленность сегодня использует тысячи штаммов из сотен видов микроорганизмов, которые первично были выделены из природных источников на основании их полезных свойств, а затем (в большинстве своем) улучшены с помощью различных методов.

В связи с расширением производства и ассортимента выпускаемой продукции в микробиологическую промышленность вовлекаются все новые и новые представители мира микробов.

Следует отдавать себе отчет, что в обозримом будущем ни один из них не будет изучен в той же степени, как *E.coli* и *Bac.subtilis*. И причина этого очень простая – колоссальная трудоемкость и высокая стоимость подобного рода исследований.

Следовательно, возникает проблема разработки стратегии и тактики исследований, которые обусловили бы с разумной затратой труда извлечь из потенциала новых микроорганизмов все наиболее ценное при создании промышленно важных штаммов-продуцентов, пригодных к использованию в биотехнологических процессах.

Классический подход в биотехнологии – выделение нужного микроорганизма из природных условий.

Сначала получают **накопительные культуры**: из естественных мест обитания отбирают образцы материала и производят посев в селективную среду.

Затем выделяют **чистую культуру** с дальнейшим изучением микроорганизма.

Главный критерий выбора биотехнологического объекта – способность синтезировать целевой продукт.

Требования к микроорганизмам-продуцентам

Высокая скорость роста

Способность утилизировать необходимые для их жизнедеятельности дешевые субстраты

Резистентность к посторонней микрофлоре (высокая конкурентоспособность)

При подборе объектов в биотехнологии важным компонентом является их **селекция**

На каждом этапе отбора нужного продуцента происходит сознательное конструирование геномов.

Этот процесс не всегда возможно реализовать, так как иногда отсутствуют эффективные методы изменения геномов селектируемых организмов.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 17 из 88	

Ступенчатая селекция

На каждом этапе отбора из популяции микроорганизмов отбираются наиболее активные варианты (**спонтанные мутанты**).

Из них на следующем этапе отбирают новые, более эффективные штаммы.

Недостатки индуцированного мутагенеза:

Трудоемкость метода;

Отсутствие сведений о характере изменений;

Современная тенденция – сознательное конструирование штаммов микроорганизмов с заданными свойствами на основе фундаментальных знаний о генетической организации и молекулярно-биологических механизмах осуществления основных функций организма.

В селекции микроорганизмов для микробиологической промышленности важно **изменение регуляторных процессов в клетке (на основе принципа обратной связи)**

Пути изменения скорости биохимических реакций:

Изменение каталитической активности индивидуальных молекул фермента (несколько секунд или минут).

Изменение скорости синтеза ферментов (более длительный путь)

Существуют более простые механизмы регуляции активности метаболизма в клетке:

Снижение концентрации субстрата при наличии фермента;

Повышение концентрации субстрата при наличии фермента;

Повышение концентрации ферментов;

Увеличение концентрации в клетке какого-либо определенного предшественника.

регуляция активности метаболических реакций в клетке способом

Ретроингибирования

Это наиболее распространенный способ регуляции активности метаболических реакций в клетке.

Биосинтез многих первичных метаболитов характеризуется тем, что при повышении концентрации конечного продукта данного биосинтетического пути угнетается активность одного из первых ферментов этого пути.

Ретроингибирование как процесс впервые наблюдался в 1953 году

Исследование проводилось по биосинтезу триптофана клетками кишечной палочки *E.coli* (A.Novik u L. Szillard).

Авторами было обнаружено, что у одного из мутантов *E.coli* с нарушенным биосинтезом триптофана добавление данной аминокислоты резко тормозит накопление одного из предшественников – **индолглицерофосфата** в клетках.

Таким чувствительным к триптофану ферментом является **антранилатсинтетаза**, которая катализирует более раннюю реакцию триптофанового пути – образование **антранилата** из **хоризмата** и **глутамин**.

Было показано, что активность **антранилатсинтетазы** подавляется только триптофаном и никакие другие метаболиты клетки подобного действия не оказывают.

Ретроингибирование – общее свойство клеточного метаболизма.

Метаболит, являющийся ингибитором, специфически связывается с участком молекулы фермента, обладающим высокой степенью сродства к данному ингибитору и абсолютно отличающимся от активного центра фермента.

Этот участок – **аллостерический центр**.

А сами ферменты с таким центром – **аллостерические ферменты**.

Аллостерические ферменты -

Это олигомеры, состоящие из взаимодействующих между собой нескольких одинаковых или различающихся субъединиц.

Зная точно механизм регуляции синтеза интересующего продукта, участвует ли в регуляции механизма **ретроингибирования**, можно пытаться получить более активный

ONTUSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 18 из 88	

продукт данного соединения.

Для отбора таких продуцентов используют структурные аналоги метаболитов, по отношению к которым отбирают резистентные варианты.

Пример: 5-метилтриптофан, аналог триптофана, также как и триптофан, ингибирует активность анранилатсинтетазы, но не заменяет собой триптофан в клеточном метаболизме.

Вследствие этого данный структурный аналог необходимого метаболита задерживает рост бактерий, если он добавлен в среду.

В растущих клетках :

Некоторые ферменты образуются постоянно, независимо от состава питательной среды (**конститутивные**);

Остальные появляются лишь тогда, когда в среде присутствует субстрат их действия (**индуцибельные**). **Пример:** Клетки *E.coli*, растущие на среде с глюкозой, обладают следовыми количествами ферментов метаболизма лактозы, а также многих других источников углерода, которые способны усваивать клетки данного микроорганизма. Если эти же клетки перенести на среду с лактозой, то через 1-2 минуты можно зарегистрировать повышение активности **β -галактозидазы**.

Имеет место выраженная индукция фермента.

Индукция фермента – это относительное увеличение скорости его синтеза в ответ на появление в среде культивирования определенного химического соединения, называемого индуктором.

Достаточно часто великолепными индукторами являются не утилизируемые аналоги субстратов. Например, для **β -галактозидазы** таким веществом служит **изопропил- β -D-тиогактопиранозид (ИПТГ)** – неметаболизируемый аналог лактозы.

1961 год - F.Jacob и J.Monod – модель оперона.

Данная модель регуляции состоит из четырех компонентов:

Структурные гены (детерминируют структуру ферментов);

Ген-регулятор;

Оператор;

Промотор.

Ген-регулятор определяет структуру белка-репрессора, способного связываться с оператором.

Оператор контролирует функционирование прилежащих к нему структурных генов.

Промотор – область для связывания с ферментом транскрипции РНК – полимеразой.

Если белок-репрессор связан с оператором, то РНК-полимераза не может перемещаться на промотор и синтез информационной РНК не может осуществляться. Результатом является отсутствие синтеза структурного гена.

Изменяя регуляцию индуцибельных и репрессибельных оперонов, существует возможность повышать продукционную активность определенных промышленных штаммов-продуцентов.

Структурные гена одного метаболического пути не всегда объединены в единый оперон (наподобие лактозному)

4. Иллюстративный материал: презентация.

5. Литература: см.приложение 1.

6. Контрольные вопросы:

1. Биообъект как средство производства. Классификация биообъектов, их свойства.
2. Возможности совершенствования штаммов, суперпродуценты и их особенности.
3. Методы биотехнологии.
4. Физиологические подходы направленного биосинтеза целевых продуктов.

OÑTÚSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 19 из 88	

ЛЕКЦИЯ № 3

1. Тема: Структура биотехнологического производства. Условия проведения и аппаратура. Принципиальная технологическая схема БТ-ского производства. Контроль и управление основными параметрами БТ-ского процесса

2. Цель: обучающийся должен усвоить задачи и основные направления технологии лекарственных форм как науки.

3. Тезисы лекции:

План лекции:

1. Процессы и аппараты биотехнологического производства. Условия проведения и аппаратура.
2. Принципиальная технологическая схема биотехнологического производства.
3. Контроль и управление основными параметрами биотехнологического процесса

Биотехнологическая система (БТС)

- это технологический комплекс, создаваемый для производства определенного продукта путем биосинтеза.

Культура

- это клетки или организмы, выращенные в искусственных условиях.

Штамм

- это культура одного вида микроорганизмов, выделенная из разных мест обитания.

Клон

- совокупность клеток или особей, произошедших от общего предка путем бесполого размножения.

Популяция (от лат. *populus* - народ, население)

- совокупность особей одного вида, обладающих общим генофондом и занимающих определенную территорию.

Биотехнологическое производство

Биотехнологическое производство представляет собой последовательно выполняемые стадии, число, последовательность и специфика которых определяются многими факторами: особенностями используемого биообъекта, сырьем, характером целевого продукта.

Стадии производства

Несмотря на большое разнообразие технологических схем, все они включают ряд общих стадий. К ним относятся:

- *подготовка посевного материала (инокулята);*
- *приготовление питательной среды для культивирования биообъекта;*
- *основная стадия – культивирование (выращивание) биообъекта;*
- *получение целевого продукта.*

Для активного роста микроорганизмов в питательную среду вводят биогенные элементы: углерод, азот и фосфор, а также макро- и микроэлементы (в основном в виде удобрений или технических солей).

Также поддерживаются на определенном уровне температура, рН среды, концентрация источников питания, уровень аэрации.

В качестве источника углерода в промышленных условиях, помимо индивидуальных органических соединений (глюкозы, сахарозы, лактозы и др.), используются сложные органические субстраты – как правило, отходы пищевой промышленности, сельского хозяйства и других видов промышленности.

Преимущества производства органических продуктов биотехнологическими способами

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 20 из 88	

перед химическими методами

1. Многие сложные органические молекулы, такие как белки, антибиотик и др., практически не могут быть синтезированы химическими способами.

2. Биоконверсия обеспечивает значительно больший выход целевого продукта.

3. Биологические системы функционируют при более низких температурах, менее высоких значениях рН (близких к нейтральному) и т. п.

4. Каталитические биологические реакции намного специфичнее, чем реакции химического катализа.

5. Биологические процессы обеспечивают почти исключительно продукцию чистых изомеров одного типа, а не их смесей, как это часто бывает в реакциях химического синтеза.

Но вместе с тем биологические способы в сравнении с химическими методами обладают рядом недостатков:

1. Биологические системы могут легко быть загрязнены посторонней нежелательной микрофлорой.

2. Целевой продукт, синтезируемый биологическим способом, присутствует в довольно сложной смеси, что обуславливает необходимость отделения его от примеси ненужных веществ.

3. Биотехнологические производства требуют больших количеств воды, которую в итоге необходимо удалять, сбрасывая в окружающую среду.

4. Биопроцессы обычно идут медленнее в сравнении со стандартными химическими процессами.

Основные стадии типового биотехнологического процесса

Приготовление посевного материала с использованием определенного штамма-продуцента

Приготовление и стерилизация питательных сред

ФЕРМЕНТАЦИЯ

Выделение целевого продукта и получение его товарной формы

Вспомогательные стадии биотехнологического процесса

Стерилизация оборудования и коммуникаций

Очистка и стерилизация воздуха

Приготовление и стерилизация пеногасителей и других различных добавок

1. Штаммы продуцентов. Стадия приготовления посевного материала.

Основным элементом любого биотехнологического процесса является штамм-продуцент

Все промышленно важные продуценты биологически активных веществ (БАВ) хранят в национальных музейных коллекциях культур клеток

В последние годы в связи с бурным развитием биотехнологии резко меняется ситуация с сохранением генетических ресурсов в коллекциях

Во-первых, появляются новые виды генетических ресурсов - библиотеки генов и ДНК.

Во-вторых, резко возрастает количество ресурсов, создаваемых в процессе научной деятельности.

В-третьих, генетический материал самых различных организмов активно используется для создания новых лекарственных препаратов, биотехнологий и прочих товаров и услуг.

- Коллекции, обеспечивающие хранение генетического и биологического материала, представлены самостоятельными специализированными организациями - Ботанические сады;
- структурные подразделения научно-исследовательских организаций (коллекции микроорганизмов и клеточных культур);
- рабочие коллекции лабораторий, ведущих исследования в области генетики и селекции;
- а также рядом организаций, для которых хранение генетического материала не является

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 21 из 88	

основной функцией (питомники, зверофермы, зоопарки и т.п.).

В музейных коллекциях культуры клеток хранят в основном в лиофилизированном состоянии (предварительно поместив их в защитные среды /сахарозо-желатиновая, обезжиренное молоко, бычья или лошадиная сыворотки или др./) в течение 10-30 лет.

Для консервации продуцентов применяют также такие способы, как хранение культур под слоем минерального масла, в стерильной почве, в кварцевом песке, в активированном угле, на высушенных питательных субстратах и др.

Музейные культуры клеток продуцентов оживляют путем высева на агаризованные обогащенные питательные среды. После нескольких пассажей (пересевов) культуры уже используют для хранения и в качестве исходного посевного материала в производственном процессе.

По графику проводят контроль чистоты и продуктивности хранящихся в лаборатории культур клеток продуцентов.

1. Первым этапом биотехнологического процесса является получение посевного материала в лабораторных условиях.

Для этого смыв культуры продуцента со скошенной агаризованной питательной среды (с косяка) стерильно переносят в качалочные колбы (колбы Эрленмейера, 750 мл), заполненные на 50-100 мл стерильной посевной питательной средой. Засеянные колбы устанавливают на микробиологическую качалку (180-220 об/мин) и культуру продуцента выращивают в течение 12-48 ч при оптимальной для нее температуре.

Выросший в колбах жидкий стерильный посевной материал переносят в предварительно загруженные стерильной питательной средой посевные аппараты (инокуляторы) из расчета 1-10% от общего объема питательной среды.

Как правило, используют инокуляторы объемом от 0,1 до 10 м³. На каждой стадии получения посевного материала его контролируют микроскопированием и на стерильность.

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

Полученный на последней стадии вегетативный посевной материал стерильно передают в ферментатор, загруженный стерильной ферментационной средой.

2. Стадия приготовления питательных сред

В производственных условиях питательные среды обычно готовят в отдельном цехе, обеспечивающем потребности всех цехов предприятия.

Питательные среды готовят в специальных емкостях (смесители), снабженных мешалками и теплообменными устройствами для подогрева и лучшего растворения компонентов среды.

Компоненты питательных сред загружают в смесители в определенной последовательности (согласно прописи).

При необходимости отдельные виды сырья подвергают предобработке: измельчению, экстрагированию и т. д.

Растворы сахаров, нуждающиеся в более щадящих режимах стерилизации, рекомендуют готовить и стерилизовать отдельно, смешивая с основной средой только в ферментере.

Качество воды, используемой для приготовления питательных сред, зависит от ее назначения. Чаще всего применяют артезианскую, реже - водопроводную воду. В крупнотоннажных производствах кормовых дрожжей и белково-витаминных концентратов (БВК) используют воду, полученную по замкнутому циклу этого производства, то есть прошедшую очистные сооружения.

В производстве кровезаменителей и лекарственных препаратов используют только апиrogenную воду (бидистиллят).

ONȚŪSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	044-43/ - (2023-2024) Стр. 22 из 88	

Растворы сахаров, нуждающиеся в более щадящих режимах стерилизации, рекомендуют готовить и стерилизовать отдельно, смешивая с основной средой только в ферментере.

Качество воды, используемой для приготовления питательных сред, зависит от ее назначения. Чаще всего применяют артезианскую, реже - водопроводную воду. В крупнотоннажных производствах кормовых дрожжей и белково-витаминных концентратов (БВК) используют воду, полученную по замкнутому циклу этого производства, то есть прошедшую очистные сооружения.

В производстве кровезаменителей и лекарственных препаратов используют только апиrogenную воду (бидистиллят).

Клетки микроорганизмов, а так же их споры более чувствительны к тепловому воздействию, чем большинство химических веществ, используемых в питательных средах.

На практике главная цель стерилизации - достижение стерильности при сохранении качества питательной среды.

Длительность экспозиции, или время выдержки – это тот временной интервал, в пределах которого погибают микроорганизмы, но сохраняется качество питательной среды.

Тепловую стерилизацию питательных сред (по способу ее проведения) подразделяют на периодическую и непрерывную

При периодическом способе стерилизации процессы - нагрев, выдержка и охлаждение среды - протекают последовательно во времени в одном аппарате. Это может быть ферментер, посевной аппарат или специальный стерилизатор. Выдерживают при этой температуре строго определенное время и охлаждают водой, подаваемой в рубашку аппарата или змеевик.

Сам процесс нагрева осуществляют либо путем прямого введения (инъекции) струи перегретого пара с температурой до 130-135 С в питательную среду («острый» пар), либо подачей пара в тепловую рубашку аппарата («глухой» пар).

При непрерывном способе стерилизации каждый элементарный процесс - нагрев, выдержка и охлаждение - осуществляется в специально предназначенных для этого аппаратах: нагревателе, выдерживателе, теплообменнике, которые составляют систему аппаратов для непрерывной стерилизации – установку непрерывной стерилизации (УНС).

На практике чаще используют непрерывный способ стерилизации питательных сред в УНС. Для этого приготовленную питательную среду передают в цех ферментации, где ее стерилизуют в УНС, после чего она поступает в предварительно простерилизованные ферментеры.

3. Ферментация – основная стадия биотехнологического процесса

На стадии ферментации осуществляется накопление целевого продукта - биомассы и продуктов метаболизма.

В настоящее время наиболее распространенным является периодическое культивирование клеток продуцентов в асептических аэробных условиях на жидких питательных средах (глубинная ферментация).

Ферментацию обычно проводят в биореакторах объемом от 0,01 до 100 м³.

Аппаратурное оформление биотехнологического процесса. Биореакторы.

Промышленное производство биопрепаратов представляет собой сложный комплекс взаимосвязанных физических, химических, биофизических, биохимических, физико-химических процессов и предполагает использование большого количества разнотипного оборудования.

Основным аппаратурным элементом биотехнологического процесса является биореактор — ферментер.

Биореакторы предназначены для культивирования микроорганизмов, накопления биомассы, синтеза целевого продукта. Биореакторы изготавливают из высоколигированных

OŃTŪSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «OŃTŪSTIK Qazaqstan medicina akademiasy» AҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 23 из 88	

марок стали, иногда из титана. Внутренняя поверхность биореактора должна быть отполирована.

Типовые ферментеры представляют собой вертикальные ёмкости различной вместимости (малые — от 1 до 10 л, многотоннажные – более 1000 л) с минимальным числом штуцеров и передающих устройств.

Биореакторах должны быть обеспечены оптимальные гидродинамические и массообменные условия.

Ферментеры снабжены паровой рубашкой, мешалками, барботерами, стерилизующими воздушными фильтрами, отбойниками, обеспечивающими необходимые температурный, газовый режим, гидродинамическую обстановку в биореакторе (т.е. процессы массо- и теплообмена).

В биореакторах имеются пробоотборники для отбора проб культуральной жидкости в процессе биосинтеза.

Работа отдельных узлов контролируется измерительными приборами, фиксирующими как параметры технологического процесса, так и отдельные физико-химические показатели культивирования.

Биореакторы подразделяют на три основные группы.

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

Биореакторы первого типа используют чаще всего, так как они позволяют легко изменять технологические условия и эффективно доставлять к растущим клеткам воздух, определяющий характер развития микроорганизмов и их биосинтетическую активность.

Для этой же цели используют мешалки – одну или несколько. Мешалки, разбивая крупные пузырьки воздуха, разносят их по всему реактору и увеличивают время пребывания в культуральной среде.

Эффективность распределения воздуха зависит от типа мешалки, числа оборотов, физико-химических свойств среды.

При интенсивном перемешивании культуральной среды происходит ее вспенивание, поэтому рабочий объем биореактора не превышает 70% общего объема.

Свободное пространство над поверхностью раствора используется как буферное, где накапливается пена, и таким образом предотвращается потеря культуральной жидкости.

Вместе с тем вспенивание может привести к переувлажнению фильтров в отверстиях, через которые воздух выходит из биореактора, уменьшению потока воздуха и к попаданию в ферментер посторонних микроорганизмов.

Конструктивные особенности барботажных колонн и эрлифтных биореакторов дают этим типам ферментеров некоторые преимущества перед реакторами с механическим перемешиванием.

Барботажные колонны более экономичны, так как перемешивание в них происходит восходящими потоками воздуха равномерно по всему объему.

Отсутствие механической мешалки исключает один из путей проникновения в биореактор посторонних микроорганизмов.

В эрлифтных биореакторах воздух подают в нижнюю часть вертикального канала. Поднимаясь, воздух увлекает за собой жидкость к верхней части канала, где расположен газожидкостный сепаратор (здесь частично выходит воздух).

Таким образом, в эрлифтном биореакторе культуральная среда вместе с клетками непрерывно циркулирует в биореакторе.

ONTUSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 24 из 88	

Эрлифтные биореакторы более эффективны, чем барботажные колонны, особенно в суспензиях микроорганизмов с большей плотностью или вязкостью. Перемешивание в эрлифтных ферментерах более интенсивно происходит.

Для стерилизации биореактора применяют пар под давлением. Внутри биореактора не должно быть «мертвых зон», недоступных для пара во время стерилизации. Стерильность обеспечивается и герметизацией биотехнологического оборудования, работающего в асептических условиях.

Основные агенты, контаминирующие клеточные культуры — бактерии, дрожжи, грибы, простейшие, микоплазмы, вирусы. Источники контаминации – воздух, пыль, питательные среды, рабочие растворы, оборудование, рабочий персонал.

Очистка воздуха от микроорганизмов и аэрозольных частиц осуществляется через фильтры предварительной очистки которые устанавливаются на всасывающей линии перед компрессором.

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

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

Перед началом производственного процесса пустой ферментатор тщательно моют, проверяют его герметичность и стерилизуют «острым» паром.

Для обеспечения стерильности часто используют предварительную обработку ферментера химическими дезинфицирующими веществами. Одновременно стерилизуют все прилегающие коммуникации.

Затем в ферментер подают простерилизованную в УНС (или другим способом) охлажденную питательную среду, стерильно вносят посевной материал (1-10%) от общего объема питательной среды, подключают системы аэрации и перемешивания.

Температура и pH питательной среды до подачи посевной материала должны быть доведены до оптимальных для данной культуры значений.

Типовой ферментатор для глубинного стерильного выращивания культур продуцентов оснащен:

- электродвигателем;
- торцевым уплотнением для обеспечения герметичности при вводе вала мешалки в ферментер;
- редуктором для вращения вала, на котором установлена трехъярусная мешалка;
- трехъярусной мешалкой;
- отбойниками (отражательные перегородки, предотвращающие вращательное движение перемешиваемой культуральной жидкости и улучшающие массообмен) ;
- теплообменными устройствами в виде секционной рубашки и змеевиков (для отвода тепла, выделяющегося при микробиологическом синтезе и механическом перемешивании) ;
- барботером для подачи аэрирующего воздуха (кольцевидный или радиальный).

Ферментаторы для глубинного асептического культивирования клеток продуцентов обычно представляют собой герметичные цилиндрические емкости из нержавеющей стали, высота которых в 2,0-2,5 раза превышает диаметр.

В ферментерах устанавливают мешалки турбинного, пропеллерного или другого типа. Диаметр мешалки должен составлять одну треть диаметра ферментера.

Для поддержания оптимальной температуры роста продуцентов в ферментерах имеется двойной кожух (рубашка) и/или теплообменники типа змеевиков.

OŃTŪSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «OŃTŪSTIK Qazaqstan medicina akademiasy» AҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 25 из 88	

Для предотвращения попадания нестерильного атмосферного воздуха в ферментер, давление воздуха над поверхностью КЖ повышают на 20-30 кПа. При необходимости вводят химические пеногасители.

В периоды интенсивного вспенивания КЖ в ферментер вносят стерильный пеногаситель. Для пеногашения используют поверхностно-активные вещества (ПАВ).

Продолжительность культивирования микроорганизмов в ферментерах составляет в среднем 18-48 ч для большинства бактерий и 200-250 ч – для актиномицетов и микроскопических грибов.

Во время ферментации автоматически регулируются температура, рН среды и некоторые другие параметры.

По специальному графику из ферментера стерильно проводят отбор проб КЖ.

Завершение процесса ферментации определяют по морфологическим изменениям клеток продуцента, потреблению компонентов питательной среды и максимальному накоплению конечного полезного продукта.

Лабораторные ферментаторы Minifors (Бактериальные/Культуральные) – 2,5 или 5 л.

Сосуд ферментера Minifors изготовлен из термостойкого боросиликатного стекла.

Minifors оборудован устройствами для измерения и регулирования температуры, рН среды, скорости вращения мешалки.

Minifors для клеточных культур аналогичен ферментатору Minifors бактериальному (для бактерий/дрожжей/грибов), но обеспечивает более мягкое перемешивание за счет перемешивающего элемента типа «морской винт».

Контроль и управление процессами культивирования

Основной задачей управляемого культивирования является создание наиболее благоприятных условий для растущих культур продуцентов.

Однако непосредственно изучить состояние культуры клеток в промышленном аппарате не представляется возможным. Поэтому физиологическое состояние культуры продуцента во время ферментации оценивают косвенно по различным параметрам:

- скорости роста культуры продуцента,
- потреблению кислорода и различных субстратов,
- выделению углекислого газа и других продуктов метаболизма (в том числе целевых),
- скорости подкисления или защелачивания КЖ (по значению рН),
- тепловыделению и т.д.

Основными управляющими воздействиями для поддержания и корректировки режима культивирования являются режим аэрации и перемешивания, подача теплоносителя, регулировка величины рН, поддержание уровня пены, скорость дозирования субстрата.

Одной из проблем промышленной биотехнологии является отсутствие специализированных датчиков, поскольку общепромышленная номенклатура приборов и средств автоматизации, зачастую, не соответствует асептическим условиям процессов, не выдерживает многократной термической стерилизации, не может работать в сложных по составу ферментационных средах, включающих биомассу, пузырьки воздуха, жировые компоненты, жидкие эмульсии и твердые частицы.

Дозирование субстратов

Как уже отмечалось насосы, трубопроводы и запорная арматура - “узкое” место биотехнологического производства.

В условиях асептических производств лучшими дозирующими насосами являются перистальтические или мембранные, в которых рабочий орган взаимодействует с жидкостью через непроницаемую мембрану.

Возможно дозирование и без насосов, с помощью дозирочных бачков. При этом давление в линиях должно на 1,5-2 атм превышать давление в ферментере.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 26 из 88	

По окончании ферментации КЖ охлаждают до 10-15 С и перекачивают в резервуары, из которых КЖ постепенно передают на дальнейшую обработку.

На всех последующих за ферментацией стадиях не происходит прироста целевого продукта, а проводится только его обработка.

Цель стадий выделения и очистки любого биотехнологического продукта – получение необходимой товарной формы препарата при минимальных потерях целевого продукта.

Технология выделения и очистки целевого биотехнологического продукта зависит от:

- вида продукта (биомасса или целевые метаболиты)
- локализации продукта (в клетках или в фильтрате КЖ)
- физико-химических свойств целевого продукта

Основная масса товарной продукции выпускается биотехнологической промышленностью в двух формах (согласно типовой схеме):

- сухой продукт (порошок, гранулы,
- мелкодисперсные частицы или др.)
- жидкий продукт (концентраты с содержанием сухих веществ до 50%).

Назначение вспомогательных стадий биотехнологического процесса (стерилизация оборудования и коммуникаций, очистка и стерилизация воздуха, приготовление и стерилизация пеногасителей и др.) – обеспечение асептических условий проведения ферментации.

Все последующие за ферментацией стадии обычно проводят в нестерильных условиях (за исключением биофармацевтических производств).

На вспомогательных стадиях, таких как стерилизация пеногасителей и др. добавок, стерилизация оборудования и коммуникаций, используют термическую стерилизацию, при которой погибают как вегетативные клетки, так и споры.

Практическая реализация термической стерилизации зависит прежде всего от стерилизуемого объекта. Так, пустые аппараты и коммуникации обычно стерилизуют насыщенным водяным паром под давлением, различные жидкие среды – путем нагревания под давлением.

Коррозионно неустойчивое оборудование и приборы стерилизуют с использованием химических антисептических средств или обработкой газами (например, окисью этилена в смеси с СО₂ или бромистым метилом), спиртом или др.

Наибольшим бактерицидным эффектом обладает насыщенный водяной пар под давлением!

На вспомогательных стадиях, таких как очистка и стерилизация воздуха используют метод фильтрации.

Одной из важных и отличительных особенностей биотехнологического производства является получение большого количества стерильного воздуха.

В наибольших масштабах стерильный воздух применяется в процессах культивирования для аэрации. Удельный расход воздуха при выращивании аэробных продуцентов в среднем составляет 1 м³/м³ КЖ в минуту.

Сжатый стерильный воздух необходим не только для аэрации и перемешивания выращиваемых культур, но и для передачи стерильных жидкостей и чистых культур из одного реактора в другой, а также для продувки аппаратов и коммуникаций.

Сжатый стерильный воздух используют также для вентиляции участков цехов так называемой стерильной зоны, где в асептических условиях проводят, например, последние стадии очистки и фасовки готового продукта.

Очистку воздуха можно осуществить принципиально разными методами, основанными либо на уничтожении микроорганизмов, либо на их удалении.

Одним из самых эффективных способов стерилизации воздуха, является облучение ультрафиолетовыми лучами. Этот метод используется для обеззараживания воздуха в боксах

OÑTÚSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 27 из 88

и технологических помещениях .

Отечественными и зарубежными исследователями доказано, что технически и экономически оправданным в промышленности является способ очистки больших количеств воздуха на фильтрах с помощью волокнистых и пористых материалов. Таким путем удается получить воздух со степенью чистоты 99,999%.

Взвешенные в воздухе частицы задерживаются волокнистыми материалам и благодаря инерционному и диффузионному механизмам осаждения.

4. Иллюстративный материал: презентация.

5. Литература: см.приложение 1.

6. Контрольные вопросы:

1. Структура биотехнологического производства.
2. Оборудование для биотехнологического производства.
3. Ферментеры. Технологические параметры биосинтеза различных соединений.

ONTUSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 28 из 88

ЛЕКЦИЯ № 4

1. Тема: Генетические основы современной биотехнологии. Основные понятия молекулярной генетики. Методы генной инженерии и создание продуцентов лекарственных препаратов.

2. Цель: обучающийся должен усвоить основные понятия молекулярной генетики.

3. Тезисы лекции:

Генетика- наука о наследственности и изменчивости. **Ген**- фрагмент молекулы ДНК, контролирующей один признак или пептид.

Генотип- совокупность всех генов данной особи.

Аллели - различные состояния одного и того же гена, располагающиеся в определенном локусе(участке) гомологичных хромосом и определяющие развитие одного какого-то признака.

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, свою очередь, присоединена фосфатная группа. Между собой соседние нуклеотиды соединены в цепи фосфодиэфирной связью, образованной 3'гидроксильной (3'-ОН) и 5'-фосфатной группами (5'-РО₄).

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 тимином, 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

OŃTŪSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «OŃTŪSTIK Qazaqstan medicina akademiasy» AQ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 29 из 88	

расположенных нуклеотида представляют собой кодон, который и определяет, какая аминокислота будет располагаться в данной позиции в белке.

Особенности строения ДНК и РНК

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 свойства.

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);
- 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).

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.

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

ONTUSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 30 из 88	

щелочная фосфатаза, которая отщепляет от линейного фрагмента молекулы ДНК 5'-фосфатные группировки, что значительно снижает количество образующихся случайных, нежелательных комбинаций фрагментов ДНК.

Нуклеаза Val 31 – это фермент, неспецифически удаляющий нуклеотиды из последовательности ДНК. Он позволяет «подтупить» несимметричные концы ДНК, либо укоротить фрагменты ДНК, сближая их функционально значимые элементы.

Основные этапы создания трансгенных организмов

Процесс создания трансгенного организма 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).

После проведения фрагментации (рестрикции) ДНК из смеси выделяют ДНК-фрагменты (ДНК-рестрикты).

Для разделения ДНКрестриктов прибегают к электрофорезу. Разделение основано на различии в размерах и константных отношениях электрический заряд-масса.

II этап. Фрагменты рекомбинантных ДНК и вектора, полученные после действия рестриктазы и содержащие определенные гены, «сшиваются» 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 одонитевыми участками, 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

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.

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

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 31 из 88	

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;

Векторы должны обладать определенными свойствами:

- 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 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 $42^\circ C$ 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.

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

ONTUSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 32 из 88	

селективного давления.

Упаковка в липосомы используется для защиты экзогенного генетического материала от разрушающего действия рестриктаз. Липосомы - сферические оболочки, состоящие из фосфолипидов. Получают их путем резкого встряхивания смеси водного раствора и липидов, либо обрабатывая ультразвуком водные эмульсии фосфолипидов.

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, содержащего необходимую для трансформирования генную конструкцию.

Каллус или суспензия клеток наносится в чашку Петри с агаризированной средой и помещается под биолистическую пушку на расстоянии 10—15 см. В пушке вакуумным насосом уменьшается давление до 0,1 атм.

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,

Введение гена в клетку – селективные и репортерные гены:

Селективные гены – придают клеткам селективное преимущество, т.е. устойчивость к антибиотикам (канамицину, тетрациклину и др.) или гербицидам. Например, в присутствии гена лактамазы бактериальная клетка 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), хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT).

Типы векторов для введения гена в клетку

Существует несколько типов векторов:

Бактериальные плазмиды Основная масса клеточной ДНК бактерий содержится в хромосоме (в хромосоме *E. coli*, например, 4 млн. пар нуклеотидов).

Однако кроме хромосом бактерии содержат большое количество очень маленьких кольцевых молекул ДНК плазмид длиной несколько тысяч пар оснований (молекулярная масса от 1,5 до 300 мегадальтон, 1 МД = 1500 п.о).

Такие мини-хромосомы называют плазмидами. Как правило, плазмиды имеют в своем составе гены устойчивости к антибиотикам, ионам тяжелых металлов (R-плазмиды), а также гены, контролируемые катаболизм некоторых органических соединений (плазмиды биодegradации, или D-плазмиды).

Поскольку эти гены находятся в плазмидах, они представлены гораздо большим числом копий.

Один из наиболее часто употребляемых плазмид для клонирования pBR 322 создана на основе плазмид природного происхождения, выделенных из *E. coli*. Эта плазида содержит гены устойчивости к двум антибиотикам: ампициллину и тетрациклину, причем в генах устойчивости к этим антибиотикам имеются сайты рестрикции. Если фрагмент чужеродной ДНК встраивается в один из генов устойчивости, то последний инактивируется.

Вирусы. Есть вирусы, которые не ведут к гибели клетки, но встраиваются в геном клетки-хозяина и размножаются вместе с ней, либо вызывают ее неконтролируемый рост, т.е. превращают в раковую.

К таким относятся ДНК-вирусы SV-40 и вирус полиомы. Внедрение некоторых опухолевых РНК-вирусов ведет к отпочковыванию вирусных частиц от клетки без ее лизиса.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 33 из 88	

Вирус должен быть жизнеспособным после рекомбинирования его ДНК.

Легче всего вирусы вводятся в бактерии. Существуют гибридные вектора, содержащие ДНК фага и плазмиды.

К ним относятся, например, **космиды и фазмиды**.

Космиды – плазмидные вектора, в которые встроены участки генома фага λ , обеспечивающие возможность упаковки этой молекулы ДНК в фаговую частицу.

Фазмиды также являются гибридами между фагом и плазмидой. После встройки чужеродной ДНК могут в одних условиях развиваться как фаги, в других – как плазмиды.

Особенности бактерий как генетического объекта

- микроорганизмы имеют малые размеры, высокую скорость размножения,
- легко культивируются в искусственных условиях;
- гаплоидны, отсутствует явление доминантности;
- наличие половой дифференцировки - донорных и реципиентных клеток;
- наличие обособленных фрагментов ДНК (подвижные генетические элементы)

Отличительные особенности организации генома прокариот

Высокое абсолютное число генов.

Относительно высокое (70%) содержание структурных генов на имеющуюся ДНК.

Организация генов в опероны – целостно транскрибируемые группы функционально родственных генов.

Отсутствует интрон-экзонная структура – гены непрерывны.

Репликация

Репликация (от лат. *replicatio* — возобновление) — процесс создания двух дочерних молекул ДНК на основе родительской молекулы ДНК.

Репликацию ДНК осуществляет сложный комплекс, состоящий из 15—20 различных белков-ферментов, называемый реплисомой.

С помощью специальных ферментов двойная спираль материнской ДНК расплетается на две нити, на каждой образовавшейся нити достраивается вторая нить, образуя две идентичных дочерних молекулы ДНК, которые затем скручиваются в отдельные спирали.

В ходе последующего деления материнской клетки каждая дочерняя клетка получает по одной копии молекулы ДНК, которая является идентичной ДНК исходной материнской клетки. Этот процесс обеспечивает точную передачу генетической информации из поколения в поколение.

Этапы репликации ДНК

3 этапа: инициация, элонгация и терминация.

Репликация начинается в определенной точке *ori* (от англ. *origin*- начало) и происходит одновременно в двух противоположных направлениях.

В разделении матричных цепей ДНК участвуют ферменты: хеликаза и топоизомераза. Синтез новых цепей ДНК регулируется ДНК-полимеразой. Образуется так называемая «вилка репликации».

Одна из цепей достраивается последовательно.

Другая - достраивается ступенчато, посегментно, фрагментами (Оказаки) по 1-2 тыс. нуклеотидов, которые сшиваются ферментом ДНК-лигазой.

Синтез каждого фрагмента на отстающей цепи идет с участием ДНК-праймазы и затравочной РНК.

Затравочная РНК - короткая нить, длиной не более 10 нуклеотидов, комплементарная ДНК-матрице.

После того, как цепь ДНК начала синтезироваться, РНК-затравка удаляется, а брешь застраивается ДНК-полимеразой. Вновь синтезированный фрагмент сшивается с ранее синтезированным.

Пространственная организация участка прикрепления ДНК в зоне роста

ONTUSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 34 из 88	

цитоплазматической мембраны и клеточной стенки обеспечивают растаскивание двух копий ДНК по дочерним клеткам.

Структурно-функциональная единица ДНК

Основной структурно-функциональной единицей ДНК является оперон.

Оперон включает в себя группу структурных генов (цистронов), связанных друг с другом.

Ген-оператор, управляет всей группой структурных генов, между ними находится специфический участок- промотор (регуляторный элемент с которым взаимодействует РНК-полимераза)

Регуляторные элементы:

Энхансер - генетический элемент, усиливающий транскрипцию оперона

Аттенуатор - генетический элемент, ослабляющий работу оперона. Располагается между промоторным участком оперона и его первым структурным геном.

Каждый оперон функционирует как самостоятельная единица. Оперон или группа оперонов находится под контролем гена-регулятора. Такая структурно- функциональная единица называется регулон.

Организация работы оперона

В обычных условиях ген-регулятор активен и в клетке наблюдается синтез белка-репрессора.

Белок-репрессор имеет 2 активных участка. С одним -взаимодействует субстрат-индуктор (лактоза), а другим он присоединяется к гену-оператору и тем самым контролирует транскрипцию.

Если в среде имеется лактоза, она связывается с участком репрессора, приводит к изменению его конформации и лишает способности блокировать ген-оператор. Репрессия оперона снимается и происходит активный синтез фермента.

Если нет индуктора - оперон молчит, синтез м-РНК запрещен соответственно нет фермента.

Внехромосомные генетические элементы

Представлены:

- плазмидами,
- транспозонами,
- вставочными элементами (инсерционные)
- умеренными или дефектными фагами.

Подвижные генетические элементы придают бактериям селективные преимущества, позволяющие выжить в конкретных условиях.

Плазмиды

подвижные генетические элементы, представленные замкнутой ДНК. Могут быть несвязанными с бактериальной хромосомой (автономные) или встроенными в ее состав-интегрированные.

Термин плазмиды введен в 1952 г. После открытия Ледербергом F- фактора.

Транспозоны могут выполнять

- регуляторную
- кодирующую
- индуцируют мутации

Основной механизм перемещения - вырезание/ встраивание. Имеют особые концевые структуры, которые являются маркерами и позволяют их различать от других фрагментов ДНК.

Умеренные и дефектные фаги

Встраиваясь в хромосому бактерии, фаги вызывают ее лизогенизацию, в результате чего бактерия может приобретать новые свойства. Изменчивость лизогенных бактерий

OÑTÜSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 35 из 88	

связана либо с приобретением новых генов, либо с активацией «молчащих» генов бактерио-реципиента.

При этом может приобретаться свойство продукции токсинов.

- Изменчивость микроорганизмов
- Фенотипическая
- Генотипическая

Наследственная изменчивость

связана с изменением последовательности нуклеотидов в ДНК, полной или частичной их утратой, структурной перестройкой генов.

Виды наследственной изменчивости:

Мутации

Генетические рекомбинации

S – R – диссоциации

Спонтанные мутации проявляются в популяции в естественных условиях под влиянием невыясненных причин.

К их появлению приводят ошибки репликации, неправильное формирование комплементарных пар оснований. Примерная частота возникновения мутаций 1 на $10^6 - 10^7$ клеток. Спонтанные мутации могут определять благоприятные и неблагоприятные генетические изменения.

Мутагены могут быть:

Физическими (температура, ионизирующая радиация, ультрафиолетовое облучение, высокочастотное электромагнитное излучение, ультразвук и т.д.);

Химическими (аналоги оснований – бромурцил; алкилирующие соединения – азотистая кислота; интеркалирующие агенты – акридиновые красители и т.д.)

S – R – диссоциации

Возникают после встраивания внехромосомных факторов наследования в бактериальную хромосому.

Образуется две формы бактериальных клеток, которые образуют разные колонии.

R – формы – шероховатая поверхность, неровные края;

S – формы – гладкая поверхность, ровные края.

Для большинства бактерий вирулентные формы образуют S – колонии.

При диссоциации одновременно происходят изменение морфологии, биохимических, АГ свойств, патогенных свойств микроорганизмов.

Типы рекомбинаций:

общая или гомологическая рекомбинация, когда в структуре взаимодействующей ДНК есть гомологические участки;

Сайт – специфическая рекомбинация. Эта рекомбинация происходит в строго ограниченных участках (сайтах) хромосомы

Механизмы генетических рекомбинаций

Трансформация

Трансдукция

Конъюгация

Трансформация перенос генетического материала клетки донора, при котором реципиент захватывает из внешней среды фрагменты чужеродной ДНК.

При трансформации рекомбинация происходит если ДНК бактерий родственны друг другу. Впервые явление трансформации описал Гриффитс (1928 г.).

Фазы трансформации:

- 1) адсорбция ДНК - донора на клетке реципиента;
- 2) проникновение ДНК внутрь клетки-реципиента;
- 3) соединение ДНК с гомологичным участком хромосомы реципиента с последующей

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 36 из 88	

рекомбинацией.

Чем выше степень гомологии, тем эффективнее трансформация

Абортивная трансдукция, когда фрагмент ДНК, привнесенный фагом не вступает в рекомбинацию и не реплицируется, но с него считывается информация о синтезе соответствующего продукта.

Конъюгация перенос генетического материала из клетки в клетку при их непосредственном взаимодействии.

Донорами являются клетки, несущие F-плазмиду, а не имеющие плазмиды являются реципиентами

Процесс конъюгации у бактерий впервые был обнаружен Джошуа Ледербергом и Эдвардом Тейтумом в 1946 г.

При взаимодействии F “+” клетки с F “-” клеткой половой фактор передается независимо от хромосомы донора, с частотой 100% и реципиентные клетки становятся F “+”.

Интеграция F плазмиды в состав бактериальной хромосомы приводит к разрыву одной из нитей ДНК, что обеспечивает возможность ее переноса в реципиентную клетку.

F – плазида определяет не только точку начала переноса, но и направление передачи хромосомы от донорской клетки к реципиентной.

Первый этап конъюгации – прикрепления клетки-донора к реципиентной клетке с помощью половых ворсинок (sex pili). Образование между клетками конъюгационного мостика, через который из клетки донора в клетку реципиента передается F-фактор и другие плазмиды.

При переносе бактериальной хромосомы происходит разрыв цепей при помощи эндонуклеазы.

Одна нить ДНК через конъюгационный мостик проникает в клетку – реципиента, где сразу достраивается до двунитевой структуры. Оставшаяся в клетке доноре нить ДНК, также достраивается комплементарно.

Генетика вирусов

Характеристика вирусных популяций

Высокая численность популяции увеличивает вероятность мутаций

Быстрая смена поколений

Гаплоидность и бесполой способ размножения

Малая емкость генома и отсутствие повторяющихся генов

Непрерывность в динамике эпидемического процесса

Хорошо адаптированы к внешним условиям

Ненаследуемые изменения у вирусов связаны с особенностями клетки хозяина и проявляются изменением химического состава суперкапсида, в следствие включения в ее состав липидов и углеводов тех клеток хозяина в которых происходит их репродукция.

Фенотипическое смешивание при смешанном заражении клеток несколькими вирусами, если часть потомства одного вируса приобретает свойства обоих вирусов, но генотип их остается неизменным.

Например, РНК одного вируса, заключено в капсид другого

Мутации

У вирусов возникают во время репликации их нуклеиновых кислот.

Мутанты вирусов фенотипически различаются по строению бляшек, которые они образуют в культуре клеток, по чувствительности к температуре, АГ-свойствам белков капсида.



Вирусы способны и к генетическим рекомбинациям.

При одновременном заражении двумя вирусами чувствительной клетки - хозяина их свойства могут меняться. Особенно часто наблюдается у вирусов имеющих фрагментированный геном.

Генетическая реактивация - перераспределение генов, когда у родственных вирусов инактивированы разные гены. При их взаимодействии могут образовываться полноценные вирусные геномы, с множественной их активацией. Наблюдается процесс у рео-, роко-вирусов и др. когда белки кодируемые геном одного вируса, способствуют репродукции другого вируса. Функциональное взаимодействие двух дефектных вирусов. При этом один вирус восполняет генетический дефект другого.

Комплементация не сопровождается обменом нуклеиновых кислот между молекулами данных вирусов. Описана у многих вирусов: аденовирусы и онкогенный вирус SV40.

Интерферирующие взаимодействия

Состояние невосприимчивости к вторичному заражению клетки уже инфицированной вирусами

Интерференция может быть:

Гетерологической
гомологической

Гетерологическая интерференция. Инфицирование одним вирусом полностью блокирует возможность репликации другого вируса в пределах одной клетки. Связан с угнетением адсорбции другого вируса (блокирование или разрушение рецепторов)

Гомологическая интерференция. При инфицировании клетки дефектным и полноценным вирусом (помощником). Дефектный вирус способен вмешиваться в репродукцию и образовывать дефектные интерферирующие частицы (ДИ)

Гибридная технология

Важнейшим этапом в развитии биотехнологии стало создание гибридомы

(Д.Келлер, Д.Мистейн – 1975 г. Нобелевская пре

Основана на получении гибридных клеток

В- лимфоцитов, стимулированных конкретным антигеном

Миелоидных (опухолевых клеток), способных к неограниченному размножению в искусственных условиях

Такая клетка не только быстро размножается, но и продуцирует антитела к данному антигену (высокой специфичности).

Такие АТ, полученные от одной родоначальной клетки получили название моноклональных.

Генетическая информация в стволовой клетке находится в «нулевой точке» отсчета.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 38 из 88	

Клетка еще не имеет специализации и не начала выполнять программу размножения.

Эмбриональные стволовые клетки могут принять любую программу и превратиться в один из 150 возможных типов зародышевых клеток.

Клонирование органов из стволовой клетки (мочевого пузыря, легкое, печень)

Биопринтинг- технология трехмерной биопечати органов из аутологичных клеток.

Эмбриогенетическая инженерия

Перестройка генома- реконструкция эмбрионов путем клонирования.

генно-инженерные методы радикального лечения наследственных болезней.

Типы генотерапии

ex vivo- пораженные клетки выделяют из организма человека, инкубируют с вектором, а затем вновь вводят в организм (онкогематология);

In situ- вектор с необходимым набором генов вводят непосредственно в пораженные ткани (муковисцидоз, опухоль);

In situ- вектор с необходимым набором генов вводят непосредственно в пораженные ткани (муковисцидоз, опухоль);

Баллистическая трансфекция - основана на обстреле органов и тканей частицами тяжелых металлов (золото, вольфрам), покрытых плазмидной ДНК.

Такие частицы приносят гены непосредственно в ядра клеток (заболевания кожи и хряща).

Избирательная инактивация гена

«адресное» разрушение гена, («антисмысловая» блокировка гена или производимой им РНК), позволяющая вывести из строя любой ген внутри клетки.

Этот процесс известен также как «нокаутирование» (от англ. *to knock out*, сбивать с ног), а модифицированные организмы — как нокаутные.

Иммобилизованные биообъекты

Под иммобилизацией понимают связывание биообъекта с нерастворимым носителем при сохранении его функциональной активности

фермента

Белка (инженерная энзимология)

Целых клеток

4. Иллюстративный материал: презентация.

5. Литература: см.приложение 1.

6. Контрольные вопросы:

1. Основные понятия молекулярной генетики. Первичная структура гена.Регуляторная и структурная части генов.
2. Методы селекции микроорганизмов. Мутагенез. Виды мутагенов. Типы мутаций. Скрининг.
3. Генетические основы биотехнологии.

OŃTŪSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «OŃTŪSTIK Qazaqstan medicina akademiasy» AQ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 39 из 88	

ЛЕКЦИЯ № 5

1. Тема: Методы генной инженерии. Генетическая перестройка в опытах “in vitro” и “in vivo”.

2. Цель: обучающийся должен усвоить задачи генной инженерии.

3. Тезисы лекции:

Сферы практического применения препаратов аминокислот

1) в пищевой промышленности (около 30 % производимых аминокислот):

Цистеин - предотвращает пригорание пищи, улучшает качество хлеба при выпечке, усиливает запах пищи;

Глицин - обладает освежающим, сладковатым вкусом, используется при производстве напитков;

Глутаминовая кислота – для усиления вкуса и консервирования пищи;

2) в медицинской и фармацевтической практике:

лекарственные препараты, смеси для ЛП, для терапии послеоперационных больных, язвенной болезни, печени, психических заболеваний

(серотонин, аспарагин, валин, гистидин, глицин и др.);

3) в химической промышленности аминокислоты используют как предшественники:

в производстве детергенов,

в производстве полиаминокислот,

в производстве полиуретана и т.п.;

4) в сельском хозяйстве:

как кормовые балансирующие добавки.

Существует 4 способа промышленного получения незаменимых аминокислот:

1) *гидролиз природного белоксодержащего сырья;*

2) *химический синтез;*

3) *микробиологический синтез;*

4) *биотрансформацией предшественников аминокислот с помощью микроорганизмов или выделенных из них ферментов (химико-микробиологический метод).*

Получение аминокислот гидролизом природного белоксодержащего сырья

В качестве источников для гидролиза используют:

отходы мясоперерабатывающей промышленности

(отходы обработки животного сырья, кровь и т.д.),

яичный белок,

казеин молока,

клейковина пшеницы,

соевый шрот и т.д.

При гидролизе белоксодержащее сырье *нагревают с растворами кислот и щелочей*, при температуре от 100 до 105 °С в течение 20...48 часов. При этом аминокислоты переходят в гидролизат.

Для выделения отдельных аминокислот из гидролизата проводят сложную многостадийную очистку, включающую в себя:

нейтрализацию среды выделения,

ионообменную хроматографию,

аффинную хроматографию,

концентрирование АК,

лиофилизацию АК с последующей фасовкой.

ONTUSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 40 из 88	

Основные недостатки данного способа:

Сложность процесса выделения и очистки,

Кроме того, само сырье считается *дефицитным* и *дорогим*, поэтому аминокислоты имеют высокую себестоимость.

Часть аминокислот может разрушиться (таких как триптофан, цистеин, метионин, тирозин),

Происходит рацемизация.

Получение аминокислот химическим синтезом

Химический синтез аминокислот занимает второе место по объему производства (около 30%).

Основные недостатки химического синтеза:

1. *Получение смеси аминокислот, состоящей из D- и L-изомеров* (биологической активностью в организме человека и животных обладают лишь L-изомеры).

Некоторые из D-изомеров токсичны для человека и животных.

Исключением в этом отношении является *метионин*, у которого биологически активными являются как D-, так и L-изомеры, в связи, с чем данная аминокислота производится преимущественно путем химического синтеза.

2. *Производство аминокислот связано с использованием дорогостоящего оборудования и агрессивных токсических соединений в качестве исходного сырья.*

3. *Процесс, как правило, протекает при высокой температуре,*

4. *Требует дорогостоящих катализаторов,*

5. *Сопровождается образованием побочных продуктов,*

6. *Загрязняет окружающую среду,*

7. *Небезопасно и вредно для обслуживающего персонала.*

Микробиологический способ производства аминокислот

Более 60 % всех производимых чистых препаратов аминокислот получают путем микробиологического синтеза.

Данный способ производства аминокислот включает в себя *биосинтез аминокислот высокоактивными штаммами-продуцентами* и *технологические операции по получению различных товарных форм.*

При микробиологическом синтезе *образуются только L-аминокислоты.*

Чаще всего для синтеза аминокислот *используют ауксотрофные мутантные штаммы.*

На основе культивирования микроорганизмов для получения чистых препаратов аминокислот *применяют промышленные технологии, включающие одно- и двухступенчатый синтез аминокислот.*

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,

культуральную жидкость сгущают,

получают из нее товарный продукт с высокой концентрацией синтезированной микробами аминокислоты.

В процессе *двухступенчатого синтеза* аминокислоты:

получают предшественника аминокислоты (часто более дешевым химическим синтезом), 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.*

OŃTŪSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «OŃTŪSTIK Qazaqstan medicina akademiasy» AQ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 41 из 88	

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.

Продуценты аминокислот.

В качестве продуцентов аминокислот используют *генетически измененные штаммы, обладающие способностью к сверхсинтезу аминокислот.*

Лучшими продуцентами аминокислот являются *ауксотрофные мутанты* (микроорганизмы, лишённые ряда ферментных систем, поэтому очень требовательны к составу питательной среды, в которой должно присутствовать большое количество факторов роста).

В качестве продуцентов аминокислот используют *грамположительные бесспорные бактерии родов :*

Corynebacterium,

Brevibacterium,

Micrococcus.

Производство аминокислот с помощью ауксотрофных мутантов

Для производства аминокислот бактерии стали использовать с начала 50-х гг., при этом штаммы бактерий постоянно улучшали генетическими методами, выделяя ауксотрофные мутанты и мутанты с изменёнными регуляторными свойствами.

Образовывать аминокислоты способны бактерии многих родов:

Виды *Corynebacterium* или *Brevibacterium*, выращиваемые на *углеродном сырье*, на *этиловом спирте* или *ацетате* при наличии достаточного количества *биотина* в питательной среде *способны синтезировать до 30 г/л глутамата.*

Условия накопления глутамата:

Полное или частичное подавление активности α -кетоглутаратдегидрогеназы,

Добавление β -лактамовых антибиотиков,

Добавление ПАВ и жирных кислот.

Путем изменения условий среды процесс ферментации, в ходе которого образуется L-глутамат, может быть переключен на синтез L-глутамина или L-пролина:

- при высокой концентрации биотина и ионов аммония создаются благоприятные условия для образования L-пролина,

- при больших концентрациях ионов аммония и цинка в слабо кислой среде усиливается синтез L-глутамина.

Ауксотрофные мутанты применяются, когда необходимо синтезировать соединения являющиеся конечными продуктами разветвленных цепей метаболических реакций:

Например: L-аспартат является общим предшественником для L-лизина, L-треонина, L-метионина и L-изолейцина.

Первая реакция в процессе образования этих аминокислот катализируется аспартокиназой, активность, которой может быть ингибирована по механизму отрицательной обратной связи при совместном действии L-лизина, L-треонина.

У мутантов ауксотрофных по гомосерину или треонину (метионину) существенно уменьшается внутриклеточная концентрация L-треонина, что снимает блокаду с аспартокиназы и позволяет клеткам накапливать L-лизин.

Ауксотрофные мутанты способны накапливать конечные продукты неразветвленных путей биосинтеза.

В таких случаях приходится отбирать мутанты с *частично нарушенной регуляцией биосинтеза*, что позволяет получить *повышенный выход конечного продукта. Такие мутанты называются регуляторными, их отбирают по устойчивости к аналогам*

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 42 из 88	

аминокислот или среди ревертантов ауксотрофов.

В основе использования аналогов аминокислот лежит сходство с природными аминокислотами. Они ингибируют рост бактерий, но этот эффект может быть уменьшен путем добавления соответствующей аминокислоты.

Таким образом, *аналоги выступают в роли искусственных, работающих по принципу отрицательной обратной связи, ингибиторов ферментов, обеспечивающих биосинтез природных аминокислот и одновременно подавляют процесс включения их в белки.*

Для увеличения выхода аминокислот можно воспользоваться как ауксотрофией, так и дефектами регуляции одновременно.

Например: у *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum* сверхпродукции L-треонина не наблюдается, т.к. не происходит сочетанного ингибирования по механизму отрицательной обратной связи *аспартокиназы* L-треонином, и L-лизином, а L-треонин ингибирует *гомосеридегидрогеназу*.

Мутант, устойчивый к аналогу треонина синтезирует в избыточном количестве треонин, т.к. его ферменты ингибированные этой аминокислотой, *десенсибилизированы*.

Гомосеридегидрогеназа и киназа, принимающие участие в синтезе треонина также «*выключаются*» L-метиокином, и поэтому ауксотрофы по метионину образуют L-треонин с еще большим выходом.

Регуляторные мутанты можно получить путем *трансдукции*, проводя отбор мутаций, вызывающих полное рассогласование регуляторных механизмов, затем объединяя эти признаки путем трансдукции.

Получение глутаминовой кислоты

L-глутаминовая кислота (α -аминоглутаровая):

– *первая аминокислота, полученная путем промышленного микробиологического синтеза;*

важнейшая аминокислота растительных и животных белков, не относится к незаменимым;

глутамат натрия усиливает вкус пищевых продуктов, способствует длительному сохранению вкусовых качеств консервированных продуктов;

за рубежом глутамат натрия добавляют во все продукты не только при консервировании, но и при замораживании и просто хранении;

глутаминовая кислота стимулирует пищеварение.

Производство глутаминовой кислоты является крупно-тоннажным биотехнологическим производством (> 400 000 т/ г).

Ведущие страны–производители - Япония и США.

Продуценты глутаминовой кислоты:

- дрожжи,
- микроскопические грибы,
- бактерии (*обеспечивают наибольший выход*).

Бактерии - продуценты: *Micrococcus, Brevibacterium, Corynebacterium.*

Сверхсинтез кислоты возможен при *торможении скорости роста и увеличении проницаемости клеточной мембраны для глутаминовой кислоты:*

наличие биотин (1–5 мкг/л),

присутствие некоторых антибиотиков

высокая концентрация аммония в среде,

высокая активность НАД(Ф)Н-зависимой глутаматдегидрогеназы,

отсутствие или дефект α -кетоглутарат-дегидрогеназы.

Стадии производства глутаминовой кислоты :

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 43 из 88	

Приготовление питательной среды.

- Питательная среда содержит 5 % сахарозы, 1 % мочевины, 1,5 % мелассы и по 0,1 % сульфата магния, одно- и двухзамещенного фосфата калия; рН 6,8 – 7,5; температура 30 °С.

- Инкубация на каждой стадии длится 24 ч.

- Инокулят готовят в аэробных условиях на среде такого же состава в ферментерах объемом 200 л и 5 м³ до получения 6–8 г/л сухой биомассы.

2. Производственное культивирование:

- Инокулят (5–6 %) переносят в главный ферментер объемом 50 м³, 70 % общего объема которого занимает питательная среда следующего состава: 8,5–10 % сахарозы, 1,2 % мелассы, 0,5 % мочевины, по 0,1 % одно- и двухзамещенного фосфата калия, по 0,01 % сульфата марганца и сульфата цинка.

- Интенсивность аэрации – 40–45 мг О₂ л/мин, рН 7,8–8,0, температура – 30 °С.

- Ферментация длится 2 сут. (за это время в среде накапливается глутаминовой кислоты до 50 г/л).

3. Освобождение целевого продукта из биомассы методом центрифугирования. Фильтрат осветляют активным углем.

4. Концентрирование культуральной жидкости в выпарном аппарате до 40–50 % абсолютно сухого вещества при температуре не выше 70 °С.

5. Кристаллизация и последующее подкисление целевого продукта до рН 3,2 и охлаждение его до 15 °С до тех пор пока в маточном растворе остается не более 20–30 г глутаминовой кислоты.

Постферментационная стадия

(получение высокоочищенных препаратов) :

1. в культуральную жидкость добавляют:

- негашеную известь или известковое молоко,

- затем избыток ионов осаждают кислотой,

- осадок удаляют центрифугированием.

2. фильтрат осветляют активированным углем

3. сорбируют на ионообменных смолах

4. концентрируют вакуум-выпариванием при 40–60 °С.

5. Осаждение кристаллов глутаминовой кислоты проводят в изоэлектрической точке (рН 3,2 при 4–15 °С).

В результате перекристаллизации чистота продукта достигает 99,6 %.

7. кристаллы кислоты отделяют от маточника центрифугированием, промывают и сушат.

Для получения глутамата натрия -

кристаллы глутаминовой кислоты обрабатывают гидроокисью натрия:

1. влажные кристаллы растворяют в воде,

2. нейтрализуют 40–50 % раствором едкого натра,

3. полученный раствор фильтруют,

4. упаривают под вакуумом до содержания сухих веществ 60 %

5. направляют на перекристаллизацию,

6. полученные кристаллы глутамата натрия выделяют из маточного раствора центрифугированием,

7. высушивают током горячего воздуха.

Содержание чистого вещества составляет 98 %.

Микробиологический синтез лизина

Лизин – алифатическая незаменимая аминокислота:

- структурные элемент белка,

- является предшественником карнитина и оксализина,

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 44 из 88	

- способствует секреции пищеварительных ферментов
- способствует 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 гг.; затем в *Голландии* и *США*.

Лизин – алифатическая незаменимая аминокислота:

- структурные элемент белка,
- является предшественником карнитина и оксилизина,
- способствует секреции пищеварительных ферментов
- способствует 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 гг.; затем в *Голландии* и *США*.

Продуцентами лизина являются - *бактерии, актино-мицеты, сине-зеленые водоросли*.

Сейчас получены штаммы, способные вырабатывать до 60 г/л и более аминокислоты.

В основе производства положен *одноступенчатый микробиологический синтез* (включают промышленное культивирование ауксотрофных мутантов бактерий из рода *Corynebacterium*).

Мутантные клетки, не образующие *гомосерин-дегидрогеназы*, при культивировании на искусственной питательной среде *обеспечивают высокий выход лизина*.

Дефицитные аминокислоты, которые не синтезируются мутантными клетками (*гомосерин, треонин, метионин*), вводятся в состав питательной среды в таком количестве, чтобы они не были регуляторами синтеза лизина.

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*.

Приготовление питательной среды :

-*источника углерода* используют смеси, включающие уксусную кислоту и свекловичную мелассу, небольшие добавки сахара (1 %) повышают выход лизина на 30–50 %;

- в качестве *источника азота* – соли аммония, мочевины, кукурузный экстракт

- в качестве *источника биологически активных веществ* (1,2–1,5 % по содержанию сухих веществ), гидролизаты дрожжей.

- *дефицитные аминокислоты* - гомосерин, треонин, метионин.

- *необходимые для жизнедеятельности* микроорганизмов микро- и макроэлементы, витамины (биотин и др.).

- среда должна содержать (в л): 200 мг метионина, 800 мг треонина, 15–20 мкг биотина.

- соотношение углерода и азота оптимально как 11: 1.

Посевной материал - вначале выращивается в посевных аппаратах *при 28–32 °С, рН 7–7,2 в течение 18–24 ч*.

Суспензия клеток подается в 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.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 45 из 88	

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.

Производство нескольких видов продукции: *жидкий концентрат лизина (ЖКЛ), сухой кормовой концентрат лизина (ККЛ), высококонцентрированные кормовые и высокоочищенные кристаллические препараты*.

1. *ЖКЛ* получают *выпариванием* культуральной жидкости на вакуум-выпарной установке до концентрации 40 %. Для предотвращения деградации лизина при нагревании добавляют бисульфит натрия и соляную кислоту до pH 4,5–5,0, в результате образуется соль – монохлоргидрат лизина.

2. *Сухой кормовой концентрат лизина* - жидкий концентрат *сушат горячим воздухом* на распылительной сушилке при 90 °С до влажности 4–8 % (препарат содержит 15–20 % монохлоргидрата лизина, 15–17 % белков, 14 % аминокислот, витамины группы В, минеральные вещества). Далее *высушивают* на вальцово-ленточной сушилке и *гранулируют*. Гранулированный препарат ККЛ негигроскопичен, содержит 7–10 % лизина.

3. Для получения *очищенного высококонцентрированного препарата лизина* культуральную жидкость *после фильтрования подкисляют соляной кислотой* до pH 1,6–2.

Образовавшийся раствор монохлоргидрата лизина направляют на *колонки с катионитом*.

Затем *проводят десорбцию аминокислоты* элюированием 0,5–5 % раствором аммиака.

Элюат *выпаривают под вакуумом* при 60 °С до концентрации 30–50 %.

После подкисленный соляной кислотой раствор монохлоргидрата *высушивают*.

Путем *перекристаллизации* полученной соли можно получить препараты с содержанием монохлоргидрата лизина в количестве 97–98 %

Микробиологический синтез триптофана

Отсутствие или дефицит *триптофана* в организме приводит к ряду тяжелых заболеваний (*диабет, туберкулез, пеллагра*).

Для производства триптофана применяют:

- *одноступенчатый синтез* с помощью бактериальных ауксотрофных мутантов с нарушенной регуляцией синтеза аминокислот;

- *двухступенчатый синтез*, включающий вначале получение предшественника триптофана, а затем его ферментативное превращение в *триптофан*.

Для смещения метаболических реакций по пути преимущественного образования триптофана необходимо *блокировать превращение хоризмовой кислоты в префеновую*, что достигается действием мутагенных факторов.

Продуценты - ауксотрофные мутанты рода *Bacillus subtilis* с нарушенным синтезом фенилаланина и *тирозина*.

Все технологические процессы организованы по той же схеме, что и получение лизина. Ферментация длится 48 ч при 37°С, концентрация триптофана в культуральной жидкости достигает 10 г/л

Синтез триптофана в нашей стране производится преимущественно по *двухступенчатой* схеме:

- Вначале *методом химического синтеза* получают предшественник триптофана – *антраниловую кислоту*

- *Антраниловую кислоту* затем с участием ферментов микробного происхождения превращают в триптофан.

Биохимическое превращение антраниловой кислоты в триптофан происходит в 3 этапа:

- на *I этапе* из антраниловой кислоты с участием *фосфорибозилпрофосфата* образуется *аминогликозид-N-(5'-фосфорибозил)-антраниловая кислота*,

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 46 из 88	

- на 2 этапе аминокликозид-N-(5'-фосфорибозил)-антраниловая кислота в результате внутримолекулярной перегруппировки и декарбоксилирования превращается в индол-3-глицерофосфат.

- на 3 этапе под действием фермента триптофансинтетазы из индол-3-глицерофосфата и серина образуется триптофан.

В качестве активной группы у фермента триптофансинтетазы служит пиридоксальфосфат. В качестве источника ферментов используют дрожжи.

Производственный процесс биохимического превращения антраниловой 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 °С.

Далее в ферментер вводят спиртовой 5 % раствор антраниловой кислоты и 50 % раствор мочевины.

Через 3–4 ч после добавления антраниловой кислоты в ферментер дополнительно подается меласса в виде 25 % раствора.

На последующих этапах ферментации периодически производится подача антраниловой 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.

4. Иллюстративный материал: презентация.

5. Литература: см.приложение 1.

6. Контрольные вопросы:

1. Методы генной инженерии: гибридизация.
2. Генетическая перестройка в опытах “in vitro” и “in vivo”.
3. Плазмиды, их основные характеристики и роль в генетическом конструировании продуцентов БАВ.

OÑTÚSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 47 из 88	

ЛЕКЦИЯ № 6

1. Тема: Биотехнология рекомбинантных белков. Рекомбинантные белки, принадлежащие к различным группам физиологически активных веществ.

2. Цель: обучающийся должен усвоить задачи и основные направления технологии лекарственных форм как науки.

3. Тезисы лекции:

План лекции

1. Перспективы производства ферментов, витаминов и коферментов
2. Биотехнология получения ферментов

Источники получения ферментных препаратов

Ферменты присущи всем живым объектам и находятся практически во всех растениях, животных и микроорганизмах. Однако процесс биосинтеза ферментов в организме связан с обеспечением метаболизма клеток, и количество синтезируемых ферментов строго определяется жизненной потребностью организма; такие объекты не могут служить источником получения ферментных препаратов.

Для этого пригодны только микроорганизмы, некоторые растения или отдельные органы растений и животных, способные накапливать значительное количество ферментов.

Растительное сырье. Источником ферментов может быть пророщенное зерно различных злаков (солод). Оно может либо использоваться непосредственно как технический ферментный препарат, либо служить исходным материалом для получения очищенных ферментных препаратов.

В тропических и субтропических странах в качестве сырья для промышленного производства протеиназ используют латекс дынного дерева, латекс растений, относящихся к виду фикусовых, например, листья, побеги инжира, сок зеленой массы ананаса и др.

Органы, и ткани животных. На всех мясоперерабатывающих комбинатах собирают сырье, содержащее ферменты, консервируют его и используют для получения ферментных препаратов. Таким сырьем являются поджелудочная железа, слизистые оболочки желудков и тонких кишок свиней, сычуги крупного рогатого скота, сычужки молочных телят и ягнят, семенники половозрелых животных.

Поджелудочная железасодержит большое количество разнообразных ферментов: химотрипсин, коллагеназу, эластазу, трипсин, амилазу, липазу и др.

Слизистая оболочка желудков свиней и сычугов крупного рогатого скота служит источником пепсина и липазы. Из сычужков молочных телят и ягнят получают реннин (сычужный фермент). Семенники половозрелого скота содержат фермент гиалуронидазу.

Микроорганизмы. В специально созданных условиях микроорганизмы способны синтезировать огромное количество разнообразных ферментов. Они неприхотливы к составу питательной среды, легко переключаются с синтеза одного фермента на другой и имеют сравнительно короткий цикл роста (16-100 ч).

Для промышленного получения ферментных препаратов используют как природные штаммы микроорганизмов, выделенные из естественных объектов, так и мутантные штаммы.

Продуцентами ферментов могут быть различные микроорганизмы: бактерии, грибы, дрожжи, актиномицеты. Микроорганизмы могут синтезировать одновременно целый комплекс ферментов, но есть и такие, особенно среди мутантных штаммов, которые являются моноферментными и образуют в больших количествах только один фермент.

Классификация и номенклатура ферментов и ферментных препаратов.

По современной классификации все ферменты делятся на шесть основных классов по типу катализируемой реакции:

- 1) оксидоредуктазы;
- 2) трансферазы;
- 3) гидролазы;
- 4) лиазы;
- 5) изомеразы и
- 6) лигазы (синтетазы).

Большинство промышленно важных ферментов, потребность в которых определяется десятками тысяч тонн, относятся к третьему классу - гидролазам.

Подавляющее количество препаратов, выпускаемых различными фирмами мира, являются комплексными, содержащими помимо основного фермента еще значительное количество сопутствующих ферментов и белков.

Поэтому в технологии ферментов препараты чаще классифицируют по основному компоненту в смеси ферментов, присутствующих в данном препарате: амилалитические, протеолитические, липолитические и т. д.

Область применения и источники ферментов

Производство ферментных препаратов занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии. Постоянно увеличивается объем их выпуска и расширяется сфера применения.

Ферменты являются высокоактивными нетоксичными биокатализаторами белкового происхождения.

Их преимуществом перед химическими катализаторами является действие при нормальном давлении, температуре от 20 до 70 °С, рН от 4 до 9. Они имеют высокую субстратную специфичность, что позволяет в сложной смеси субстратов направленно воздействовать только на определенные соединения.

Согласно принятой классификации и номенклатуре сейчас идентифицировано около 2000 ферментов. Промышленно выпускается около 250 наименований, причем 99 % общей суммы реализации ферментных препаратов приходится только на 18 ферментов.

Наибольший удельный вес среди выпускаемых препаратов занимают протеиназы, широко используемые в синтетических моющих средствах, и амилазы для переработки крахмала.

Эти два вида препаратов составляют 60% общего объема выпуска ферментных препаратов за рубежом.

Другими крупными отраслями – потребителями ферментов, являются

производство вин и соков 10 %;

производство спирта 8%;

сыроделие 5 %;

хлебопечение 5 %;

пивоварение 6 %;

прочие отрасли %.

Особое место в общем объеме производства ферментов занимают высокоочищенные ферментные препараты. Их доля в общем объеме очень мала, так как технология сложна, требует больших материальных затрат и времени. Эти препараты очень важны для медицины, аналитических целей и научных исследований.

Ферменты присущи всем живым существам, однако для их выделения используют только те природные объекты, в которых содержание используемого энзима составляет не менее 1 %

OŃTŪSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «OŃTŪSTIK Qazaqstan medicina akademiasy» AҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 49 из 88	

Источниками ферментов могут быть:

проросшее зерно различных злаков (солод) – для получения амилаз, латекс фикусовых, дынного дерева – для получения протеиназ;

отдельные ткани и органы животных (поджелудочная железа, слизистые оболочки желудков и тонких кишок, сырный сычуг крупного рогатого скота);

микроорганизмы.

В специфических условиях микроорганизмы способны синтезировать огромное количество ферментов. Они легко переключаются с синтеза одного фермента на другой, имеют короткий цикл роста (от 16 до 100 ч). Для промышленного получения ферментов используют как естественные штаммы, так и полученные с помощью мутагенеза, селекции и индукции биосинтеза.

Ферменты способны синтезировать бактерии, грибы, дрожжи, актиномицеты; микроорганизмы могут быть моно- или полиферментами

Выбор штамма и условий культивирования

Целесообразность применения микроорганизмов для производства ферментов заключается в следующем:

генетическими манипуляциями удаётся в тысячу и более раз увеличить уровень катаболитных и в несколько сот раз уровень биосинтетических ферментов;

энергетически оправдано выращивание микробных клеток в больших масштабах в связи с применением недорогих сред и быстрого роста микроорганизмов;

огромное разнообразие реакций, к которым способны микроорганизмы. Это особенно касается вторичного метаболизма;

микроорганизмы служат источником не только таких ферментов, которые встречаются у животных и растений, но и ряда уникальных ферментов, нигде более не обнаруженных. Например, целлюлоза, танназа, гидрогеназа и др.

способность микроорганизмов адаптироваться к различным окружающим условиям, что позволяет переносить культуру на производство, где она растёт на дешёвых субстратах.

Промышленное производство и применение ферментов основано на двух важных факторах:

во-первых, ферменты образуются в живых клетках;

во-вторых, они могут проявлять свое специфическое действие в среде независимо от живых клеток.

При первоначальном выделении штамма исходят из того, что микроорганизмы адаптируются к утилизации субстрата, находящегося в изобилии в местах их обитания, и, следовательно, образуют ферменты, реагирующие с этим субстратом.

Поэтому продуценты целлюлаз и лигнолитических ферментов выделяются из лесных почв, продуценты пектиназ – из фруктов и растений, деструкторы мочевиной кислоты – из птичьего загона и т.д.

Ферменты близкородственных штаммов имеют сходные свойства, а у дальнеродственных – могут сильно отличаться.

Первая ступень производства ферментов состоит в селекции организма, образующего желаемый фермент в наибольшем количестве.

При этом учитывают следующие общие требования к продуценту:

желательно образование внеклеточных ферментов, так как их легче выделить;

высокий выход фермента за короткое время;

очистка фермента от культуральной жидкости должна быть легкой;

штаммыне должны продуцировать антибиотики, токсичные вещества и не должны быть родственниками штаммов, образующих токсины. Чтобы вызвать свёрхсинтез ферментов используют ряд методов, связанных с изменением

ONTUSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 50 из 88	

окружающих условий роста и ведущих к изменению генетики организма.

Технология культивирования микроорганизмов – продуцентов ферментов и выделение ферментов

Технологический процесс можно разбить на три стадии:

получение посевного материала;

получение производственной культуры методами поверхностного или глубинного культивирования;

выделение из готовой производственной культуры технических или очищенных ферментных препаратов.

Поверхностный метод состоит в культивировании микроорганизмов на поверхности увлажненных стерилизованных отрубей, размещенных в кюветах. Инкубацию ведут в специальном термостатируемом цехе при постоянном контроле в нем температуры, влажности и подачи воздуха.

Глубинный метод более экономичен. Для его реализации применяются ферментеры из нержавеющей стали, снабженные устройствами для перемешивания и подачи в жидкую питательную среду стерильного воздуха.

Наиболее прогрессивен проточный метод, который обеспечивает непрерывную подачу в ферментер питательной среды и посевного материала и непрерывный отбор продуктов жизнедеятельности и микробиальной массы. Достоинством метода является возможность длительное время поддерживать в автоматическом режиме рост культуры микроорганизмов (до 200 суток).

В промышленности широко используют коммерческие препараты, чистота которых составляет всего 0,1 % (то есть 99,9 % составляют примеси). К таким отраслям относят спиртовую, кожевенную, текстильную промышленность, сельское хозяйство, производство бытовой химии.

Выделение и очистка фермента из культуры микроорганизмов – достаточно трудоемкая и дорогостоящая процедура, поэтому, если фермент можно использовать в виде неочищенного препарата, его не очищают.

Неочищенные препараты получают в мягком режиме высушивания культуры микроорганизмов вместе с остатками питательной среды.

Такие препараты получают или из экстракта культуры продуцента, выращенного поверхностным способом, или из фильтрата культурной жидкости продуцента, выращенного глубинным способом

Для большинства отраслей пищевой промышленности, научных исследований и медицины требуются очищенные ферментные препараты. Источником выделения фермента может быть биомасса микроорганизмов, экстракт или фильтрат культуральной жидкости.

Биомассу микроорганизмов необходимо тщательно измельчить, вплоть до разрушения субклеточных структур: лизозом, митохондрий, ядер и т.д.

Затем препараты очищают осаждением органическими растворителями, солями, после чего диализом, аффинной хроматографией, переосаждением, гель-фильтрацией, сорбцией, кристаллизацией и пр.

Так как ферменты имеют белковую природу, то особое значение придают соблюдению режимов, сохраняющих их активность при инактивации сопутствующих балластных белков. Очищенные ферменты хранят при низкой температуре (до минус 80 °С). Для стабилизации ферментов в их препараты добавляют коферменты и субстраты.

Ферменты широко используются в различных областях практической деятельности человека как биологические катализаторы. Источниками ферментов могут быть животные, растения и микроорганизмы. К настоящему времени установлено наличие более двух тысяч ферментов, а несколько сотен из них получены как индивидуальные вещества.

OÑTÜSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 51 из 88	

Получение активных продуцентов. Мутанты в большинстве случаев ауксотрофны по ряду соединений, так как в них произошли определенные нарушения обмена веществ, вызвавшие гипертрофию некоторых функций клетки. Обычно активные штаммы, выявленные из естественных источников, подвергают действию мутагенов несколько раз, т. е. осуществляют ступенчатую селекцию.

В результате получают высокопродуктивные штаммы. Часто эффективно комбинированное воздействие мутагенов химической и физической природы. Так, применение этиленмина и ультрафиолетового излучения в сочетании со ступенчатым отбором позволило получить очень активные штаммы *Asp. awamoti*, используемые как продуценты амилолитического, протеолитического и других ферментных комплексов.

Селекция производственно ценных штаммов ведется и в условиях производства.

Непременным условием правильно поставленного промышленного процесса являются такие мероприятия по сохранению микроорганизмов- продуцентов.

Существует ряд методов хранения производственно ценных штаммов, обеспечивающих их высокую биохимическую активность.

В музеях живых культур при заводских лабораториях культуры периодически пересеиваются. Однако посеивы через короткие промежутки времени могут снизить активность микроорганизмов, поэтому после развития культуры на плотной среде ее заливают стерильным вазелиновым маслом. Во многих случаях лучшим способом хранения является лиофилизация культур.

Питательные среды для культивирования микроорганизмов.

Питательные среды по своему назначению разделяются на три основные группы:

среды для поддержания штаммов-продуцентов в лаборатории и в музее,

среды для получения посевного материала и

среды, употребляемые в больших объемах в основном процессе производства.

Если первая группа сред подбирается исходя из физиологических потребностей микроорганизмов, то две последние группы должны удовлетворять и требованиям производства, т. е. они должны быть достаточно дешевыми. Состав сред, обеспечивающих накопление того или иного фермента, может значительно отличаться от состава сред, применяемых для выделения и поддержания культуры продуцентов.

При приготовлении сред для промышленного выращивания продуцентов ферментов может быть использована биомасса других микроорганизмов, подвергнутая гидролизу или экстракции.

Разработан способ экстрагирования биомассы грибов-продуцентов пектиназы и последующего введения экстрактов в питательную среду, позволяющий полностью утилизировать всю получаемую биомассу, сократив на 9% количество экстракта свекловичного жома и интенсифицировав биосинтез пектолитических ферментов в 2,4 раза.

Разработана также замкнутая технологическая схема получения пектолитических ферментов, позволяющая полностью утилизировать отходы микробиологического производства, путем возврата их в технологический процесс.

Выделение и стабилизация ферментов.

Выбор метода выделения и очистки ферментов микроорганизмов различны и определяются в зависимости от локализации (в клетках фермент или в культуральной среде) и целями применения. Неочищенные ферментные препараты получают путем сушки и размельчения мицелия гриба вместе с твердым субстратом (отрубями, жомом и др.) или высушиванием продуцента вместе с культуральной жидкостью на распылительной сушилке.

Высушенные препараты размалываются в порошок и в таком виде используются. Удельная ферментная активность таких препаратов невелика, но они дешевле и достаточно устойчивы при хранении. Таким способом получают амилазы, протеазиназы.

ONTUSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 52 из 88	

Витамины, провитамины, коферменты.

Методом М. с. производят в основном витамин В₁₂, а частично и витамин В₂ и его коферментную форму — флавинадениндинуклеотид (ФАД), каротиноиды, эргостерин. Кроме того, развивается производство разных др. соединений этого типа (никотинамидные коферменты и др.). Витамин В₁₂ получают практически только путём М. с. Основными продуцентами при этом служат пропионовокислые бактерии, актиномицеты, а также комплекс метанобразующих бактерий, использующих отходы бродильной промышленности (послеспиртовые, ацетоно-бутиловые барды и др.) и применяемых в основном для получения кормового концентрата (высушенная среда с биомассой продуцента).

Ферменты, синтезируемые микроорганизмами, и создаваемые на их основе ферментные препараты приобрели большое значение в народном хозяйстве, особенно в пищевой промышленности. Продуцентами ферментов — протеаз, амилаз, фосфатаз, целлюлаз, пектиназ, глюкозооксидазы, липаз, каталазы — служат многие мицелиальные грибы, некоторые актиномицеты и бактерии.

В зависимости от локализации фермента подвергают обработке микробную массу или фильтрат, свободный от микробных клеток. Получение чистых ферментных препаратов связано со значительными технологическими трудностями.

Такие препараты обычно очень дороги; поэтому в промышленности используют комплексные препараты, содержащие, например, протеазы и липазы, протеазы и амилазы.

Причины нехватки витаминов могут быть:

а. Экзогенные:

- нерациональное питание, т.е. недостаточное потребление с пищей, Установлено, что в сравнении с серединой XX века содержание витаминов в продуктах питания в среднем снизилось примерно на 50%. Это связывают с

интенсивным земледелием и истощением почв, с селекцией овощей и фруктов в пользу повышения зеленой массы и красивого внешнего вида.

- гельминтозы, лямблиозы, дизентерия,
- дисбактериоз кишечника.

б. Эндогенные:

-нарушение всасывания (энтероколиты, гастроэнтериты различного происхождения). Например, пернициозная анемия Аддисон-Бирнера,

- заболевания печени и желчного пузыря (для жирорастворимых витаминов),
- повышенная потребность (беременность, лактация, физические нагрузки),
- генетические дефекты кофермент-образующих ферментов.

В России 89% населения испытывают дефицит витамина С даже летом, 43% – дефицит витамина В₁, 44% – витамина В₂, 68% – витамина В₆, 22% – витамина В₁₂.

У 39% женщин обнаружен дефицит фолиевой кислоты (одна из основных причин недоношенности и уродств будущих детей); 45% страдают от нехватки β-каротина (провитамина А), у 21% отсутствует витамин Е в достаточном количестве.

Некоторые витамины поступают в организм в виде **провитаминов**. В организме провитамины превращаются в активные формы, *например:*

каротиноиды превращаются в витамин А,

- **пищевой эргостерол или 7-дегидрохолестерол** под действием ультрафиолетовых лучей превращаются соответственно в эргокальциферол (D₂) и холекальциферол (витамин D₃).

Вещества, которые замещают витаминные коферменты в биохимических реакциях, или препятствуют синтезу кофермента или еще каким-либо образом препятствуют действию витамина, получили название **антивитамины**, *например:*

OÑTÜSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 53 из 88

- **дикумарол (антивитамин К)** – препятствует образованию активной формы витамина К, что блокирует синтез факторов свертывания крови,

- **изониазид (антивитамин РР)** – образует "неправильные" коферменты, аналогичные НАД и НАДФ, что блокирует протекание окислительно-восстановительных реакций,

- **птеридины (антифолаты)** – вытесняют витамин В9 из реакций и препятствуют синтезу пуриновых и пиримидиновых оснований и, как следствие, нуклеиновых кислот,

- **авидин (антивитамин Н)** – связывается с витамином в кишечнике и не допускает его всасывания в кровь.

4. Иллюстративный материал: презентация.

5. Литература: см.приложение 1.

6. Контрольные вопросы:

1. Биотехнология рекомбинантных белков.
2. Рекомбинантные белки, принадлежащие к различным группам физиологически активных веществ.
3. Спектр биотехнологического производства рекомбинантных белков.
4. Требования к микроорганизмам в производстве рекомбинантных белков.
5. Правила безопасности в работе с рекомбинантными белками.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ		SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 54 из 88	

ЛЕКЦИЯ № 7

1. Тема: Перспективы производства ферментов, витаминов и коферментов.

2. Цель: обучающийся должен усвоить задачи и основные направления производства ферментов, витаминов и коферментов.

3. Тезисы лекции:

1. Перспективы производства ферментов, витаминов и коферментов
2. Биотехнология получения ферментов

Источники получения ферментных препаратов

Ферменты присущи всем живым объектам и находятся практически во всех растениях, животных и микроорганизмах. Однако процесс биосинтеза ферментов в организме связан с обеспечением метаболизма клеток, и количество синтезируемых ферментов строго определяется жизненной потребностью организма; такие объекты не могут служить источником получения ферментных препаратов.

Для этого пригодны только микроорганизмы, некоторые растения или отдельные органы растений и животных, способные накапливать значительное количество ферментов.

Растительное сырье. Источником ферментов может быть пророщенное зерно различных злаков (солод). Оно может либо использоваться непосредственно как технический ферментный препарат, либо служить исходным материалом для получения очищенных ферментных препаратов.

В тропических и субтропических странах в качестве сырья для промышленного производства протеиназ используют латекс дынного дерева, латекс растений, относящихся к виду фикусовых, например, листья, побеги инжира, сок зеленой массы ананаса и др.

Органы, и ткани животных. На всех мясоперерабатывающих комбинатах собирают сырье, содержащее ферменты, консервируют его и используют для получения ферментных препаратов. Таким сырьем являются поджелудочная железа, слизистые оболочки желудков и тонких кишок свиней, сычуги крупного рогатого скота, сычужки молочных телят и ягнят, семенники половозрелых животных.

Поджелудочная железасодержит большое количество разнообразных ферментов: химотрипсин, коллагеназу, эластазу, трипсин, амилазу, липазу и др.

Слизистая оболочка желудков свиней и сычугов крупного рогатого скота служит источником пепсина и липазы. Из сычужков молочных телят и ягнят получают реннин (сычужный фермент). Семенники половозрелого скота содержат фермент гиалуронидазу.

Микроорганизмы. В специально созданных условиях микроорганизмы способны синтезировать огромное количество разнообразных ферментов. Они неприхотливы к составу питательной среды, легко переключаются с синтеза одного фермента на другой и имеют сравнительно короткий цикл роста (16-100 ч).

Для промышленного получения ферментных препаратов используют как природные штаммы микроорганизмов, выделенные из естественных объектов, так и мутантные штаммы.

Продуцентами ферментов могут быть различные микроорганизмы: бактерии, грибы, дрожжи, актиномицеты. Микроорганизмы могут синтезировать одновременно целый комплекс ферментов, но есть и такие, особенно среди мутантных штаммов, которые являются моноферментными и образуют в больших количествах только один фермент.

Классификация и номенклатура ферментов и ферментных препаратов.

По современной классификации все ферменты делятся на шесть основных классов по типу катализируемой реакции:

OŃTŪSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «OŃTŪSTIK Qazaqstan medicina akademiasy» AҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 55 из 88	

- 1) оксидоредуктазы;
- 2) трансферазы;
- 3) гидролазы;
- 4) лиазы;
- 5) изомеразы и
- 6) лигазы (синтетазы).

Большинство промышленно важных ферментов, потребность в которых определяется десятками тысяч тонн, относятся к третьему классу - гидролазам.

подавляющее количество препаратов, выпускаемых различными фирмами мира, являются комплексными, содержащими помимо основного фермента еще значительное количество сопутствующих ферментов и белков.

Поэтому в технологии ферментов препараты чаще классифицируют по основному компоненту в смеси ферментов, присутствующих в данном препарате: амилолитические, протеолитические, липолитические и т. д.

Область применения и источники ферментов

Производство ферментных препаратов занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии. Постоянно увеличивается объем их выпуска и расширяется сфера применения.

Ферменты являются высокоактивными нетоксичными биокатализаторами белкового происхождения.

Их преимуществом перед химическими катализаторами является действие при нормальном давлении, температуре от 20 до 70 °С, рН от 4 до 9. Они имеют высокую субстратную специфичность, что позволяет в сложной смеси субстратов направленно воздействовать только на определенные соединения.

Согласно принятой классификации и номенклатуре сейчас идентифицировано около 2000 ферментов. Промышленно выпускается около 250 наименований, причем 99 % общей суммы реализации ферментных препаратов приходится только на 18 ферментов.

Наибольший удельный вес среди выпускаемых препаратов занимают протеиназы, широко используемые в синтетических моющих средствах, и амилазы для переработки крахмала.

Эти два вида препаратов составляют 60% общего объема выпуска ферментных препаратов за рубежом.

Другими крупными отраслями – потребителями ферментов, являются производство вин и соков 10 %;

производство спирта 8 %;

сыроделие 5 %;

хлебопечение 5 %;

пивоварение 6 %;

прочие отрасли 6 %.

Особое место в общем объеме производства ферментов занимают высокоочищенные ферментные препараты. Их доля в общем объеме очень мала, так как технология сложна, требует больших материальных затрат и времени. Эти препараты очень важны для медицины, аналитических целей и научных исследований.

Ферменты присущи всем живым существам, однако для их выделения используют только те природные объекты, в которых содержание используемого фермента составляет не менее 1 %

Источниками ферментов могут быть:

проросшее зерно различных злаков (солод) – для получения амилаз, латекс фикусовых, дынного дерева – для получения протеиназ;

отдельные ткани и органы животных (поджелудочная железа, слизистые оболочки

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 56 из 88	

желудков и тонких кишок, сырный сычуг крупного рогатого скота);

микроорганизмы.

В специфических условиях микроорганизмы способны синтезировать огромное количество ферментов. Они легко переключаются с синтеза одного фермента на другой, имеют короткий цикл роста (от 16 до 100 ч). Для промышленного получения ферментов используют как естественные штаммы, так и полученные с помощью мутагенеза, селекции и индукции биосинтеза.

Ферменты способны синтезировать бактерии, грибы, дрожжи, актиномицеты; микроорганизмы могут быть моно- или полиферментами

Выбор штамма и условий культивирования

Целесообразность применения микроорганизмов для производства ферментов заключается в следующем:

- генетическими манипуляциями удаётся в тысячу и более раз увеличить уровень катаболитных и в несколько сот раз уровень биосинтетических ферментов;
- энергетически оправдано выращивание микробных клеток в больших масштабах в связи с применением недорогих сред и быстрого роста микроорганизмов;
- огромное разнообразие реакций, к которым способны микроорганизмы. Это особенно касается вторичного метаболизма;
- микроорганизмы служат источником не только таких ферментов, которые встречаются у животных и растений, но и ряда уникальных ферментов, нигде более не обнаруженных. Например, целлюлоза, танназа, гидрогеназа и др.
- способность микроорганизмов адаптироваться к различным окружающим условиям, что позволяет переносить культуру на производство, где она растёт на дешёвых субстратах.
- Промышленное производство и применение ферментов основано на двух важных факторах:
- во-первых, ферменты образуются в живых клетках;
- во-вторых, они могут проявлять свое специфическое действие в среде независимо от живых клеток.
- микроорганизмы служат источником не только таких ферментов, которые встречаются у животных и растений, но и ряда уникальных ферментов, нигде более не обнаруженных. Например, целлюлоза, танназа, гидрогеназа и др.
- способность микроорганизмов адаптироваться к различным окружающим условиям, что позволяет переносить культуру на производство, где она растёт на дешёвых субстратах.

Промышленное производство и применение ферментов основано на двух важных факторах:

- во-первых, ферменты образуются в живых клетках;
- во-вторых, они могут проявлять свое специфическое действие в среде независимо от живых клеток.

При первоначальном выделении штамма исходят из того, что микроорганизмы адаптируются к утилизации субстрата, находящегося в изобилии в местах их обитания, и, следовательно, образуют ферменты, реагирующие с этим субстратом.

Поэтому продуценты целлюлаз и лигнолитических ферментов выделяются из лесных почв, продуценты пектиназ – из фруктов и растений, деструкторы мочевой кислоты – из птичьего загона и т.д.

Ферменты близкородственных штаммов имеют сходные свойства, а у дальнеродственных – могут сильно отличаться.

Первая ступень производства ферментов состоит в селекции организма, образующего желаемый фермент в наибольшем количестве.

При первоначальном выделении штамма исходят из того, что микроорганизмы адаптируются к утилизации субстрата, находящегося в изобилии в местах их обитания, и, следовательно, образуют ферменты, реагирующие с этим субстратом.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 57 из 88	

Поэтому продуценты целлюлаз и лигнолитических ферментов выделяются из лесных почв, продуценты пектиназ – из фруктов и растений, деструкторы мочевой кислоты – из птичьего загона и т.д.

Ферменты близкородственных штаммов имеют сходные свойства, а у дальнеродственных – могут сильно отличаться.

Первая ступень производства ферментов состоит в селекции организма, образующего желаемый фермент в наибольшем количестве.

При этом учитывают следующие общие требования к продуценту:

- желательное образование внеклеточных ферментов, так как их легче выделить;
- высокий выход фермента за короткое время;
- очистка фермента от культуральной жидкости должна быть легкой;
- штаммы не должны продуцировать антибиотики, токсичные вещества и не должны быть родственниками штаммов, образующих токсины. Чтобы вызвать сверхсинтез ферментов используют ряд методов, связанных с изменением окружающих условий роста и ведущих к изменению генетики организма.

Технология культивирования микроорганизмов – продуцентов ферментов и выделение ферментов

Технологический процесс можно разбить на три стадии:

- получение посевного материала;
- получение производственной культуры методами поверхностного или глубинного культивирования;
- выделение из готовой производственной культуры технических или очищенных ферментных препаратов.

Поверхностный метод состоит в культивировании микроорганизмов на поверхности увлажненных стерилизованных отрубей, размещенных в кюветах. Инкубацию ведут в специальном термостатируемом цехе при постоянном контроле в нем температуры, влажности и подачи воздуха.

Глубинный метод более экономичен. Для его реализации применяются ферментеры из нержавеющей стали, снабженные устройствами для перемешивания и подачи в жидкую питательную среду стерильного воздуха.

Наиболее прогрессивен проточный метод, который обеспечивает непрерывную подачу в ферментер питательной среды и посевного материала и непрерывный отбор продуктов жизнедеятельности и микробиальной массы. Достоинством метода является возможность длительное время поддерживать в автоматическом режиме рост культуры микроорганизмов (до 200 суток).

Выделение и очистка фермента из культуры микроорганизмов – достаточно трудоемкая и дорогостоящая процедура, поэтому, если фермент можно использовать в виде неочищенного препарата, его не очищают.

В промышленности широко используют коммерческие препараты, чистота которых составляет всего 0,1 % (то есть 99,9 % составляют примеси). К таким отраслям относят спиртовую, кожевенную, текстильную промышленность, сельское хозяйство, производство бытовой химии.

Неочищенные препараты получают в мягком режиме высушивания культуры микроорганизмов вместе с остатками питательной среды.

Такие препараты получают или из экстракта культуры продуцента, выращенного поверхностным способом, или из фильтрата культуральной жидкости продуцента, выращенного глубинным способом

Неочищенные препараты получают в мягком режиме высушивания культуры микроорганизмов вместе с остатками питательной среды.

Такие препараты получают или из экстракта культуры продуцента, выращенного поверхностным способом, или из фильтрата культуральной жидкости продуцента, выращенного

ONTUSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 58 из 88	

глубинным способом

Для большинства отраслей пищевой промышленности, научных исследований и медицины требуются очищенные ферментные препараты. Источником выделения фермента может быть биомасса микроорганизмов, экстракт или фильтрат культуральной жидкости.

Биомассу микроорганизмов необходимо тщательно измельчить, вплоть до разрушения субклеточных структур: лисозом, митохондрий, ядер и т.д.

Затем препараты очищают осаждением органическими растворителями, солями, после чего диализом, аффинной хроматографией, переосаждением, гель-фильтрацией, сорбцией, кристаллизацией и пр.

Так как ферменты имеют белковую природу, то особое значение придают соблюдению режимов, сохраняющих их активность при инактивации сопутствующих балластных белков. Очищенные ферменты хранят при низкой температуре (до минус 80 °С). Для стабилизации ферментов в их препараты добавляют коферменты и субстраты.

Ферменты широко используются в различных областях практической деятельности человека как биологические катализаторы. Источниками ферментов могут быть животные, растения и микроорганизмы. К настоящему времени установлено наличие более двух тысяч ферментов, а несколько сотен из них получены как индивидуальные вещества.

Получение активных продуцентов. Мутанты в большинстве случаев ауксотрофны по ряду соединений, так как в них произошли определенные нарушения обмена веществ, вызвавшие гипертрофию некоторых функций клетки. Обычно активные штаммы, выявленные из естественных источников, подвергают действию мутагенов несколько раз, т. е. осуществляют ступенчатую селекцию.

В результате получают высокопродуктивные штаммы. Часто эффективно комбинированное воздействие мутагенов химической и физической природы. Так, применение этиленмина и ультрафиолетового излучения в сочетании со ступенчатым отбором позволило получить очень активные штаммы *Asp. awamoti*, используемые как продуценты амилолитического, протеолитического и других ферментных комплексов.

Селекция производственно ценных штаммов ведется и в условиях производства.

Непременным условием правильно поставленного промышленного процесса являются такие мероприятия по сохранению микроорганизмов- продуцентов.

Существует ряд методов хранения производственно ценных штаммов, обеспечивающих их высокую биохимическую активность.

В музеях живых культур при заводских лабораториях культуры периодически пересеиваются. Однако посевы через короткие промежутки времени могут снизить активность микроорганизмов, поэтому после развития культуры на плотной среде ее заливают стерильным вазелиновым маслом. Во многих случаях лучшим способом хранения является лиофилизация культур.

Питательные среды для культивирования микроорганизмов.

Питательные среды по своему назначению разделяются на три основные группы:

- среды для поддержания штаммов-продуцентов в лаборатории и в музее,
- среды для получения посевного материала и
- среды, употребляемые в больших объемах в основном процессе производства.

Если первая группа сред подбирается исходя из физиологических потребностей микроорганизмов, то две последние группы должны удовлетворять и требованиям производства, т. е. они должны быть достаточно дешевыми. Состав сред, обеспечивающих накопление того или иного фермента, может значительно отличаться от состава сред, применяемых для выделения и поддержания культуры продуцентов.

При приготовлении сред для промышленного выращивания продуцентов ферментов может быть использована биомасса других микроорганизмов, подвергнутая гидролизу или экстракции.

OŃTŪSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «OŃTŪSTIK Qazaqstan medicina akademiasy» AҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 59 из 88	

Разработан способ экстрагирования биомассы грибов-продуцентов пектиназы и последующего введения экстрактов в питательную среду, позволяющий полностью утилизировать всю получаемую биомассу, сократив на 9% количество экстракта свекловичного жома и интенсифицировав биосинтез пектолитических ферментов в 2,4 раза.

Разработана также замкнутая технологическая схема получения пектолитических ферментов, позволяющая полностью утилизировать отходы микробиологического производства, путем возврата их в технологический процесс.

Выделение и стабилизация ферментов.

Выбор метода выделения и очистки ферментов микроорганизмов различны и определяются в зависимости от локализации (в клетках фермент или в культуральной среде) и целями применения. Неочищенные ферментные препараты получают путем сушки и размельчения мицелия гриба вместе с твердым субстратом (отрубями, жомом и др.) или высушиванием продуцента вместе с культуральной жидкостью на распылительной сушилке.

Высушенные препараты размалываются в порошок и в таком виде используются. Удельная ферментная активность таких препаратов невелика, но они дешевле и достаточно устойчивы при хранении. Таким способом получают амилазы, протеиназы.

Ферменты, синтезируемые микроорганизмами, и создаваемые на их основе ферментные препараты приобрели большое значение в народном хозяйстве, особенно в пищевой промышленности. Продуцентами ферментов — протеаз, амилаз, фосфатаз, целлюлаз, пектиназ, глюкозооксидазы, липаз, каталазы — служат многие мицелиальные грибы, некоторые актиномицеты и бактерии.

В зависимости от локализации фермента подвергают обработке микробную массу или фильтрат, свободный от микробных клеток. Получение чистых ферментных препаратов связано со значительными технологическими трудностями.

Такие препараты обычно очень дороги; поэтому в промышленности используют комплексные препараты, содержащие, например, протеазы и липазы, протеазы и амилазы.

Причины нехватки витаминов могут быть:

а. Экзогенные:

- нерациональное питание, т.е. недостаточное потребление с пищей, Установлено, что в сравнении с серединой XX века содержание витаминов в продуктах питания в среднем снизилось примерно на 50%. Это связывают с

интенсивным земледелием и истощением почв, с селекцией овощей и фруктов в пользу повышения зеленой массы и красивого внешнего вида.

- гельминтозы, лямблиозы, дизентерия,

- дисбактериоз кишечника.

б. Эндогенные:

-нарушение всасывания (энтероколиты, гастроэнтериты различного происхождения).

Например, пернициозная анемия Аддисон-Бирнера,

- заболевания печени и желчного пузыря (для жирорастворимых витаминов),

-повышенная потребность (беременность, лактация, физические нагрузки),

- генетические дефекты кофермент-образующих ферментов.

В России 89% населения испытывают дефицит витамина С даже летом, 43% – дефицит витамина В1, 44% – витамина В2, 68% – витамина В6, 22% – витамина В12.

У 39% женщин обнаружен дефицит фолиевой кислоты (одна из основных причин недоношенности и уродств будущих детей); 45% страдают от нехватки β-каротина (провитамина А), у 21% отсутствует витамин Е в достаточном количестве.

Некоторые витамины поступают в организм в виде провитаминов. В организме провитамины превращаются в активные формы, *например*:

каротиноиды превращаются в витамин А,

- пищевой эргостерол или 7-дегидрохолестерол под действием ультрафиолетовых

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 60 из 88	

лучей превращаются соответственно в эргокальциферол (D2) и холекальциферол (витамин D3).

Вещества, которые замещают витаминные коферменты в биохимических реакциях, или препятствуют синтезу кофермента или еще каким-либо образом препятствуют действию витамина, получили название *антивитамины*, *например*:

- дикумарол (антивитамин К) – препятствует образованию активной формы витамина К, что блокирует синтез факторов свертывания крови,
- изониазид (антивитамин РР) – образует "неправильные" коферменты, аналогичные НАД и НАДФ, что блокирует протекание окислительно-восстановительных реакций,
- птеридины (антифолаты) – вытесняют витамин В9 из реакций и препятствуют синтезу пуриновых и пиримидиновых оснований и, как следствие, нуклеиновых кислот,
- авидин (антивитамин Н) – связывается с витамином в кишечнике и не допускает его всасывания в кровь.

4. Иллюстративный материал: презентация.

5. Литература: см.приложение 1.

6. Контрольные вопросы:

1. Ферменты, используемые как лекарственные средства.
2. Решение проблемы применения ферментов для лечебных целей.
3. Неспецифическое использование специфических свойств отдельных ферментов для устранения патологического процесса.
4. Белковая инженерия ферментов для фармацевтики.

OÑTÚSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 61 из 88	

ЛЕКЦИЯ № 8

1. Тема: Соматические гибриды клеток высших организмов. Механизм иммунного ответа на конкретный антиген. Получение свойства поликлональных и моноклональных антител. Понятие об иммуно-биотехнологии. Вакцины. Гибридная биотехнология.

2. Цель: обучающийся должен усвоить задачи и получение и свойства поликлональных и моноклональных антител.

3. Тезисы лекции:

Иммунобиотехнология лекарственных веществ как один из важнейших разделов биофармации. Иммунобиологическая продукция иммунной системой для защиты от воздействия внешних неблагоприятных факторов, биологически активных агентов. В качестве таких агентов выступают клетки микроорганизмов, вирусы, белки, нуклеиновые кислоты, антибиотики, пестициды, объединенные под общим названием антигенов. Понятие «антиген» является общим, так как обозначает определенную химическую структуру, против которой могут быть получены антитела.

Антигены внешней среды поступают в организм человека с воздухом, водой, пищей, через слизистые и кожные покровы.

Иммунный ответ – сложный процесс межклеточного взаимодействия лимфоидных клеток разных типов с участием специфических гормонов, в результате чего так называемые В-клетки активно синтезируют специфические антитела против данного антигена.

Часть антигенов может попадать человеку в виде вакцин и иммуномодулирующих лекарственных средств (агентов).

Иммуномодуляторы либо усиливают, либо ослабляют иммунный ответ организма.

В группу иммуномодуляторов выделяют препараты

В группу иммуномодуляторов выделяют препараты:

животного

микробного

дрожжевого

синтетического происхождения

обладающие специфической способностью стимулировать иммунные процессы и активировать иммунокомпетентные клетки (Т- и В-лимфоциты) и дополнительные факторы иммунитета (макрофаги и др.).

Усиление общей сопротивляемости организма может в той или другой степени происходить под влиянием ряда стимулирующих и тонизирующих средств (кофеина, элеутерококка и др.), витаминов, дибазола, производных пиридина - метилурацила, пентоксила (ускоряют регенерацию, интенсифицируют лейкопоз), дериватов нуклеиновых кислот и биогенных препаратов, получивших общее название - *адаптогены*.

Способность этих препаратов повышать резистентность организма, ускорять процессы регенерации послужила основанием для широкого применения в комплексной терапии вялотекущих регенерационных процессов, инфекционных, инфекционно-воспалительных и других заболеваний.

Важнейшую роль в функционировании клеточного и гуморального иммунитета играет вилочковая железа (тимус). В ней происходят дифференциация стволовых клеток в лимфоциты, а также секреция специфических веществ (гормонов), оказывающих влияние на развитие и созревание определенных клеток лимфоидной ткани. Из вилочковой железы выделен ряд гормонов полипептидной (тимозин, гомеостатический тимусный гормон, тимопозтин I и II, тимусный гуморальный фактор) и стероидной (тимостерин) структуры.

ONTUSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 62 из 88	

Получен ряд экстрактивных препаратов (тималин, тактивин, тимоптин, вилозен), применяющихся в качестве иммуностимуляторов; все они содержат вышеперечисленные гормоны вилочковой железы (в том числе альфа-тимозин) и в значительной мере близки между собой по действию.

Из другого органа иммунной системы - костного мозга - получен препарат В-активин. К синтетическим иммуностимуляторам относится левамизол, ряд пептидных иммуностимуляторов (тимоген, иммунофан и др.).

Иммуномодуляторы делятся на:

- иммуномодуляторы микробные
- иммуномодуляторы тимические
- иммуномодуляторы костно-мозговые
- цитокины, нуклеиновые кислоты и химически чистые

Иммунокорректоры микробные

Иммунокорректоры микробного происхождения условно можно разделить на три поколения.

Иммуномодулятором, разрешенным в начале 1950 гг. в США и странах Европы к медицинскому применению в качестве иммуностимулятора, была вакцина БЦЖ, обладающая выраженной способностью усиливать факторы как врожденного, так и приобретенного иммунитета.

Иммунокорректоры микробные

К *иммуномодуляторам первого поколения* можно отнести и такие лекарственные средства, как пирогенал и продигозан, представляющие собой полисахариды бактериального происхождения.

К *иммунокорректорам второго поколения* относятся Бронхомунал, ИРС-19, Имудон, Бронхо-Ваксом, Рибомунил, Ликопид.

Иммуномодуляторы *эндогенного происхождения* можно условно разделить на *иммунорегуляторные пептиды и цитокины*.

К иммунокорректорам, содержащим:

- *комплекс тимических пептидов*, относятся Тималин, Тимоптин и др.,
- *экстракты тимуса* - Тимостимулин и Вилозен.

Тимоген - относится к иммуномодуляторам 2 поколения и представляет собой аминокислоты - L-глутамил-L-триптофан.

Миелопид состоит из аминокислот, его состав полностью расшифрован, что послужило предпосылкой для разработки новых синтетических иммуномодуляторов костно-мозгового происхождения:

- Серамил,
- Бивален

К высокомолекулярным, химически чистым иммунокорректорам, полученным с помощью направленного химического синтеза, относится иммуномодулятор Полиоксидоний

Полиоксидоний обладает фармакологическим действием широкого спектра на организм:

- иммуномодулирующим,
- детоксицирующим,
- Антиоксидантным
- мембранопротекторным.

Детоксицирующие свойства Полиоксидония проявляются в его способности понижать в крови концентрацию токсических веществ, например уровень липополисахарида энтеробактерий, у больных с ожоговой болезнью.

У пациентов с острым панкреонекрозом Полиоксидоний существенно снижает уровень малонового диальдегида и диеновых кислот. Детоксицирующие свойства Полиоксидония связаны с его высокой молекулярной массой и наличием на поверхности молекулы большого

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 63 из 88	

количества различных активных групп. Поэтому Полиоксидоний интенсивно адсорбирует циркулирующие в крови растворимые токсические субстанции и микрочастицы. Формирование иммунного ответа происходит под контролем ряда иммунорегуляторных молекул.

Иммуномодуляторы достаточно условно разделяют на :

- *иммуностимуляторы* - вещества, повышающие иммунитет
- *иммуносупрессанты (иммуносупрессоры)*, понижающие иммунитет

Эта неопределенность вызвана тем, что в зависимости от характера заболевания, состояния больного и других условий иммуносупрессанты могут стимулировать, а иммуностимуляторы - угнетать иммунные реакции организма. Способностью стимулировать или подавлять иммунные реакции обладают не только иммуномодуляторы, но и многие биологически активные вещества и комплексы, в том числе вырабатываемые самим организмом.

Полиоксидоний обладает фармакологическим действием широкого спектра на организм:

- иммуномодулирующим,
- детоксицирующим,
- Антиоксидантным
- мембранопротекторным.

Детоксицирующие свойства Полиоксидония проявляются в его способности понижать в крови концентрацию токсических веществ, например уровень липополисахарида энтеробактерий, у больных с ожоговой болезнью.

У пациентов с острым панкреонекрозом Полиоксидоний существенно снижает уровень малонового диальдегида и диеновых кислот. Детоксицирующие свойства Полиоксидония связаны с его высокой молекулярной массой и наличием на поверхности молекулы большого количества различных активных групп. Поэтому Полиоксидоний интенсивно адсорбирует циркулирующие в крови растворимые токсические субстанции и микрочастицы. Формирование иммунного ответа происходит под контролем ряда иммунорегуляторных молекул.

Иммуносупрессоры

В качестве иммуносупрессоров используют:

- азатиоприн,
- препараты глюкокортикоидов (преднизон, преднизолон и др.),
- многие препараты из группы противоопухолевых средств (Противоопухолевые средства) (метотрексат, меркаптопурин, циклофосфан, миелосан, хлорбутин, розевин и др.),
- некоторые Антибиотики (адриамицин, циклоспорин А и др.), обладающие выраженной иммунодепрессивной активностью.

Иммуностимуляторы

К иммуностимуляторам относят:

- синтетический препарат левамизол, препараты, получаемые из вилочковой железы (тималин, тактивин),
- препараты, содержащие липополисахариды микробного происхождения (например, пирогенал, продигиозан, вакцина БЦЖ). Иммуностимулирующей активностью обладают Интерфероны.

Иммуносупрессоры

Иммуносупрессоры угнетают иммунные реакции организма главным образом за счет подавления пролиферации иммунокомпетентных клеток, и прежде всего лимфоцитов. Это обусловлено тем, что препараты данной подгруппы И. с. оказывают цитостатическое действие, т.е. обладают способностью подавлять деление клеток (особенно быстро пролиферирующих и в т.ч. лимфоцитов) на отдельных или всех фазах клеточного цикла развития.

ONTUSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 64 из 88	

В зависимости от особенностей действия на клеточный цикл развития среди иммуносупрессоров различают:

- фазоспецифичные,
- циклоспецифичные
- циклонеспецифичные препараты.

Фазоспецифичные препараты

Фазоспецифичные (S-фазоспецифичные) препараты (азатиоприн, меркаптопурин, метотрексат и др.) блокируют деление лимфоцитов и других клеток в фазе синтеза ДНК. Эти препараты наиболее эффективны в период максимальной пролиферации иммунокомпетентных клеток, т.е. на 1—2-й день после иммунизации.

Молекулярные механизмы действия таких препаратов заключаются в нарушении синтеза нуклеотидов, угнетении полимеризации РНК и ДНК, в образовании «дефектных» (нестабильных) молекул ДНК.

Циклоспецифичные препараты

Циклоспецифичные препараты (миелосан, адриамицин и др.) угнетают пролиферацию лимфоцитов на всех фазах клеточного цикла. Наибольшее подавление иммунных реакций наблюдается при введении этих препаратов за 1—2 дня до иммунизации.

Молекулярные механизмы их действия заключаются в алкилировании (присоединении углеродородных радикалов) различных метаболитов клетки, особенно ДНК, а также в интеркаляции (встраивании) в ДНК и предупреждении активации генома клетки, необходимой для ее пролиферации.

Циклоспорин А

Иммунодепрессивное действие циклоспорина А обусловлено способностью этого препарата блокировать активацию иммунокомпетентных клеток под влиянием антигена, что препятствует их пролиферации. Отчасти это может быть связано с тем, что циклоспорин А угнетает синтез Т-хелперами интерлейкина-2 и препятствует экспрессии чувствительных к интерлейкину-2 рецепторов на мембранах эффекторных лимфоцитов (Т-киллеров, естественных киллеров, В-лимфоцитов). Кроме циклоспорина А продукцию интерлейкинов нарушают препараты глюкокортикоидов, циклофосфан и другие иммуносупрессоры.

Иммуносупрессоры применяют с целью подавления иммунных реакций организма при трансплантации органов и тканей (пересадке аллогенного сердца, почек и др.), для предупреждения развития реакции «трансплантат против хозяина» при пересадке аллогенного костного мозга и лечения аутоиммунных заболеваний (ревматоидного артрита, аутоиммунных гемолитических анемий, системной красной волчанки, аутоиммунного тиреоидита и др.).

Тактика клинического применения иммуносупрессоров сводится к длительному комбинированному назначению нескольких препаратов. Критериями эффективности лечения являются клинические данные и результаты лабораторных исследований иммунного статуса больных (содержание иммуноглобулинов, общее количество Т- и В-лимфоцитов, реакция бластотрансформации и др.).

Наиболее типичным проявлением побочного действия большинства иммуносупрессивных препаратов являются осложнения, обусловленные поражением быстро пролиферирующих тканей, например эрозии слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, угнетение костномозгового кроветворения.

Иммуностимуляторы

Характерная особенность иммуностимуляторов заключается в том, что их действие проявляется только на фоне угнетения иммунной системы. Нормальный иммунологический потенциал организма они не повышают.

Основной эффект иммуностимуляторов состоит в увеличении числа Т- и В-

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 65 из 88	

лимфоцитов, а также числа клеток моноцитарно-макрофагального звена иммунитета. Кроме того, повышается функциональная активность этих клеток (увеличивается экспрессия чувствительных к интерлейкинам рецепторов на мембранах, усиливается синтез РНК и белка). Молекулярные механизмы действия большинства иммуностимуляторов неизвестны.

Установлено лишь, что под влиянием некоторых иммуностимулирующих препаратов (тималина, тактивина) повышается синтез интерлейкина-1, интерлейкина-2 и интерлейкина-4, при участии которых происходит процесс кооперации клеток иммунной системы. Некоторые иммуностимулирующие препараты (пирогенал, продигозан, вакцина БЦЖ), по видимому, оказывают опосредованное неспецифическое влияние на иммунитет.

Применяют иммуностимуляторы главным образом при первичных (врожденных) и вторичных (приобретенных) иммунодефицитных состояниях, в т.ч. при злокачественных новообразованиях, лучевой болезни, хронических, вялотекущих инфекциях и др. Побочные эффекты иммуностимуляторов имеют специфический для отдельных препаратов характер.

Моноклональные антитела

Моноклональные антитела получили такое название, потому что они вырабатываются одним клоном клеток. Такое явление можно наблюдать, если выращивать В-лимфоциты в культуре. Лимфоциты могут быть активированы на выработку антител к специфической мишени, или антигену, когда он связывается с их поверхностью. Связывание не только побуждает лимфоцит производить соответствующие антитела, но и индуцирует деление клетки, что приводит к образованию ее клонов. В культуре часть клеток, активированных антигеном, делятся и формируют массы, которые можно разглядеть невооруженным взглядом. Это клоны, вырабатывающие один тип антител. Деление одного типа лимфоцитов, которое наблюдается в культуре клеток, происходит и в организме.

Моноклональные антитела (МАТ) секретируются иммунными клетками, происходящими от единственной антителообразующей клетки. Поэтому МАТ направлены только против определенного эпитопа иммуногенного вещества, так называемой "антигенной детерминанты". Для получения МАТ изолируют лимфоциты из селезенки иммунизированной мыши и производят их слияние с опухолевыми клетками мыши (клетками миеломы). Это необходимо, так как жизнеспособность антителопродуцирующих лимфоцитов в культуре ограничена лишь несколькими неделями. При слиянии с опухолевой клеткой возникают гибридные клетки, так называемые гибридомы, которые являются потенциально бессмертными.

Слияние клеток является редким событием, частота которого повышается в присутствии полиэтиленгликоля [ПЭГ (PEG)]. Отбор продуктивных гибридных клеток проводится при длительной инкубации первичной культуры в ГАТ-среде (НАТ-среде), содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин. Аминоптерин, аналог дигидрофолиевой кислоты, конкурентно ингибирует дигидрофолат-редуктазу и тем самым биосинтез дТМФ. Поскольку дТМФ существенно необходим для синтеза ДНК, миеломные клетки не могут выживать в присутствии аминоптерина. С другой стороны, клетки селезенки могут преодолевать действие ингибитора, используя для синтеза ДНК гипоксантин и тимидин, однако и они существуют в течение ограниченного времени. Только гибридома выживает в виде культуры в среде ГАТ, так как эти клетки обладают одновременно бессмертием миеломных клеток и способностью клеток селезенки приспособляться к аминоптерину.

В действительности продуцировать антитела способны только единичные гибридные клетки. Такие клетки необходимо выделить и размножить клонированием. После тестирования клонов на способность образовывать антитела отбираются положительные культуры, которые снова клонируются и подвергаются последующей селекции. В результате получают гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела. Производство моноклональных антител этими клетками осуществляют *in vitro* в биореакторе или *in vivo* в асцитной жидкости мыши.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 66 из 88	

Получение моноклональных антител

Получение антител для нужд человека начинается с иммунизации животных. После нескольких инъекций антигена в присутствии стимуляторов иммунного ответа в сыворотке крови накапливаются специфические антитела. Антитела выделяют из сыворотки в виде g-глобулиновой фракции, осаждая сыворотку крови сульфатом аммония, спиртом, ПЭГ и другими веществами. Полученные антитела содержат много примесных белков. Высокоочищенные антитела выделяют с помощью ионообменной хроматографии.

Стандартные препараты получить довольно сложно, так как состав их зависит от вида животного, его индивидуальных особенностей, цикла иммунизации, других малоконтролируемых факторов. В то же время, для современного биохимического анализа очень важна специфичность, то есть способность выделить данное вещество в сложных многокомпонентных средах, таких, как сыворотки крови, сок растений, ферментная среда. Такое возможно при использовании иммунохимического метода, использующего антитела, взаимодействующие узко специфично по принципу "антиген - антитело". Для проведения такого анализа необходимы абсолютно идентичные антитела, синтез которых обычными способами не приемлим.

Решение проблемы было предложено в 1975 году английскими учеными Георгом Кёлером и Цезарем Мильштейном. Они разработали методику получения клеточных гибридов - гибридом. Гибридомы образуются в результате слияния лимфоцитов, взятых от иммунизированных животных, с клетками миеломы костного мозга, культивируемыми *in vitro*.

Животное иммунизируют, в ответ на введение антигена в организме мыши активизируются продуцирующие антитела В-лимфоциты. Эти клетки могут жить только в организме хозяина, при переводе на искусственную питательную среду они гибнут. Если слить иммунную клетку с опухолевой, образуются гибридные клетки, способные неограниченно долго жить в искусственных средах. Одновременно они сохраняют способность синтезировать антитела.

Гибридомы, синтезирующие определенные виды антител, отбирают на селективных ростовых средах. Затем их помещают в культуральную жидкость, в которой они размножаются и образуют много родственных клеток (клон). Такие клоны могут синтезировать антитела, получившие название моноклональных (МКА). МКА - антитела, однородные по структуре и специфичности, которые можно производить в неограниченных количествах.

Другой метод получения антител основан на инъекции полученной гибридомы в брюшную полость мышки. Там гибридома реплицируется и вызывает образование асцитной опухоли (скопления клеток, плавающих в жидкости, заполняющей брюшную полость). Асцитная жидкость, выделенная из этой мыши, представляет суспензию, содержащую антитела. Клетки и белки, не относящиеся к МКА, удаляются. Оставшийся материал, представленный преимущественно антителами, используют. Этот метод позволяет получать высококонцентрированные препараты антител. Но массовое производство требует одновременного использования нескольких тысяч мышей. Кроме того, получаемый материал требует доочистки. Это дорого и трудоемко, поэтому в настоящее время предпочтение отдается первому способу, с использованием культуры клеток.

Высокая специфичность антител в отношении антигена превращает их в мощный инструмент для идентификации различных веществ, будь то макромолекулы, клеточные фрагменты или целые клетки.

В генной инженерии моноклональные антитела успешно используются для выявления протективных эпитопов в составе рекомбинантных иммуногенов. Моноклональные антитела, фиксированные на водонерастворимом полимере, служат хорошим средством

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 67 из 88	

хроматографической очистки и выделения из смеси как вирусных антигенов, в том числе и поверхностного антигена вируса гепатита В, так и разнообразных биологически активных веществ, например, интерферонов. В той или иной степени Моноклональные антитела применялись в работах с вирусами гепатитов А, В, С и D.

Полностью процедура получения моноклональных антител включает в себя следующие этапы:

- иммунизация животных; подготовка клеток к слиянию;
- слияние;
- отбор индуцирующих специфические антитела клонов;
- клонирование и реклонирование;
- массовая наработка гибридных клеток;
- получение культуральной жидкости или асцита, содержащих антитела;
- выделение антител.

Сыворотки

Специфические иммунные сыворотки содержат антитела к определенным видам микроорганизмов.

Сывороточные препараты используют в следующих целях:

- для лечения, так как введение в организм антител обеспечивает быстрое обезвреживание микробов и их токсинов;
- для профилактики, чтобы быстро создать невосприимчивость у человека, контактировавшего с больным или инфицированным материалом;
- микроорганизма выделенного от больного, что позволяет установить вид (тип) микроорганизма.

Введение сыворотки в организм человека создает пассивный иммунитет.

Различают сыворотки антитоксические, которые получают путем иммунизации животных анатоксинами или токсинами микробов, и антимикробные, домученные при многократной иммунизации животных бактериями и эндотоксинами.

Наиболее эффективны антитоксические сыворотки, которые быстро обезвреживают экзотоксины в организме больного. Их применяют для лечения дифтерии, скарлатины, столбняка, ботулизма, газовой гангрены и заболеваний, вызванных стафилококками. Антимикробные сыворотки менее эффективны, поэтому их используют реже.

Получение

Лечебные и профилактические гетерологичные сыворотки получают путем иммунизации ослов и лошадей, поскольку эти животные более реактогенны, чем другие, и дают большой выход антител. Кроме того, лошадиный белок анафилоктогенен.

Для получения антитоксических сывороток животных вначале иммунизируют анатоксином, а после создания базисного иммунитета - возрастающими дозами токсина. Антибактериальные сыворотки получают путем введения животным убитых или живых микробов. Из крови животных выделяют плазму, затем из нее удаляют фибрин получают сыворотку.

Забор крови у этих животных производят в период максимального содержания антител, однако для этого необходимо постоянно контролировать кровь по такому показателю, как титр антител.

Антитоксические сыворотки титруются в антитоксических или международных единицах (АЕ или МЕ). За 1 АЕ принимают минимальное количество сыворотки, предохраняющее определенный вид животных от гибели при заражении специально подобранной дозой токсина. Так, 1АЕ антидифтерийной сыворотки - это наименьшее количество сыворотки, которое на протяжении 4 суток предохраняет от смерти морскую свинку массой 250г, инфицированную 100 ДЛМ дифтерийного токсина.

Антибактериальные и противовирусные сыворотки не титруются и вводятся по

ONTUSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 68 из 88	

клиническим показаниям в миллилитрах. При определении их дозы учитывается тяжесть, день заболевания и возраст больного.

Полученные выше описанным 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 генетических экспрессий и старения.

Нередко для лечения и профилактики инфекционных болезней используются гомологичные сыворотки здоровых доноров, переболевших людей или препараты плацентарной крови.

В целях снижения токсичности, уменьшения аллергического действия и концентрации иммуноглобулинов сыворотки освобождают от балластных белков. При этом используют методы фракционирования с помощью спирто-водных смесей при температуре 0° С, ультрацентрифугирования, электрофореза, ферментативного гидролиза. Очищенные и концентрированные препараты гамма-глобулиновой фракции сывороточных белков, содержащие высокие титры антител, называют иммуноглобулинами, а в практике - гамма-глобулинами. Современная технология изготовления человеческого гамма-глобулина гарантирует полную гибель вирусов гепатита.

Заключение

Существующие традиционные вакцины, несмотря на очевидный положительный эффект их широкого применения, обладают рядом недостатков.

К ним относятся:

- наличие нежелательных биологически активных
- балластных компонентов в препаратах,
- неполноценные иммунологические свойства самих антигенов.

Кроме того, существуют заболевания, не вызывающие иммунитета, вакцины против которых вообще отсутствуют и не могут быть сконструированы на основе классических принципов. Все это вызывает необходимость усовершенствования уже существующих вакцин и создания принципиально новых типов вакцин.

Одним из наиболее перспективных направлений в данной области является получение вакцинных препаратов на основе методов генной инженерии.

Последним достижением генной инженерии и биотехнологии стало создание рекомбинантных противовирусных вакцин, содержащих гибридные молекулы нуклеиновых кислот. Данные вакцины обладают целым рядом преимуществ. Они характеризуются отсутствием (или значительным снижением) балластных компонентов, полной безвредностью, низкой стоимостью, которая связана с удешевлением промышленного производства вакцин. Экспрессируемый в клетках вакцинированного животного белок имеет конформацию, близкую к нативной, и обладает высокой антигенной активностью.

Таким образом, рекомбинантные противовирусные вакцины являются новейшим поколением вакцин. Их очевидное преимущество обуславливает широкое применение данного типа вакцин в медицине и ветеринарии для вакцинации населения и сельскохозяйственных животных.

Инновационные иммунобиотехнологии в разработке лекарственных форм рекомбинантных цитокинов

Цитокины представляют собой новую самостоятельную систему регуляции основных функций организма, существующую наряду с нервной и эндокринной регуляцией и связанную в первую очередь с поддержанием гомеостаза при внедрении патогенов и нарушении целостности тканей. За последние три десятилетия клонированы гены большинства цитокинов и получены рекомбинантные аналоги, полностью повторяющие

OÑTÚSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 69 из 88	

биологические свойства природных молекул. Будущее цитокиновой терапии связано с генно-инженерными препаратами, получаемыми с применением последних достижений иммуобиотехнологии.

В ГосНИИОЧБ для внедрения в клиническую практику разрабатываются новые лекарственные формы препаратов рекомбинантных цитокинов, включая интерферон альфа 2в, интерлейкин-1 бета и его рецепторный антагонист. Среди них препарат «Беталейкин», являющийся лекарственной формой рекомбинантного интерлейкина-1 бета (ИЛ-1) человека, зарегистрирован только в России и представляет собой уникальную отечественную разработку, доведенную до клинического использования. Новые лекарственные формы ИЛ-1 бета включают мази, гели и биодegradуемые губки, применяемые для лечения больных с ожогами, трофическими язвами, инфицированными ранами. Использование мазевой формы ИЛ-1 для лечения трофических язв нижних конечностей у больных сахарным диабетом позволяет существенно улучшить показатели заживления, проводить эффективное консервативное лечение и в ряде случаев отказаться от ампутации конечности.

Рекомбинантный интерферон альфа в аэрозольной форме используется для интраназального применения при лечении больных с ОРВИ, включая грипп, в эпидемический период. Применение аэрозольного интерферона сокращает продолжительность заболевания на 2-3 дня, что с учетом сокращения периода нетрудоспособности может дать колоссальный экономический эффект в масштабах страны. В целом местное применение новых лекарственных форм цитокинов имеет ряд преимуществ, так как позволяет достигать высокой локальной концентрации действующего начала, целенаправленно воздействовать на орган-мишень и избежать нежелательных системных проявлений. Разработка различных вариантов сухих и жидких аэрозольных форм препаратов интерферона и рецепторного антагониста ИЛ-1 с заданным размером частиц позволяет создавать условия доставки цитокинов в различные отделы дыхательной системы.

В настоящее время цитокины находят все более широкое применение в клинической практике для лечения онкологических, инфекционных, иммунодефицитных и других заболеваний. Развитие этого направления ведет к созданию и внедрению в клиническую практику новых лекарственных форм препаратов рекомбинантных цитокинов с повышенной эффективностью, улучшенными фармакологическими свойствами и высокой биодоступностью.

4. Иллюстративный материал: презентация.

5. Литература: см.приложение 1.

6. Контрольные вопросы:

1. Соматические гибриды клеток высших организмов.
2. Механизм иммунного ответа на конкретный антиген. Разнообразие антигенных детерминантов.
3. Получение и свойства поликлональных и моноклональных антител. Применение. Антитела к лекарственным веществам (тестирование гормонов, антибиотиков, аллергенов).
4. Ранняя диагностика онкологических заболеваний.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 70 из 88	

ЛЕКЦИЯ № 9

1. Тема: Промышленные ферментные препараты. Технология их получения. Понятие об антибиотиках, классификация. Процесс биосинтеза антибиотиков Основные источники природных биополимеров –полисахаридов.

2. Цель: обучающийся должен усвоить задачи и основные направления технологии лекарственных форм как науки.

3. Тезисы лекции:

План лекции:

- 1. Общая характеристика антибиотиков
- 2. Микроорганизмы – продуценты антибиотиков.
- 3. Особенности получения антибиотиков.
- 4. Технологическая схема производства пенициллина

Общая характеристика антибиотиков

Термин «антибиотик» был предложен в 1942 г. Зельман Абрахам Ваксман для обозначения веществ, образуемых микроорганизмами и обладающих антимикробным действием. Разработка и производство **антибиотиков** активно началась в конце XIX века. Первым антибиотиком, выпущенным в промышленное производство, стал сальварсан (1910 год).

Антибиотики – это группа высокоэффективных биологически активных веществ, которые синтезируются микроорганизмами и способны убивать или подавлять рост живых клеток.

В настоящее время под антибиотиками понимают химиотерапевтические вещества, полученные из микроорганизмов или иных природных источников, а также их полусинтетические аналоги и производные, обладающие способностью избирательно подавлять в организме больного возбудителей заболеваний и (или) задерживать развитие злокачественных новообразований.

Антибиотики являются вторичными метаболитами -средствами преодоления стрессовых ситуаций для продуцента

Предназначены для уничтожения микроорганизмов, конкурирующих с продуцентом за питательные вещества

биосинтез антибиотиков фазоспецифичен и происходит по завершении роста биомассы.

кривая накопления биомассы продуцента и кривая накопления антибиотика в культуральной жидкости не совпадают по времени, кривая образования вторичного метаболита значительно запаздывает.

Антибиотики являются «средством преодоления стрессовых ситуаций» для м/о. Антибиотики для почвенных м/о являются не только средствами

борьбы, они также являются низкомолекулярными «эффекторами» м/о; с их помощью м/о меняет свой метаболизм при неблагоприятных условиях (например, спорообразование).

Каждый антибиотик - **это конечный продукт длинной цепи специфических ферментативных реакций превращения первичных метаболитов в антибиотическую структуру.**

Классификация антибиотиков

По **характеру воздействия на бактериальную клетку** антибиотики можно разделить на три группы:

- бактериостатические (бактерии живы, но не в состоянии размножаться),

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 71 из 88	

- бактерициды (бактерии умирают, но физически продолжают присутствовать в среде),
- бактериолитические (бактерии умирают, и бактериальные клеточные стенки разрушаются).

Классификация антибиотиков

По механизму биологического действия антибиотики делятся:

1. Антибиотики, ингибирующие синтез бактериальной стенки (пенициллины, цефалоспорины, бацитрацин, ванкомицин).
2. Антибиотики, нарушающие функционирование цитоплазматической мембраны (полипептиды, полиены, грамицидин).
3. Антибиотики, разрушающие рибосомальные субчастицы и сдерживающие синтез белка (тетрациклины, хлормицетины, аминогликозиды, макролиды).
4. Антибиотики, избирательно подавляющие синтез нуклеиновых кислот:
 - ингибиторы синтеза РНК (актиномицин, гризеофульвин, канамицин, неомицин, новобиоцин и др.);
 - ингибиторы синтеза ДНК (брунеомицин, саркомицин).

В зависимости от химической природы антибиотики делят на:

- лактамы (пенициллины, цефалоспорины);
- тетрациклины (тетрацилин, морфоцилин, метацилин);
- макролиды (эритромицин);
- аминогликозиды (гентамицин);
- гликопептиды (ванкомицин);
- амфениколы (левомицетин);
- линкосамиды (линкомицин);
- полиеновые (противогрибковые –нистатин);
- противоопухолевые (блеомицин) и др.

Классификация антибиотиков по штаммам-продуцентам:

В зависимости от продуцирующих организмов антибиотики могут быть разделены на следующие группы:

1. Образуемые эубактериями: • бактериями рода *Bacillus*: **грамицидины, полимиксины и др.**; • бактериями рода *Pseudomonas*: **мунироцин, пуоцианин, антифунгин и др.**; • бактериями других родов (*Micrococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Proteus*): **низин, колиформин и др.**
2. Образуемые бактериями рода *Streptomyces*: **стрептомицин, тетрацилин, новобиоцин и др.**
3. Образуемые несовершенными грибами: пеницилин, гризеофульвин и др.
4. Образуемые грибами классов базидио- и аскомицетов: термофиллин, лензитин, хетомин и др.
5. Образуемые лишайниками, водорослями, низшими растениями: усниновая кислота и др.
6. Образуемые высшими растениями: аллицин, рафанин и др.
7. Образующиеся в организмах животных: лизоцим, интерферон, круцин и др.

Продуценты антибиотиков

В качестве продуцентов антибиотиков используются **микроорганизмы, плесневые грибы, актиномицеты, высшие растения и ткани животных.**

Микроорганизмы одного вида могут синтезировать антибиотики различной природы и, наоборот, один и тот же антибиотик могут продуцировать микроорганизмы различных таксономических групп.

Из эубактерий наиболее часто продуцентами являются представители родов *Bacillus* и *Pseudomonas* (около 400–600), причем большинство антибиотиков бактериального

ONTUSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 72 из 88	

происхождения – полипептиды.

Микроорганизмы – продуценты антибиотиков.

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

Всего имеется 12 тысяч природных антибиотиков, из них 9 тысяч антибиотиков продуцируют актиномицеты.

Актиномицеты продуцируют следующие группы антибиотиков: (не менее 50 % из всех известных),

- канамицин - *Actinomyces kanamycetus*
- неомицин - *Actinomyces iracie*
- окситетрациклин – *Actinomyces ninesus*
- линкомицин – *Streptomyces linconiensis*

Природный левомицетин (хлорамфеникол) продуцируется *Streptomyces venezuelae*.

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

Мицелиальные грибы, продуцирующие бета-лактамы антибиотики.

мицелиальные грибы продуцируют (около 10 %) антибиотиков:

Пенициллины – *Penicillium chrysogenum*, *P. notatum* цефалоспорины *Cephalosporium Acremonium chrysogenum* являются известными представителями бета-лактамы антибиотиков, продуцирующимися мицелиальными грибами. В структуре антибиотика имеется бета-лактамно кольцо, обладающее способностью ингибирования синтеза пептидогликанов клеточной стенки. Антибиотики используются в лечении инфекций, вызванных грам(-) бактериями.

Фторхинолоны – синтетические антибиотики. Обладают широким спектром антимикробного действия. Некоторые фторхинолоны обладают не только антибактериальной, и но и противоопухолевой , анти-ВИЧ-активностью.

Антибиотики животного происхождения. Экмолин, выделенный из осетровых рыб, эритроин – из эритроцитов, лизоцим и интерферон – обладающие антимикробным и противовирусным действиями.

Антибиотики, продуцируемые высшими растениями - фитонциды. Это аллицин из чеснока – *Allium sativum*, иманин из зверобоя, сальван из шалфея, рафанин из редиса - *Raphanus sativum*, фазеолин из фасоли - *Phaseolus vulgaris* и другие

Значение антибиотиков для сельского хозяйства:

1. Антибиотики применяются для лечения животных и птиц;
2. Кормовые антибиотики используются для кормления животных и птиц.
3. Применяются антибиотики в растениеводстве для борьбы с болезнями растений, антибиотики используются в качестве гербицидов, инсектицидов и имеют 42 ряд преимуществ перед химическими препаратами.
4. Антибиотики применяются также в пищевой промышленности для консервирования продуктов питания, для сохранения свежего мяса, молока, рыбы и т.д.

Из большого числа антибиотиков, испытанных с целью применения для борьбы с различными заболеваниями растений, наибольший эффект наблюдается при использовании **стрептомицина, гризеофульфина, циклогексамида** и некоторых других.

Стрептомицин используется для борьбы с возбудителями, вызывающими бактериальное увядание фасоли и сои; болезнями косточковых (в США); хлопка, риса (в Индии). В некоторых странах выпускают препараты стрептомицина с окситетрациклином, известные как «агримицин», «фитомицин», «фитостреп».

Биалофос – гербицид, полученный в начале 1980-х годов из культуры *S. hydroscopicus*. По своей структуре представляет трипептид, со-

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 73 из 88	

стоящий из двух остатков L-аланина и L-глутаминовой кислоты.

Антибиотики широко используются в животноводстве как лечебные средства против заболеваний сельскохозяйственных животных, птиц и пчел. Среди наиболее распространенных антибиотиков можно отметить **авермектины**, используемые для подавления развития паразитов, в том числе нематод; **монензин** для лечения кокцидоза домашней птицы; **линкомицин** для лечения дизентерии; **новобиоцин** для лечения холеры индеек.

Применение антибиотиков в пищевой промышленности хозяйства

Первые сведения об использовании антибиотиков в *консервной промышленности* относятся к 1943 году. К таким антибиотикам относятся **субтилилин**, **низин** и др.

Так, для консервирования овощей предложено использовать **субтилилин**, под действием которого наблюдается гибель клостридиальных и термофильных бактерий.

Низин – антибиотик, образуемый молочнокислыми бактериями, используется при консервировании не только овощей (томаты, зеленый горошек, цветная капуста), но и рыбы, молока, сыров и др. Антибиотик подавляет развитие ряда термофильных спорообразующих бактерий, не оказывая токсического действия на организм человека.

Методы получения антибиотиков:

1. **Химический синтез.** С помощью этого метода получают основные синтетические антибиотики.

2. **Биосинтез** (прямая ферментация микроорганизма – продуцента). Для получения антибиотиков этим способом используют штаммы микроорганизмов, образующие наибольшее количество антибиотика.

3. **Мутационный биосинтез** (мутасинтез). Биосинтез антибиотиков с применением блокированных мутантов, у которых отсутствует или блокировано определенное звено в цепи реакций, ведущих к синтезу антибиотиков. Блокированные мутанты не способны образовывать нужный антибиотик. Используя низкую субстратную специфичность ферментов вторичного метаболизма и вводя аналоги предшественников антибиотиков, последние переводят в аналоги самого антибиотика в ходе процесса мутасинтеза.

рДНК-биотехнологии в создании антибиотиков

4. **рДНК-биотехнологии** - создание высокоактивных штаммов продуцентов антибиотиков.

С помощью **рДНК** можно создавать новые антибиотики с уникальной структурой, оказывающие мощное воздействие на определенные микроорганизмы, обладающие минимальными побочными эффектами.

Биосинтез вторичных метаболитов

Процесс развития микроорганизмов продуцентов вторичных метаболитов носит двухфазный характер:

первая фаза развития (тропофаза или фаза сбалансированного роста) характеризуется тем, что в культуре продуцента антибиотика происходит быстрое накопление биомассы. 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) - во время идиофазы рост биомассы замедляется и происходит быстрое накопление антибиотика в культуральной жидкости.

Схема промышленного биотехнологического производства антибиотиков

1. получение соответствующего штамма — продуцента антибиотика, пригодного для промышленного производства;

2. **подготовка питательной среды:** в технологии получения антибиотиков применяют *твердые питательные среды* – агаризованные или сыпучие субстраты (пшено, ячмень,

ONTUSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 74 из 88	

пшеничные отруби и т.п.) и жидкие питательные среды.

3. **Подготовка посевного материала** (продуценты-мутанты → колба на качалке → первый инокулятор (10 л) → второй инокулятор (100–500 л) → ферментер).

4. **Ферментация:** для получения антибиотиков используют **методы поверхностного и глубинного культивирования**.

В ходе ферментации культура непрерывно аэрируется стерильным подогретым воздухом. Процесс ферментации осуществляется в строго стерильной глубинной аэробной периодической культуре, носит выраженный двухфазный характер. Температура среды, рН и ряд др. параметров автоматически *регулируются в соответствии с регламентом производства антибиотика. Антибиотики получают при глубинной аэробной ферментации периодического действия в асептических условиях. Период ферментации длится 7-10 суток.*

5. **Выделение антибиотиков.** Если антибиотик находится в клетках, на первом этапе обработки биомассу выделяют из культуральной жидкости (фильтрацией или центрифугированием); после разрушения клеток антибиотик экстрагируют 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.

6. **Очистка антибиотиков.** включает стадии: *осаждение, сорбцию, сушку.* Затем препарат фасуют в стерильные флаконы с соблюдением условий, гарантирующих стерильность.

7. **Получение готового продукта:** Готовый продукт подвергается биологическому и фармакологическому контролю. **Биологический контроль определяет степень стерильности препарата.** При фармакологическом контроле проводят всесторонние испытания *препарата на токсичность, пирогенность, токсикогенность и др., оценивают антимикробный спектр препарата, действие на лейкоциты крови, устанавливают максимально переносимую дозу антибиотика, дозы, вызывающие полную и 50 % гибель экспериментальных животных.*

Готовая форма лекарственного препарата антибиотического вещества поступает к потребителю с указанием биологической активности и даты выпуска.

Питательной среды

Для каждого продуцента разрабатывается оптимальная среда, которая должна соответствовать определенным требованиям:

- а) обеспечивать максимальный выход антибиотика;
- б) состоять из относительно дешевых компонентов;
- в) иметь хорошую фильтрующую способность;
- г) обеспечивать применение наиболее экономичных приемов для выделения и очистки антибиотиков.

Используются следующие среды:

мясопептонная среда, в состав которой одновременно с мясным экстрактом и пептоном входят хлорид натрия, фосфат калия, иногда глюкоза или сахароза; используется обычно в лабораторной практике;

картофельные среды с глюкозой и пептоном, часто используемые в лаборатории для культивирования многих видов актиномицетов и бактерий;

среды с кукурузным экстрактом, соевой мукой, бардой и другими веществами, в состав которых входят сульфат аммония, карбонат кальция, фосфаты, глюкоза, сахароза, лактоза или иные углеводы и ряд других соединений; среды успешно применяются в промышленности, т. к. являются дешевыми и обеспечивают хорошее развитие микроорганизмов с высоким выходом антибиотиков.

Большинство сапрофитных бактерий хорошо развивается на богатых по составу натуральных средах (мясопептонный агар, картофельный агар, сусло-агар и др.) при рН

OÑTÝSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 75 из 88	

около 7,0 и температуре 30–37 °С. В этих же условиях развиваются актиномицеты и некоторые грибы, но для них они менее благоприятны, чем для бактерий.

Значение рН среды после стерилизации устанавливается в пределах 6,8–7,1.

Мицелиальные грибы предпочтительнее развиваются на средах с несколько пониженным значением рН (4,5–5,0), на которых плохо растут многие бактерии и актиномицеты.

Стерилизация питательных сред в промышленных условиях достигается в результате:

- периодического метода для небольших объемов среды, при котором среда нагревается до 120–130 оС непосредственно в ферментере и выдерживается в течение определенного времени;

- непрерывного метода для значительных объемов, при котором приготовленная среда подается в стерилизационную колонку, через которую пропускают острый пар. Нагретая до необходимой температуры среда поступает в специальный аппарат, где выдерживается определенное время.

Источниками минерального питания служат **фосфор, сера и другие макро- и микроэлементы.**

Продуценты антибиотиков по отношению к концентрации фосфора в среде можно разделить на три группы:

- высокочувствительные продуценты, для которых оптимальная концентрация фосфора в среде составляет менее 0,01 % (продуценты нистатина, тетрациклинов, флоримицина, ванкомицина);

- продуценты средней чувствительности, для которых оптимальная концентрация фосфора составляет 0,010–0,015 % (продуценты стрептомицина, эритромицина, циклосерина, неомицина);

- малочувствительные продуценты, для которых оптимальная концентрация фосфора составляет 0,018–0,020 % (продуценты новобиоцина, грамицидина, олеандомицина).

Влияние рН среды. Многие бактериальные организмы, синтезирующие антибиотики, лучше развиваются при рН около 7,0, хотя некоторые, например молочнокислые стрептококки, продуцирующие низин, лучше развиваются в среде при рН = 5,5÷6,0. Большинство актиномицетов хорошо развиваются при начальных значениях рН среды в пределах от 6,7 до 7,8; в большинстве случаев жизнеспособность актиномицетов при рН ниже 4,0–4,5 подавлена.

Температура. Для большинства бактериальных организмов температурный оптимум развития лежит в диапазоне 30–37 °С. Для продуцента грамицидина С оптимальная температура для развития и биосинтеза равна 40 °С.

Актиномицеты, как правило, культивируются при температуре 26–30°С, хотя некоторые виды стрептомицетов могут развиваться как при пониженных (от 0 до 18 °С), так и при повышенных (55–60 °С) температурах.

Для большинства мицелиальных грибов оптимальная температура составляет 25–28 °С.

Аэрация. Большинство изученных продуцентов антибиотиков являются аэробами. Для биосинтеза многих антибиотиков (пенициллин, стрептомицин и др.) максимальное их накопление происходит при степени аэрации, равной единице, при которой через определенный объем среды за 1 мин продувается такой же объем воздуха.

В процессе развития продуцента антибиотика в промышленных условиях потребность организма в кислороде меняется в зависимости от стадии развития, вязкости культуральной жидкости и других факторов. На определенных стадиях могут возникнуть ситуации, связанные с кислородным голоданием продуцента. В этих условиях следует принимать дополнительные меры, например, повышение концентрации окислителя добавлением пероксида водорода.

ONTUSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 76 из 88	

технологический процесс получения пенициллина

Подготовка инокулята

Подготовка посевного материала включает следующие стадии:

1) выращивание посевного мицелия 1-й генерации в аппаратах малой емкости (инокуляторах);

2) выращивание посевного мицелия 2-й генерации в аппаратах большой емкости.

Основные биотехнологические этапы получения антибиотика: 1 - Экстракция, выделение и очистка антибиотиков подходящими растворителями; 2 - Испарение и кристаллизация сырья в специальных средах; 3 - Фракционирование в растворе гидрохлорида прокаина; 4 - Лиофильная и распылительная сушка готового пенициллина

Состав одной из сред для выращивания посевного материала.

Вещество %

Кукурузный экстракт 2 (на сухой вес)

Глюкоза 2

Лактоза 0,5

Азотнокислый аммоний 0,125

Однозамещенный фосфорнокислый калий 0,2

Сернокислый магний 0,025

Сернокислый натрий 0,05

Мел 0,5

Процесс ферментации

В промышленности применяется метод глубоинной ферментации, при котором культура микроорганизма выращивается в питательной среде, заполняя весь ее объем.

Предшественниками называются вещества, непосредственно включающиеся в молекулу получаемого продукта. Предшественником бензилпенициллина является фенилуксусная кислота (ФУК) или ее производные - фенилацетамид (ФАА), фенилэтиламин, фенилацетилглицин и другие вещества. Предшественником феноксиметилпенициллина является феноксиуксусная кислота (ФОУК)

Основными показателями, свидетельствующими об окончании ферментации, являются полное исчезновение углеводов в культуральной жидкости и прекращение биосинтеза антибиотика. Процесс ферментации в производственных условиях осуществляется при температуре $26 \pm 10^\circ\text{C}$ и продолжается обычно 120-125 часов.

Фильтрация

Обычно для отделения мицелия от культуральной жидкости применяют вакуум-барабанные фильтры непрерывного действия. Фильтрацию начинают до начала автолиза мицелия, поскольку при фильтрации автолизированной культуры мицелий не образует плотной пленки на фильтрующей поверхности барабана, а налипает в виде отдельных тонких комков, которые сами не отходят в зоне «отдувки» фильтра, и их приходится удалять вручную. При этом продолжительность фильтрации увеличивается в 2 - 3 раза, выход фильтрата резко падает, а сам фильтрат получается очень мутным.

Необходимо тщательно соблюдать условия, препятствующие разрушению пенициллина во время фильтрации, - охлаждение нативного раствора до $4-6^\circ\text{C}$ и систематическая (после каждой загрузки) обработка фильтра, коммуникаций и сборников антисептиками, например хлорамином. Фильтр также должен систематически стерилизоваться острым паром.

Этапы технологии производства неочищенных антибиотиков:

1. Посуду, инструменты, материалы стерилизуют, используя для этой цели автоклаве водяным паром в течение 30-45 минут. Наиболее эффективным способом стерилизации

OŃTŪSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «OŃTŪSTIK Qazaqstan medicina akademiasy» AҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 77 из 88	

рабочего бокса является ультрафиолетовое облучение его бактерицидной лампой в течение 60 минут.

2. Для размножения гриба используют его исходную культуру, расфасованную в стеклянные флаконы. Для расплодки посевного материала производят посев грибка в колбу над пламенем спиртовой горелки. Колбы с посевным материалом ставят на специальную качалку для лучшей аэрации с целью более интенсивного роста грибка при температуре от 26 до 28° С на 18-24 ч.

3. Переносят посевной материал в большие бутылки и вновь помещают на качалку и подвергают встряхиванию при температуре 26-28° С в течение 18-24 ч.

4. Производят загрузку расплодки гриба и необходимых компонентов питательной среды в специальные реакторы для ферментации.

При изготовлении кормового нативного антибиотика ферментация протекает 24—36 ч. Через каждые 6-12 ч из ферментатора отбирают пробу для проверки антибиотика на активность. В процессе развития грибка в ферментаторе скапливаются газообразные продукты его жизнедеятельности, которые удаляются через шланг.

По окончании процесса ферментации антибиотиков культуральную жидкость проверяют на активность преимущественно следующими микробиологическими методами:

***методом перпендикулярных штрихов на агаре.** Для этого вырезанную в питательной среде канавку заполняют средой с антибиотиком. Перпендикулярно канавке засевают различные виды микроорганизмов. Длина белых полосок указывает на неодинаковую чувствительность микробов к антибиотику.*

***методом бумажных дисков.** Для этого на питательную среду, засеянную микробами, накладывают диски из фильтровальной бумаги, пропитанные антибиотиком. В центре наложен диск без антибиотиков (контрольный). Вокруг диска с антибиотиками роста микроорганизмов не наблюдается (зона угнетения);*

***методом цилиндриков.** Для этого в питательную среду, засеянную бактериями, погружают стеклянные или металлические незапаянные цилиндрики, которые заполняют антибиотиками. Ширина зоны угнетения вокруг цилиндриков указывает на антимикробные свойства антибиотиков.*

Оценка антибиотиков на биологическую активность методами: перпендикулярных штрихов (А), по бумажных дисков (В), незапаянных цилиндриков (С)

Что такое антибиотики?

Характеристика метаболических путей биосинтеза антибиотиков микроорганизмами.

Характеристика антибиотиков, продуцируемых актиномицетами.

Характеристика антибиотиков, продуцируемых бактериями.

Характеристика антибиотиков, продуцируемых мицелиальными грибами.

Характеристика антибиотиков, продуцируемых животными.

Характеристика антибиотиков, продуцируемых высшими растениями.

Принципиальная схема выделения и очистки канамицина.

Промышленный метод получения полусинтетических антибиотиков.

Биологические методы анализа качества антибиотиков.

Гормоны – (др. греч. ὁρμόω – 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).

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.

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.

Классификации лекарственных средств инсулина

Различают:

моновидовые (одновидовые) – включают в себя экстракт поджелудочных желез или инсулин животных только одного вида, например, свиный;

комбинированные – состоят из экстрактов поджелудочных желез или инсулинов животных разных видов, например, свиный 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;

продолжительного действия;

среднего срока действия;

длительного действия;

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 79 из 88	

сверхдлительного действия.

Классификация основана на том, что инсулин вырабатывается панкреатически (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.).

Лекарственные средства инсулина на фармацевтическом рынке

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 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*.

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.

ONTUSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	044-43/ - (2023-2024) Стр. 80 из 88	

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 необходимы.

6. этап. Проводят сепарацию путем центрифугирования. Клетки лизируют ультразвуком, выделяют А и В цепи, которые связаны с бетагалактозидазой. Обрабатывают 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.

В середине 30-х годов 20 века шведский ученый Эйлер (V. Euler) обнаружил в экстракте из предстательной железы (простаты) биологически активные вещества, которые он назвал простагландинами (PG).

Позже было установлено, что простагландины образуются практически во всех органах и тканях.

В 1962 г. была расшифрована химическая структура простагландинов.

Простагландины вместе с лейкотриенами и тромбоксанами составляют группу эйкозаноидов

– биологически активных веществ, содержащих 20 атомов углерода (эйкоза по-гречески 20).

Функции эйкозаноидов- Эйкозаноиды регулируют тонус гладкой мускулатуры, влияя на артериальное давление, состояние бронхов, кишечника, матки.

Регулируют секрецию воды и натрия почками. Влияют на свертывание крови.

Регулируют состояние слизистой оболочки желудка. Недостаточная секреция эйкозаноидов приводит к возникновению язвы желудка

Участвуют в формировании процесса воспаления при повреждении тканей и инфекции (боль, отек, лихорадка).

Избыточная секреция эйкозаноидов приводит к развитию таких заболеваний как бронхиальная астма и других аллергических реакций, а также к тромбозам.

Что такое простагландины?

Простагландины – биологически активные вещества, являющиеся производными ненасыщенных жирных кислот, состоящие из 20 атомов углерода. Молекула простагландина содержит пятичленный цикл и две боковые цепи. Обычно в 15-м положении у них имеется гидроксильная группа.

Классификация простагландинов

В зависимости от строения цикла и характера боковых цепей простагландины делят на несколько типов, обозначаемых буквами: А, В, С, D, E, F, H, I, J.

Внутри типа простагландины делят на 1-ю, 2-ю и 3-ю серии в зависимости от числа двойных связей в боковых

Эйкозаноиды являются производными арахидоновой кислоты.

Арахидоновая кислота это – незаменимая жирная кислота, она относится к классу омега-6-ненасыщенных жирных кислот. В небольшом количестве вырабатывается в человеческом организме.

Но наш организм не может полностью покрыть потребность в арахидоновой кислоте за счет синтеза, поэтому мы должны получать ее с пищей.

OÑTÜSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 81 из 88

Арахидоновая кислота содержится в жирных продуктах. Вы можете получить арахидоновую кислоту из красного мяса, домашней или дикой птицы, яиц, орехов и другой

Источники субстратов

Полиеновые кислоты либо поступают в организм с пищей, либо образуются из незаменимых жирных кислот с 18 атомами углерода (линолевая и линоленовая кислоты)

(ω -6 ряд)

Линолевая кислота

18:2 (9,12) 18:3 20:3 20:4

Линоленовая кислота

(ω -3 ряд)

18:3 (9,12,15) 18:4 20:4 20:5

Для синтеза простагландинов необходим набор ферментов

Получение первого интермедиата PGH₂ обеспечивает мембранный фермент простагландин (PGH₂)-синтетаза (циклооксигеназа), имеющая две ферментативные активности: циклооксигеназную и пероксидазную

Дальнейшие превращения осуществляют соответствующие изомеразы, набор которых в разных тканях различается

Циклооксигеназа

Циклооксигеназа (ЦОГ; простагландин G/H синтаза, КФ 1.14.99.1), катализирует первые 2 стадии синтеза

простагландинов.

Состоит из двух белковых субъединиц, каждая имеет два активных центра с разной ферментативной активностью.

Обеспечивает включение в арахидоновую кислоту 4-х атомов кислорода и формирование пятичленного кольца (образование нестабильного PGG₂). Затем у PGG₂ происходит восстановление гидропероксида у 15 атома углерода до гидроксильной группы (пероксидаза) и образуется стабильный PGH₂.

Находится в эндоплазматическом ретикулуме, каждая субъединица имеет три домена: домен фактора роста эпидермиса (34–72), мембранный домен (73–116) и каталитический домен с двумя активными центрами

В активном центре циклооксигеназы – тирозин (Tyr385), в активном центре пероксидазы – гем.

Лейкотриены-характерная особенность лейкотриенов – отсутствие циклической структуры и наличие трех сопряженных связей (три-ен).

Вырабатываются они в основном в лейкоцитах (5-липоксигеназа), хотя этот процесс происходит также в тромбоцитах (12- липоксигеназа) и эозинофилах (5- липоксигеназа).

Выделяют типы лейкотриенов А, В, С, D и Е, в зависимости от количества двойных связей их делят на серии 3, 4 и 5.

Трансклеточный синтез эйкозаноидов

Некоторые клетки имеют полный набор ферментов, необходимых для продукции биологически активных простагландинов и лейкотриенов.

Часто биосинтез простагландинов является результатом межклеточных взаимодействий и переноса химически реактивных интермедиатов, PGH₂ и лейкотриена А₄, между клетками.

Этот процесс называется трансклеточный биосинтез эйкозаноидов

Трансклеточный синтез простагландинов

1. Превращение арахидоновой кислоты осуществляется в клетке одного типа (клетка донор), а затем интермедиат передается во вторую клетку (клетка акцептор) для полной трансформации в биологически активный медиатор.

2. Перенос осуществляет белок, связывающий жирные кислоты (FABP). Связывание

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	044-43/ - (2023-2024) Стр. 82 из 88	

4. Иллюстративный материал: презентация.

5. Литература: см.приложение 1.

6. Контрольные вопросы:

1. Ферменты, их свойства, области их применения. Технология получения. Понятие об антибиотиках, классификация.
2. Процесс биосинтеза антибиотиков и его совершенствование (использование достижений генной инженерии и ферментативной перестройки).
3. Создание новых природных и полусинтетических антибиотиков.
4. Современные международные требования к качеству антибиотиков. Основные источники природных биополимеров –полисахаридов.
5. Перспективы производства биополимеров биотехнологическим синтезом

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 83 из 88	

ЛЕКЦИЯ № 10

1. Тема: Биотехнология препаратов из культуры тканей. Основные положения теории тотипотентности. Методы культивирования клеток растений. Понятие о каллусе. Понятие ризосекреции. Фаговые препараты и лекарственные препараты для коррекции нормофлоры кишечника

2. Цель: обучающийся должен усвоить задачи и основные методы культивирования клеток растений.

3. Тезисы лекции:

1. Характеристика нормофлоры человека
2. Лекарственные препараты для коррекции микробиоценоза
3. Эубиотики для профилактики и лечения заболеваний
4. Официально зарегистрированные биологические лекарственные препараты (пробиотики, пребиотики)
5. Пребиотики. Фрукто-олигосахариды (ФОС)

Характеристика нормофлоры человека

Нормальная микрофлора, заселяющая кишечник человека, имеет важное значение для регулирования оптимального уровня метаболических процессов, протекающих в организме, а также для создания высокой колонизационной резистентности кишечного тракта к условно-патогенным микроорганизмам. Впервые на существенную роль нормальной микрофлоры кишечника в жизнедеятельности человека, поддержании его здоровья указал в своих работах выдающийся русский учёный И.И. Мечников. И.И. Мечников впервые предложил поддерживать нормальную микрофлору кишечника на оптимальном уровне с помощью микробов и продуктов их жизнедеятельности.

По существующей классификации (Шендеров Б. А., 1996) препараты для коррекции микробиоценоза можно разделить на 6 групп:

I - препараты, содержащие монокультуры живых микроорганизмов представителей нормальной микрофлоры кишечника;

II - препараты, содержащие комплекс живых микроорганизмов,

III - препараты, содержащие субстанции, которые при оральном введении стимулируют рост и размножение индигенной флоры, и прежде всего - бифидо- и лактобактерий;

IV - препараты, содержащие монокультуры или комплекс микроорганизмов и субстанций, стимулирующих их приживление, рост и размножение;

V - препараты, содержащие генноинженерные штаммы микроорганизмов с заданными характеристиками:

VI - препараты, содержащие помимо микроорганизмов или средств, стимулирующих их рост и размножение, другие соединения, влияющие на функции клеток органов и тканей человека.

Положительное действие этих препаратов на организм связано с влиянием на различные звенья функционирования микрофлоры кишечника:

препараты обладают антагонистической активностью по отношению к широкому спектру патогенных и условно-патогенных микроорганизмов за счет продукции антибактериальных веществ и конкуренции за лимитируемые питательные субстраты и места адгезии на эпителиоцитах слизистой кишечника влияют на ферментативную и синтетическую активность и кишечных микроорганизмов;

стимулируют иммунную систему макроорганизма.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 84 из 88	

Пробиотики — это живые, ослабленные штаммы нормальной микрофлоры кишечника, которые при применении в адекватных количествах вызывают улучшение здоровья организма-хозяина.

Должны быть фено- и генотипически классифицируемыми

Не должны обладать патогенностью

Должны сохраняться живыми

Должны быть кислотоустойчивыми или заключены в кислотоустойчивую капсулу

Способны к адгезии к кишечному эпителию

Способны к колонизации кишечника

Должны быть безопасными

Показания к назначению пробиотиков

Острые кишечные инфекции легкой и средней степени тяжести, особенно вирусные

Затяжные диареи, обусловленные условно-патогенной флорой

Антибиотикоассоциированная диарея — лечение и профилактика

Инфекция *H. pylori* — на фоне и после эрадикации

Лямблиоз — на фоне и после лечения

Воспалительные заболевания кишечника — поддержание ремиссии

Пищевая аллергия — лечение и профилактика

На фоне и после лечения обострений хронических очагов инфекций, ОРВИ и их осложнений.

Пребиотики – это пищевые добавки, селективно стимулирующие рост и размножение полезных бактерий. Это низкомолекулярные углеводы (фруктозоолигосахариды, инулин, лактулоза и др.), которые не должны подвергаться гидролизу пищеварительными ферментами.

Свойства пребиотиков:

- не перевариваются и не всасываются в верхних отделах пищеварительного тракта;
- селективно ферментируются микрофлорой толстой кишки, вызывая активный рост полезных микроорганизмов.

Симбиотики – это лекарственные препараты, в состав которых входит несколько видов микроорганизмов-пробиотиков или несуколько штаммов одного и того же типа бактерий.

Например, любой препарат, содержащий 2-3 вида лактобактерий или бифидобактерий и молочнокислые стрептококки, будет являться симбиотиком (Ацидобак, Аципол, Бифидобак и др.).

Синбиотики – это лекарственные препараты, которые содержат комбинацию из пробиотиков и пребиотиков. То есть, синбиотики являются комплексными препаратами, которые объединяют в одной капсуле и пробиотики и пребиотики (Наринэ форте, Альгибиф, Бион-3, Бифилар, Бифилиз, Бифистим, Максилак, Нормофлорин и др.).

Технология получения каллуса

Выбранный эксплантант, представляющий вырезанные маленькие кусочки (2-4 мм) растительной ткани, которые находятся в подходящем биологическом состоянии (молодые, здоровые), что необходимо для получения каллусных культур.

Этот растительный материал тщательно моют, стерилизуют гипохлоридом натрия, 96% спиртом или 0,1% сулемы, затем тщательно промывают дистиллированной водой и помещают на синтетическую агаризованную питательную среду.

Сосуды закрывают ватно-марлевыми тампонами. Конечно, при этом необходимо соблюдать строгие правила антисептики (работают только в боксах). Для образования каллуса и роста ткани сосуды переносят в темное помещение, где строго поддерживают определенный режим.

Это касается температуры и влажности. Известно, что для большинства культур эти параметры таковы: температура +24-26 °С, а влажность 65-70%.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 85 из 88	

Через 2-3 недели на раневой поверхности образуется первичный каллус.

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

1. формирование биомассы
2. синтез вторичных продуктов.

Технология получения биомассы:

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

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

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

Культивирование ведется на жидких и твердых питательных средах.

Факторы увеличения накопления вторичных метаболитов

Первый фактор. Обязательными компонентами питательных сред должны быть фитогормоны. В качестве регуляторов роста и синтеза продуктов вторичного метаболизма выступают

- ауксины (индолилтриуксусная кислота (ИУК), нафтилуксусная кислота (НУК) и 2,4 дихлорфеноксисукусная кислота (2,4Д)
- цитокинины -6-бензиламинопури́н (БАП), N-изоптен и 6-фурфуриламинопурин (кинетин)

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

Третий фактор. На рост и развитие растительных тканей и клеток *in vitro* большое влияние оказывают физические факторы: свет, температура, аэрация, влажность воздуха. Большинство изолированных культур выращиваются в темноте.

Для освещения чаще используют люминесцентные лампы с интенсивностью светового потока 1000—1500 люкс. Оптимальная температура для успешного роста большинства культур составляет 25-27 °С; для индукции их морфогенеза требуются более низкие температуры (18-25 °С). Влажность в помещении, где растут культуры, должна составлять 60-70%.

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

Преимуществами каллусных культур в технологии получения растительного сырья являются:

- ❖ надежность и стабильность по выходу биомассы и продуктов вторичного метаболизма

ONTUSTIK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 86 из 88

- ❖ возможность использования каллусной системы для иммобилизации и последующей биотрансформации

Недостаток: в необходимости применения ручного труда

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

Одним из основных условий иммобилизации является:

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

Способы иммобилизации

- клетки встраивают в альгинат кальция
- клетки встраивают в агарозные шарики
- клетки встраивают в трехмерные сетчатые структуры из нейлона, порошкового металла, полиуретана. (в частности такие системы используются для *Digitalis lanata* и др. Каковы преимущества иммобилизованных клеток по сравнению с суспензионными культурами? Это:

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

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

Недеференцированные культуры клеток *Digitalis lanata* сами не образуют сердечных гликозидов, но могут осуществлять реакции биотрансформации субстратов, добавленных в питательную среду. Биотрансформация дигитоксина в дигогсин идет за счет реакции 12-гидроксилирования, катализируемой ферментом, находящимся в клетках *Digitalis lanata*.

Методы культивирования изолированных клеток и тканей

1. *Твердофазный способ культивирования. Каллусные культуры*
2. *Глубинное суспензионное культивирование*
3. *Культура протопластов*
4. *Микроклональное размножение (культура органов растений)*

1. Твердофазный способ культивирования. Каллусные культуры

При этом способе культивирования используются так называемые твердые питательные среды, содержащие гелеобразующий компонент, чаще всего агар-агар как наиболее близкий по природе субстрат растительного происхождения. Такая среда имеет вид плотного геля, и каллусные клетки находятся на ее поверхности. Твердофазный способ культивирования чаще используется в лабораторных условиях для первичного получения изолированных растительных культур, предварительной оценки культур в качестве возможных продуцентов БАВ, а также для выращивания посевного материала. За 4-6 недель среда истощается, что определяет необходимость производить пересев. В противном случае ткани могут погибнуть.

2. Глубинное суспензионное культивирование

Для посева в жидкую питательную среду необходимо получить посевной материал в виде суспензии клеток. Для отделения крупных агрегатов клеточную массу перед пересевом фильтруют через нейлоновые или металлические сита. При пересевах на 100 мл среды используют 2-3 г свежей каллусной ткани.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 87 из 88

В лабораторных условиях для культивирования тканей в жидких питательных средах обычно используют колбы емкостью 100-500 мл с небольшим объемом питательной среды. Сосуды с суспензией клеток помещают на качалки с частотой вращения 100-120 об/мин. В таких условиях обеспечивается аэрация тканей и нарастающая масса клеточных агрегатов распадается на отдельные фрагменты.

В промышленных условиях используется метод непрерывного культивирования в ферментерах (биореакторах) различной конструкции, имеющих конструктивные особенности, которые учитывают специфику растительных клеток. Метод основан на поддержании баланса между разбавлением среды и удалением части суспензии.

Глубинное культивирование в ферментерах имеет ряд преимуществ по сравнению с твердофазным статическим способом:

- автоматически поддерживаются все необходимые параметры: температура, рН среды, степень аэрации, скорость работы мешалки и пр.;
- постоянный контроль содержания в культуральной среде основных элементов питания;
- культуральная система периодически пополняется свежей питательной средой;
- постоянно осуществляется микробиологический контроль с целью предотвращения инфицирования и гибели культур;
- контроль активности роста и деления клеток;
- контроль образования БАВ.
- **3. Культура протопластов**
- Протопласт - это клетка, лишенная оболочки. Такая «голая» клетка потенциально способна восстанавливать новую оболочку, делиться, образовывать клеточные агрегаты, из которых можно получить клеточную культуру с новыми свойствами, а затем новое растение - регенерат. Отсутствие клеточной стенки облегчает проведение различных генетических манипуляций, связанных с реконструированием генома, а также дает возможность получать популяции гибридных клеток в результате слияния протопластов.
- Существует два способа разрушения клеточной оболочки - механический и ферментативный. Последний менее травматичен для клеток и чаще используется.

В результате слияния протопластов возникают два вида новых клеток:

- гомокарионы (гомокариоциды), состоящие из клеток одного родителя;
- гетерокарионы (гетерокариоциды), состоящие из клеток обоих родителей.

Большой интерес представляют гетерокарионы, которые после слияния отбирают микроскопически. Для отбора исходные протопласты окрашивают флуоресцентными красителями различных цветов. Если происходит слияние протопластов мезофилла листа (зеленые) и культуры изолированных клеток (бесцветные), то получают гетерокарионы, состоящие из бесхлорофилльных и хлорофиллосодержащих зон, что позволяет вести отбор без предварительного окрашивания.

Для получения протопластов растительный материал (например, суспензия клеток мезофилла листа или суспензия культуры изолированных клеток) обрабатывается препаратами пектиназ и целлюлаз или более сложными смесями ферментов. Для получения суспензии клеток целого растения предпочтительнее использовать листья стерильных растений, культивируемых *in vitro*, поскольку при получении «голых» протопластов также необходимо соблюдать стерильность.

После разрушения клеточных стенок суспензию протопластов очищают от остатков клеток и тканей фильтрованием, смесь ферментов удаляют центрифугированием с последующим промыванием в культуральной среде. После очистки протопласты ресуспендируют в питательной (культуральной) среде. Изолированные протопласты широко

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Основы фармацевтической технологии»	Стр. 88 из 88	

используются в качестве модельных систем в физиологических, цитологических, фитопатологических и других экспериментах, а также генно-инженерных манипуляциях.

4. Иллюстративный материал: презентация.

5. Литература: см.приложение 1.

6. Контрольные вопросы:

1. Биотехнология препаратов из культуры тканей.
2. Основные положения теории тотипотентности.
3. Методы культивирования клеток растений.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств	044-43/ - (2023-2024)	
Лекционный комплекс по дисциплине «Фармацевтическая биотехнология»	Стр. 89 из 88	

Приложение 1

Литература

Электронные ресурсы, включая, но не ограничиваясь ими: базы данных, анимации симуляторы, профессиональные блоги, веб-сайты, другие электронные справочные материалы (например, видео, аудио, дайджесты)	<p style="text-align: center;"><i>Электронды ресурс:</i></p> УМКД размещен на образовательном портале ukma.kz 1. Электронная библиотека ЮКМА - https://e-lib.skma.edu.kz/genres 2. Республиканская межвузовская электронная библиотека (РМЭБ) – http://rmebrk.kz/ 3. Цифровая библиотека «Aknurpress» - https://www.aknurpress.kz/ 4. Электронная библиотека «Эпиграф» - http://www.elib.kz/ 5. Эпиграф - портал мультимедийных учебников https://mbook.kz/ru/index/ 6. ЭБС IPR SMART https://www.iprbookshop.ru/auth 7. информационно-правовая система «Заң» - https://zan.kz/ru 8. Cochrane Library - https://www.cochranelibrary.com/
Электронные учебники	1. Биофармация және дәрілік препараттарды биофармацевтік зерттеу: оқу құралы / Б. А. Сағындықова, Р. М. Анарбаева. - Электрон. текстовые дан. (2,211 КБ). - Қарағанды : Medet Group, 2021. - 172 б. эл. опт. диск (CD-ROM) 2. Фармацевтическая биотехнология: Учебное пособие Н.К. Жакирова -Алматы: Эверо, 2020. https://www.elib.kz/ru/search/read_book/318/ 3. Биотехнология өндірісіндегі технологиялық сызба нұсқа. 4. Есимова А.М., 2020 https://aknurpress.kz/login 5. Биологиялық препараттар өндірісінің технологиясы. 6. Есимова А.М., Кедельбаев Б.Ш., 2020 Есимова А.М /ЦБ Aknurpress / https://www.aknurpress.kz/reader/web/2668 7. Фармацевтикалық биотехнология микробиология негіздерімен: Оқу - әдістемелік құрал (дәрістер жинағы) /Торланова Б.О., Касимбекова М.Д. - Шымкент : ОҚМА, 2022. - 108 б. 8. Биотехнология – Алматы: Эверо, 2020. – 396 бет. Жатқанбаев Ж.Ж./ 9. Эпиграф https://www.elib.kz/ru/search/read_book/344/ 10. Биотехнология, 2012 Әлмағамбетов Қ.Х. Эпиграф 11. https://www.aknurpress.kz/reader/web/1058
Специальные программы	IBM SPSS Statistics: https://www.ibm.com/ru-ru/products/spsstatistics
Журналы (электронные журналы)	1. Научный информационно-аналитический журнал «Фармация Казахстана» http://pharmkaz.kz/glavnaya/ob-izdanii/ 2. Научно-практический рецензируемый журнал «Фармация и фармакология» https://www.pharmpharm.ru/jour/index 3. Научно-практический журнал «Фармация» https://pharmaciyajournal.ru/ 4. Ежемесячный научно-технический и производственный журнал «Химико-фармацевтический журнал» http://chem.folium.ru/index.php/chem/about 5. Журналы (электронные журналы): «Фармация», «Химико-фармацевтический журнал», «Фармация Казахстана» и др. 6. http://aknurpress.kz/login промо код SDN-28 База данных Скопус https://www.scopus.com/home.uri База данных Springer https://link.springer.com/
Литература <i>На русском языке:</i>	



основная:

1. Орехов, С. Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям: учебное пособие /С.Н.Орехов. - 2-е изд.,перераб. и доп.; М.: ГЭОТАР - Медиа, 2015. - 432 с
2. Жакирова Н.К. Фармацевтическая биотехнология: Учебное пособие /Н.К. Жакирова — Алматы: Эверо, 2020.
3. Жакирова, Н. К. Фармацевтическая биотехнология: учебное пособие / Н. К. Жакирова. - Алматы : ЭСПИ, 2021. - 272 бет.

На казахском языке:

1. Биофармация және дәрілік препараттарды биофармацевтік зерттеу: оқу құралы / Б. А. Сағындықова, Р. М. Анарбаева. - Қарағанды, 2021. –
2. Микроорганизмдер биотехнологиясы: оқу құралы /А.М.Есимова, М.Д.Касимбекова. - Қарағанды: Medet Group, 2019. - 420 б.
3. Жатқанбаев Ж.Ж. Биотехнология – Алматы: Эверо, 2020. – 396 бет. Жатқанбаев Ж.Ж.
4. Биотехнология : оқу құралы / Қ. Х. Әлмағамбетов [және т.б.].-Алматы: ЭСПИ, 2021. - 316 бет.

Дополнительно:

1. Фармацевтическая система качества и надлежащие фармацевтические практики : учебное пособие / Т.А.Арыстанова, Ж.М.Арыстанов. - Караганда : Medet Group, 2021. - 150 с.
2. Фармацевтическая биотехнология: рук. к практическим занятиям: учеб. пособие / С.Н.Орехов; под ред. В.А.Быкова, А.В.Катлинского М-во образования и науки РФ. - Рек. ГОУ ВПО Первый Московский гос. мед. ун-т им. И.М.Сеченова. - М.: ГЭОТАР - Медиа, 2013. - 384 с.
3. Биотехнология өндірісіндегі технологиялық сызба нұсқа: оқу құралы / А.М.Есимова. - Қарағанды: Medet Group, 2020. - 176 б.
4. Қазақстан Республикасының Мемлекеттік фармакопеясы. Т. 1. – Алматы: «Жібек жолы» баспа үйі, 2015. – 720 бет.
5. Қазақстан Республикасының Мемлекеттік фармакопеясы. Т. 3. – Алматы: «Жібек жолы» баспа үйі, 2014. – 864 бет.