

**Государственное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава РФ»**

**Кафедра управления и экономики фармации, фармацевтической технологии  
и фармакогнозии**

Кафедра управления и экономики фармации,  
фармацевтической технологии и фармакогнозии

## **ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ**

### **УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ**

**для подготовки к итоговой государственной аттестации  
студентов 5 курса фармацевтического факультета**

ОРЕНБУРГ - 2014

## **УДК 615.1(075.8)**

О.А. Дорохина, А.Н. Саньков, А.А.

«Основы биотехнологии». Учебное пособие. – Оренбург, 2014. – 43с.

Учебное пособие составлено на кафедре управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии ГБОУ ВПО ОрГМУ Минздрава РФ для студентов 5 курса фармацевтического факультета

Пособие составлено в соответствии с учебной программой и полностью отражает изучаемый курс по биотехнологии.

Основная цель, которая ставилась автором при подготовке этого методического пособия - систематизация знаний студентов - будущих провизоров в области биотехнологии лекарственных средств к итоговой государственной аттестации.

Методическое пособие содержит вопросы, информационный материал по наиболее затруднительным темам, схемы, необходимые при ответе на вопросы по биотехнологии, Рассматриваются примеры ответов на ситуационные задания по курсу биотехнологии.

### **Рецензенты:**

**Лебедева Е.Н.** - кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России.

**Середняк А.А.** - кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и физиологии растений ФГБОУ ВПО «Оренбургский государственный педагогический университет»

Учебное пособие рассмотрено и рекомендовано к печати РИС ГБОУ ВПО ОрГМУ Минздрава РФ

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

амп.	–	ампула
ГФ	–	Государственная Фармакопея
дл.	–	длина
конц.	–	концентрированный
ЛР	–	лекарственное растение
ЛРС	–	лекарственное растительное сырьё
Н.с.	–	номенклатурное сырьё
НТД	–	нормативно-техническая документация
Пр.р.	–	производящее растение
с.	–	страница
Сем.	–	семейство
ст.	–	статья
табл.	–	таблетка

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
Вопросы для подготовки к Итоговой государственной аттестации выпускников по курсу биотехнологии.....	8
Методы очистки, используемые в биотехнологии.....	9
Основные принципы и способы иммобилизации биопрепаратов.....	14
Пробиотики - определения, классификация, основные требования к штаммам, стадии получения.....	19
Основные разделы генетической инженерии.....	21
Особенности производства современных вакцин.....	24
Примеры ответов на ситуационные задачи.....	29
Схемы, необходимые при ответе на вопросы по биотехнологии.....	39
Библиография.....	43

## **ВВЕДЕНИЕ**

В дисциплине «Биотехнология» излагаются вопросы современного состояния важного направления научно-технического прогресса в фармации и медицине - получение с помощью макро- и микроорганизмов и промышленных катализаторов (ферментов) лекарственных средств. Изучение этой дисциплины связано с тем, что провизору необходимо знать основы получения с помощью биотехнологии широко применяемых в медицине групп лекарственных препаратов, таких как антибиотики, ферменты, витамины, пробиотики, гормоны и т.д.

Основная цель, которая ставилась автором при подготовке этого методического пособия, - систематизация знаний студентов - будущих провизоров в области биотехнологии лекарственных средств к итоговой государственной аттестации. На примере успехов, достигнутых в области микробного синтеза лекарственных веществ, получения культуры тканей лекарственных растений, применения ферментов в фармацевтической промышленности и генно-инженерной биотехнологии обобщены основные направления фармацевтической биотехнологии. Эти направления использованы при составлении ситуационных задач в материалах завершающего этапа (собеседования) итоговой государственной аттестации. Методические материалы содержат вопросы для подготовки к итоговой государственной аттестации выпускников по курсу биотехнологии, информационный материал по наиболее затруднительным темам, схемы, необходимые при ответе на вопросы по биотехнологии и список литературы для подготовки. Рассматриваются примеры ответов на ситуационные задания по курсу биотехнологии.

**Целью изучения данного направления является формирование профессиональных компетенций заявленных в ФГОС третьего поколения для специальности «Фармация»:**

ПК–5	способностью и готовностью к изготовлению лекарственных средств по рецептам врачей в условиях фармацевтических организаций, включая выбор технологического процесса, с учетом санитарных требований;
ПК–6	способностью и готовностью организовывать и проводить заготовку лекарственного растительного сырья с учетом рационального использования ресурсов лекарственных растений, прогнозировать и обосновывать пути решения проблемы охраны зарослей лекарственных растений и сохранности их генофонда;
ПК–31	способностью и готовностью определить перечень оборудования и реактивов для организации контроля качества лекарственных средств в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи и иными нормативными правовыми документами, организовывать своевременную метрологическую поверку оборудования;
ПК–33	способностью и готовностью определить способы отбора проб для входного контроля лекарственных средств в соответствии с действующими требованиями;
ПК–34	способностью и готовностью готовить реактивы для анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи
ПК–35	способностью и готовностью проводить анализ лекарственных средств с помощью химических, биологических и физико–химических методов в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи
ПК–36	способностью и готовностью интерпретировать и оценивать результаты анализа лекарственных средств
ПК–	способностью и готовностью проводить декларирование качества

40	лекарственных средств
ПК– 41	способностью и готовностью оказать консультативную помощь медицинским работникам и потребителям лекарственных средств и других фармацевтических товаров по правилам хранения лекарственных средств и других фармацевтических товаров с учетом их физико–химических свойств
ПК– 45	способностью и готовностью оказывать консультативную помощь населению по вопросам применения и совместимости лекарственных средств и других фармацевтических товаров
ПК– 48	способностью и готовностью работать с научной литературой, анализировать информацию, вести поиск, превращать прочитанное в средство для решения профессиональных задач (выделять основные положения, следствия из них и предложения)
ПК– 49	способностью и готовностью к участию в постановке научных задач и их экспериментальной реализации

## **ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ИТОГОВОЙ ГОСУДАРСТВЕННОЙ АТТЕСТАЦИИ ВЫПУСКНИКОВ ПО КУРСУ БИОТЕХНОЛОГИИ**

1. Определения, основные объекты и направления фармацевтической биотехнологии. Преимущества биотехнологии перед традиционными методами производства.

2. Методы очистки, используемые в биотехнологии. Виды Мембранной фильтрации. Хроматографические методы очистки (гель- фильтрация, аффинная хроматография).

3. Пробиотики: основная характеристика, классификация основные требования к штаммам, используемым для получения препаратов. Технологическая схема получения пробиотиков.

4. Бактериофаги - характеристика, технология, оценка качества, лекарственные формы.

5. Иммобилизация ферментов и клеточных структур. Характеристика физических и химических методов

6. Биотехнология витаминов. Особенности получения рибофлавина и  $\beta$ -каротина.

7. Использование культуры ткани лекарственных растений в производстве фитопрепаратов. Преимущества метода. Понятия тотипотентности и каллусообразования. Общая схема получения культуры ткани лекарственных растений и используемые методы выращивания. Номенклатура БАВ, выделяемых из культуры ткани растений.

8. Генно-инженерная биотехнология лекарственных средств. Основные разделы генной инженерии. Этапы получения генноизмененных клеток. Видоспецифические белки человека, получаемые методами генной инженерии. Преимущества генно-инженерных инсулинов.

9.Интерфероны: биологическая характеристика, классификация, технология, лекарственные препараты. Сравнительная оценка нативных и генно-инженерных интерферонов.

10.Основные проблемы биотехнологической экологии. Методы очистки сточных вод.

11.Особенности производства современных вакцин. Определение и состав вакцинных препаратов. Классические вакцины: живые, инактивированные (убитые), химические. Технологические особенности производства. Современные вакцины: вакцины с искусственными адъювантами, комбинированные, рекомбинантные, антидиотипические вакцины.

## **МЕТОДЫ ОЧИСТКИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ**

В настоящее время для очистки новогаленовых препаратов широко применяются методы очистки, используемые в биотехнологии. Основные сложности в разработке эффективных технологических методов выделения продуктов микробиологического, а также биоорганического синтеза связаны с их разбавленностью и многокомпонентностью. Размеры частиц этих веществ лежат в диапазоне от нано- до миллиметров, что сильно осложняет проблему их разделения. Большие проблемы при очистке возникают и в связи с нестабильностью биологических продуктов, чувствительных даже к незначительным изменениям температуры, рН, ионной силы и растворителя.

Все перечисленные особенности обусловили недостаточную эффективность таких традиционных методов химической технологии, как выпаривание, вымораживание, спиртовое или солевое осаждение или сепарация.

Наиболее перспективными и экономически целесообразными методами в технологии выделения и очистки биотехнологических продуктов являются **мембранные и хроматографические методы.**

Принцип **мембранной фильтрации** состоит в том, что отделяемые вещества задерживаются поверхностью фильтра, при этом сами эти вещества образуют на поверхности фильтра рабочий слой, который в свою очередь, работает как фильтр. Основными мембранами, используемыми в биотехнологии в рамках методов ультра- и микрофильтрации, являются пористые мембраны, изготовленные из гидрофильных полимеров. Широкое применение полимерных мембран обусловлено такими их достоинствами, как химическая и биологическая инертность, большой диапазон размеров пор, простота получения, дешевизна и др. Процесс фильтрации, как правило, проходит под давлением.

Процессы мембранной фильтрации нашли широчайшее применение в современных биотехнологических процессах. Можно выделить следующие этапы фильтрационной очистки продукта:

**Осветление** - этап производства, предназначенный для удаления осадочных частиц (суспензий), агрегатов и других осадков перед дальнейшей обработкой.

**Предфильтрация** - этап, спроектированный для продления срока службы последующего (финишного) фильтра. Предназначен для понижения загрязнения микрочастицами и уменьшения биологической нагрузки перед стерилизующей **фильтрацией**.

**Стерилизующая или финишная фильтрация** - этап обработки, предназначенный для производства стерильного фильтрата. **Ультрафильтрация** представляет собой процесс мембранного разделения растворов высокомолекулярных и низкомолекулярных соединений, а также фракционирования и концентрирования высокомолекулярных соединений, протекающий под действием разности давлений до и после мембраны.

К основным мембранным методам, применяющимся в современной биотехнологии, относятся: микрофильтрация, ультрафильтрация, а также обратный осмос. Характеристика этих методов представлена в табл. 1.

**Хроматографические методы очистки** основаны на взаимодействии вещества с твердой фазой (сорбентом). Белки, как правило, избирательно сорбируются на носителях самых различных типов.

Принцип метода гель-фильтрации заключается в следующем: крупные молекулы проникают между частицами сорбента, представляющего собой поперечно-сшитые декстрановые шарики, минуя большинство «сшивок» и пор, и, таким образом, достигают выхода из колонки быстрее, нежели низкомолекулярные вещества. Перед нанесением разделяемой смеси колонки, заполненные гелем, калибруют, нанося смесь белков с известной молекулярной массой и фиксируя объем элюции каждого из компонентов. В дальнейшем размер молекул исследуемого вещества определяют методом простой экстраполяции, сравнивая полученные профили элюции (выхода) с профилями калибрантов.

**Некоторые области практической применения мембранной фильтрации  
(Н.П. Елинов 1995 г.)**

<b>Процесс, Рабочее давление, МПа</b>	<b>Проходящие через мембрану вещества</b>	<b>Частицы и веще- ства, удержи- вающиеся мем- браной</b>	<b>Области исполь- зования</b>
<b>Микрофильтрация, 0,05</b>	Вода, растворенные вещества	Суспендирован- ные и коллоидные частицы, бактерии и другие микробы размером более 0,1 мкм.	Стерилизация растворов в био- технологических производствах, при разделении веществ
<b>Ультрафильтрация 0,5</b>	Вода, растворенные неорганические вещества	Бактерии, сус- пендированные и коллоидные час- тицы размером более 10-3 мкм., растворенные ор- ганические поли- меры с ММ 1 КДа	Очистка раство-ров биополимеров, концентри- рование, фрак- ционирование, освобождение от пирогенов.
<b>Обратный осмос 5</b>	Вода, растворен- ные высокопо- лярные низкомо- лекулярные ве- щества	Бактерии, вирусы, суспендиро- ваные и колло- идные частицы, растворенные не- органические ве- щества, органи- ческие вещества с ММ 0,2 кДа.	Концентрирование растворов в биотехнологии, глубокое обессо- ливание воды и т.д.

## Аффинная хроматография.

Абсолютно специфическим адсорбентом для любого белка считается антитело к этому белку, связанное с нерастворимой матрицей. В качестве примера использования аффинной хроматографии рассмотрим очистку рекомбинантного интерферона (ИФН) на иммуносорбенте с моноклональными антителами к ИФН (рис.1.)

Моноклональные антитела к ИФН "пришивают" к гранулам носителя и помещают в хроматографическую колонку (А). Затем на колонку наносят бактериальный экстракт, содержащий рекомбинантный ИФН (Б). С антителами связывается лишь ИФН, другие же компоненты экстракта, в том числе все бактериальные токсины, свободно проходят через колонку и удаляются промывным раствором. Для извлечения из колонки адсорбированного на антителах ИФНа через нее пропускают элюирующий буферный раствор, имеющий слабокислую реакцию (В). При этом связь между молекулами ИФНа и антителами нарушается. ИФН переходит с поверхности частиц, носителя в буферный раствор.

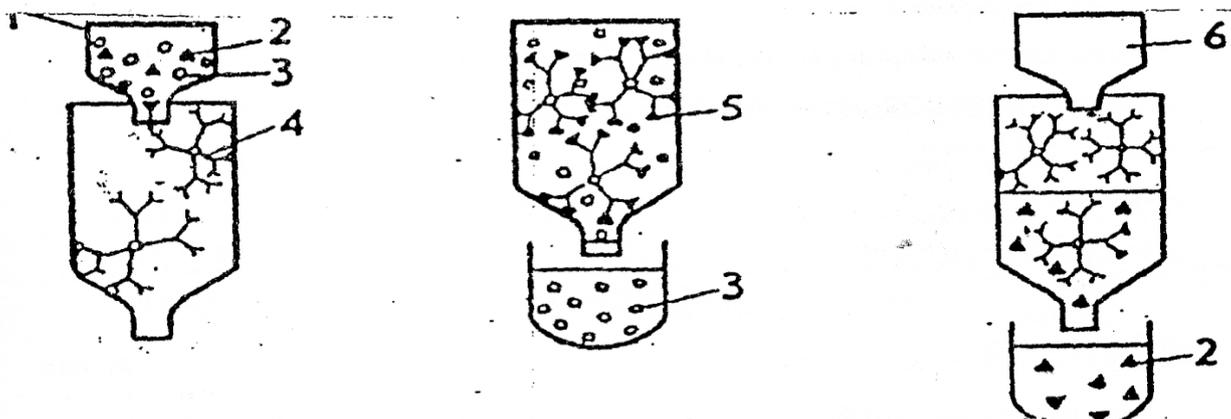


Рис. 1. Очистка рекомбинантного интерферона с использованием аффинной хроматографии.

1- диализат с ИФН (2) и другими бактериальными белками (3), 4 - моноклональные антитела (Мкат), 5 - ИФН ,связавшийся с Мкат, 6- слабая кислота

## **ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ И СПОСОБЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ БИОПРЕПАРАТОВ**

При использовании в практической медицине биопрепаратов, характеризующихся повышенной неустойчивостью к внешним факторам, первостепенное значение приобретает их стабилизация, как на стадии получения субстанции, так - и лекарственной формы. Результаты современных исследований позволяют выделить три основных направления, используемых для стабилизации биопрепаратов:

- защита лабильных центров биомолекул, ответственных за их активность химической или физико-химической модификацией (в том числе и иммобилизацией),
- нанесение на лекарственную форму защитных оболочек,
- введение в состав препаратов вспомогательных веществ и создание условий внешней среды биомолекул, ингибирующих разрушение структуры.

В основе первого способа стабилизации лежит модификация структуры путем проведения реакций алкилирования, карбоксилирования и другими химическими и биологическими методами. Так структурными изменениями естественных антибиотиков и гормонов удалось не только расширить спектр действия, но и значительно повысить стабильность субстанций этих соединений.

В случае глобулярных белковых структур, имеющих пространственное строение, и, как правило, содержащих комплекс веществ, для стабилизации необходимо использовать более сложные физико-химические взаимодействия. В этом случае наиболее целесообразно использовать **иммобилизацию** белковых структур, под которой понимается включение препарата в какую-либо изолированную фазу, которая отделена от фазы свободного раствора, но способна обмениваться с находящимися в последней молекулами субстрата. Метод, основанный на присоединении биомолекулы к основанной на присоединении биомолекулы к носителю, позволяет за счет многоточечного взаимодействия значительно увеличить устойчивость нативной структуры глобулы к разворачиванию. В настоящее время активно развиваются методы иммобилизации

клеток и субклеточных структур. В сравнении с иммобилизацией ферментов, в случаях иммобилизации клеток отпадает необходимость выделения и очистки чистых веществ, а также создается возможность получения полиферментных систем.

Методы иммобилизации подразделяют **на физические, и химические. В первом случае**, удерживание клетки носителем осуществляется за счет физических факторов: адсорбционно, сеткой полимерного геля с порами меньше размеров клетки, непроницаемой для клеток мембраной, электрическим полем и т.д. **Во втором случае**, между поверхностью клетки и материалом носителя создаются ковалентные связи, т.е. клетка химически «пришивается» к носителю, что, в свою очередь, осуществляется как на поверхности соответствующего нерастворимого материала, так и в объеме носителя.

#### **Характеристика физических методов иммобилизации.**

**Иммобилизация путем адсорбции.** В этом методе биообъект фиксируют на поверхности неорганических (силикагель, пористое стекло, песок, керамика, бентонит) и органических (целлюлоза, хитин и его производные, ионообменные смолы, оксиалкилметакрилат, глицидилметакрилат, нейлон, полиэтилен, полистирол) носителей. При этом механизм и прочность образуемой связи может быть различной:

- простое обрастание носителя через физическую адсорбцию (носитель выполняет роль арматуры),
- сорбция за счет ионных сил на микропористой ионнообменной смоле,
- впитывание синтетическими крупно пористыми материалами клеточной массы (используются материалы типа полиуретана).

Для данного способа иммобилизации характерно слабое влияние носителя на свойства биокаталитической системы. При этом ферменты сохраняют свою природную активность, клетки - жизнеспособность. В то же время непрочный характер связи носителя может привести к их десорбции, снижающей надежность метода. Из вышеперечисленных способов более длительную стабилизацию

обеспечивает ионообменное связывание, например, на модифицированных ионообменных целлюлозах.

**Механическое включение в полимерную матрицу.** Таким методом биообъекты вносят в полимерную структуру, получая гранулы, пленки, волокна, несущие препарат. Применяют как природные, так и синтетические полимерные материалы: альгинат, каррагинан, коллаген, желатин, целлюлозу, хитин, полиакриламид, фоточувствительные полимеры,

Способ включения биологического материала в полимерную структуру определяется спецификой полимера. Полимеризация альгината и каррагинана, добываемых из морских водорослей, зависит от  $\text{Ca}^{2+}$  (альгината) и  $\text{Al}^{3+}$ ;  $\text{Mo}^{2+}$ ;  $\text{Fe}^{3+}$ ;  $\text{K}^+$ ;  $\text{NH}_4^+$  (для каррагинана). Исходный объект вносят в раствор мономеров альгината /каррагинана и полученную смесь по каплям добавляют в водный раствор соответствующих катионов. Образуются сферические полимерные частицы, несущие иммобилизованные структуры. При использовании желатина и агар-агара биологический объект вносят в нагретый раствор этих полимеров с последующим охлаждением, вызывающего гелеобразование. При использовании полого волокна раствор, содержащий биокатализатор, вносят во внутренний губчатый объем полого волокна и далее волокно запечатывают с обеих сторон с помощью специальных методов. Данный метод перспективен для целых клеток. При этом клетки, как правило, сохраняют жизнеспособность и высокую каталитическую активность и способны реализовать многостадийные полиферментные реакции. В настоящее время включением в полимерный гель получены иммобилизованные ферменты - пероксидаза, глюкооксидаза, рибонуклеаза, холинэстераза,  $\alpha$ -амилаза и др.

**Иммобилизация путем инкапсулирования.** В этом методе биологические структуры покрывают специальными полупроницаемыми оболочками, изготовленными из различных материалов - целлюлозы, полиакрилата, полистирола, полиэфиров, полисульфонамидов, поликарбонатов, липидов с образованием сферических гранул.

Представляет интерес разработки по использованию фосфолипидных мембранных везикул в качестве капсул для ферментов, целых клеток и их органелл (включение в липосомы). При этом фермент остается в своем обычном водном окружении, что обеспечивает сохранение его активности и специфичности. Как и в случае гелей, мембрана микрокапсулы проницаема для низкомолекулярных субстратов, но непроницаема для фермента.

### **Характеристика химических методов иммобилизации.**

**Метод химической сшивки.** Для этого, как правило, используют реакции функциональных групп белков ( $\alpha$  и  $\epsilon$  - аминогруппы;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  - карбоксильные группы, сульфогидрильные группы цистеина, ароматические кольца тирозина и триптофана, имидазольная группа гистидина) с различными сшивающими агентами с образованием амидной связи. Реакцию проводят в среде водоотнимающего агента. Также проводят реакции между носителем и биокатализатором без участия сшивающих агентов. Одна из подобных реакций зависит от наличия в химической структуре носителя групп  $O=C-O-C=O$  (остаток малеинового ангидрида), которые вступают в прямое взаимодействие с аминогруппами катализатора, образуя пептидные связи.

Иммобилизация путем химического присоединения биокатализатора к носителю отличается высокой эффективностью и прочностью связи, длительным функционированием. Однако при ее использовании часто возникают диффузионные затруднения, искажение структуры биокатализатора.

Как особый случай химической сшивки можно рассматривать иммобилизацию клеток на носителях гидроксидов циркония, титана, олова и железа. Гидроксильные группы вытесняются из координационной сферы того или иного металла функциональными группами клеточных стенок. Между носителем и биокатализатором устанавливается координационная или ковалентная связь.

**Метод поперечных сшивок** - это химическое связывание ферментных молекул или клеток между собой с помощью би- или полифункциональных агентов (эпоксиполиимины, глутаровый альдегид, 2,4-толуолдиизоцианат, гексаметилендиизоцианат, хлорпроизводные триазины и т.д.) с образованием

конгломератов. Таким способом можно иммобилизовать ферменты лактатдегидрогеназу, глюкооксидазу, трипсин и др.

Достоинство этого метода - относительная простота его реализации. Однако участие в сшивках функциональных групп биокатализаторов часто ведет к нарушению их структуры и снижению активности. Иммобилизация клеток путем поперечных сшивок обычно связана с утратой их жизнеспособности.

## **ПРОБИОТИКИ – ОПРЕДЕЛЕНИЯ, КЛАССИФИКАЦИЯ, ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К ШТАММАМ, СТАДИИ ПОЛУЧЕНИЯ**

**Пробиотики** - препараты, состоящие из живых микроорганизмов или продуктов микробного происхождения, которые способствуют сохранению или восстановлению нормального состава кишечной микрофлоры. Идея о бактериотерапии принадлежит И.И. Мечникову. Бактерийные препараты широко применяются для лечения и профилактики дисбактериозов. Особенно важны в детской практике, т.к. являются физиологическими и безвредными для организма.

**По составу действующих веществ** современный арсенал пробиотиков целесообразно разделить на 5 основных групп:

- классические монокомпонентные пробиотики;
- поликомпонентные пробиотики,
- комбинированные препараты,
- самоэлиминирующие антагонисты,
- препараты, содержащие продукты метаболизма бактерий нормофлоры.

Классические **монокомпонентные** пробиотики содержит один штамм бактерий. К ним относятся: колибактерин, бифидумбактерин, лактобактерин.

**Поликомпонентные** пробиотики содержат два и более штамма бактерий-пробиотиков. К препаратам этой группы относятся бификол, ацилакт, линекс, бифиформ. В состав **комбинированных** препаратов входит комплекс бактерий с каким-либо лекарственным веществом (аципол).

**Самоэлиминирующие** антагонисты представляют собой бактерии, несвойственные для нормальной микрофлоры человека и удаляющиеся из организма после курса лечения. К этой группе относятся препараты, изготовленные на основе живых апатогенных антагонистически активных представителей рода *Bacillus subtilis*. К группе **препаратов, содержащих продукты метаболизма бактерий** нормофлоры человека, относятся хилак-форте («Merckle GmbH», Германия), гастрофарм («Pharmachim», Болгария) и биофлор (Belbo Ltd., Израиль).

**Основные требования к штаммам микроорганизмов, используемым в качестве пробиотиков.** Они должны :

- быть изолированы из организма человека,
- обладать лечебным воздействием на организм человека, подтвержденным лабораторными и клиническими исследованиями,
- при длительном использовании не вызывать побочные эффекты,
- обладать колонизационным потенциалом, т.е. сохраняться в пищеварительном тракте до достижения максимально положительного действия,
- обладать стабильными характеристиками, как в технологическом, так и в клиническом плане,
- обладать высокой скоростью роста и размножения в условиях, близким к таковым в кишечном тракте,
- при введении в больших количествах обладать минимальной способностью к транслокации из просвета пищеварительного тракта во внутреннюю среду макроорганизма,
- иметь четкую физиолого-биохимическую и генетическую группировку.

**Основные этапы технологического процесса** производства пробиотиков складываются из работы с производственными штаммами, накопления биомассы с применением глубинного метода культивирования и лиофильного высушивания препарата, расфасованного в флаконы. В ходе работы со штаммами, их активизируют путем ряда пассажей на питательной среде. Для глубинного культивирования используют казеино-дрожжевую среду (получение лактобактерина), процесс проводят при 37°C с перемешиванием, подачей воздуха, азота и введением в качестве питательного субстрата 40 % раствора глюкозы. При культивировании в течение 8-10 ч. получают бактериальные взвеси, содержащие 10-15 млрд. живых бактерий в 1 мл. Перед лиофилизацией в бактериальную взвесь добавляют защитную среду, в состав которой входят сахароза, желатоза и обрат молока в количестве 10-20%. Флаконы с сухим препаратом укупоривают в атмосфере инертного газа.

Основными показателями качества пробиотиков являются содержание живых микроорганизмов и их антагонистическая активность.

## ОСНОВНЫЕ РАЗДЕЛЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Генетическая инженерия — это методы получения рекомбинантных ДНК, объединяющих последовательности разного происхождения (метод р ДНК-технологии).

Генетическую инженерию подразделяют на генную инженерию, геномную инженерию и хромосомную инженерию (табл.2).

Сущность генной инженерии состоит в целенаправленном использовании перестроек естественного генома, осуществляемых *in vivo* или *in vitro*, для изменения генетических характеристик известных вирусов и клеток.

В качестве примеров генной инженерии ***in vivo*** можно назвать: транслокацию (перемещение) в вирусные геномы некоторых клеточных генов, придающих вирусам свойство онкогенности. Примером генной инженерии ***in vitro*** является создание молекулярных химер из фрагментов ДНК разного происхождения, включение их в реципиентные клетки *E.coli*, *Bac.subtilis* и др. с последующим культивированием этих организмов в целях получения необходимых белковых продуктов (пептидных гормонов, ферментов и т.д.).

Сущность геномной инженерии заключается в целенаправленной глубокой перестройке генома акариот, прокариот или эукариот, вплоть до создания новых видов.

При геномной инженерии возможно получение половых (слияние гамет) или соматических гибридов. Половые гибриды получают либо в естественных, либо в экспериментальных условиях. Соматические гибриды способны формироваться лишь в искусственных условиях у клеточных форм. Примером естественной (природной) геномной инженерии является рекомбинация геномов вирусов гриппа, относящихся к типу А.

Таблица 2.

## ОСНОВНЫЕ РАЗДЕЛЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Содержание	Этапы	Инструментарий	Методы переноса генов
Конструирование организмов с несвойственными данному виду признаками	<b>In vivo:</b> извлечение генов, их перенос и закрепление в новом генетическом окружении, экспрессия генов	Вирусы, плазмиды и траспозоны	Трансдукция, конъюгация, траспозиция.
	<b>In vitro:</b> синтез или выделение генов, модификация генов, замена промоторов и терминаторов, локализованный мутагенез, присоединение генов к векторным молекулам, введение генов в клетки, их клонирование и экспрессия	Рестриктазы и другие нуклеазы, ДНК-лигазы, обратная транскриптаза и другие ДНК-РНК-полимеразы. Векторы, зонды и др.	Трасформация(химическая, электропорация, ускоренными частицами, липосомами), микроинъекция в ядра эукариот.

## ГЕНОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Содержание	Объект	Методы конструирования
Конструирование организмов НОВЫХ ВИДОВ	Вирусы	Рекомбинация <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>
	Клетки прокариот	Межвидовая конъюгация и слияние протопластов
	Клетки эукариот	Слияние растительных протопластов и животных клеток, введение в клетки изолированных метафазных хромосом, микроинъекции хромосом в ядра, перенос изолированных митохондрий и хлоропластов.

Впервые соматические гибриды клеток млекопитающих были получены при конструировании гибридом, продуцирующих моноклональные антитела.

Совместив способности миелом к длительному культивированию в условиях *in vitro*, а В-клеток продуцировать антитела. Г. Келер и К. Мильштейн (1975) получили гибрид, секретирующий моноклональные антитела. Для этих целей они использовали мышинные клетки миеломы и нормальные В-клетки селезенки мыши, иммунизированной заданным антителом. Подобные гибридные клетки широко используются для получения различного рода моноклональных антител, применяемых в диагностических, лечебных и других целях.

Методы **генной инженерии**, основанные на методах рекомбинантных ДНК, в настоящее время наиболее широко используются в производстве лекарственных препаратов.

## **ОСОБЕННОСТИ ПРОИЗВОДСТВА СОВРЕМЕННЫХ ВАКЦИН**

**К вакцинам** относятся препараты, получаемые из бактерий, вирусов, грибов, простейших, а также из продуктов их жизнедеятельности, предназначенные для активной иммунизации с целью профилактики и терапии инфекционных, грибковых и паразитарных болезней. В арсенале современной иммунопрофилактики более 100 эффективных вакцинных препаратов, которые отличаются по составу, назначению, способу применения и эффективности. Независимо от этих признаков их можно разделить на живые, убитые

(инактивированные) и химические.

**Живые вакцины** получают, используя аттенуированные (ослабленные) штаммы бактерий и вирусов. Основным свойством вакцинных штаммов, принципиально отличающих их от патогенных, является стойкая утрата ими способности вызывать в организме человека типичное инфекционное заболевание.

### **Методы получения аттенуированных штаммов**

1. Путем селекции спонтанно возникших вакцинных штаммов с ослабленной вирулентностью (туляремиальная и бруцеллезная вакцины).

2. Длительное культивирование в неблагоприятных условиях.

3. Путем длительного пассирования в организме невосприимчивых животных или на куриных эмбрионах - метод адаптации к новому хозяину (вирусные вакцины).

4. Методом гибридизации «актуальных» эпидемических штаммов вируса с холодоадаптированными штаммами, безвредными для человека (гриппозные вакцины).

5. Воздействием на патогенные культуры мутагенами различной природы с последующим отбором непатогенных вариантов, сохранивших иммунные свойства.

Живые вакцины создают прочный и длительный иммунитет, по напряженности приближающийся к постинфекционному иммунитету. Для создания прочного иммунитета во многих случаях достаточно одной инъекции

вакцины. Такие вакцины могут вводиться в организм достаточно простым методом, например, скарификационным или пероральным методом. Для сохранения жизнеспособности микроорганизмов и специфической активности препарата большинство живых вакцин выпускается в сухом лиофилизированном виде. Такие вакцины имеют достаточно длительный (до года и более) срок годности. Живые вакцины следует хранить и транспортировать при 4-8 °С. Замораживание таких вакцин не оказывает существенного влияния на их активность. В живых вакцинах нет консервантов. Инфекции, для профилактики которых применяются живые вакцины: грипп, корь, полиомиелит паротит (вирусные вакцины), сибирская язва, туберкулез, сыпной тиф, туляремия, чума, бруцеллез (бактериальные вакцины).

**Инактивированные** (убитые) корпускулярные вакцины получают путем инактивации бактерий или вирусов физическими или химическими мутагенами: прогревание при температуре 50-60°C, обработка ультрафиолетовыми лучами или формалином, спиртом, фенолом и другими веществами с сохранением корпускулярности.

Храниться вакцины должны при температуре 4–8 °С, замораживание жидких инактивированных вакцин ведет к уменьшению активности препаратов и повышению их реактогенности .

Инактивированные вакцины обладают в целом более низкой иммуногенной эффективностью по сравнению с живыми вакцинами, но при повторном введении создают достаточно стойкий иммунитет, предохраняя привитых от заболевания или уменьшая его тяжесть. Инфекции, для профилактики которых используются инактивированные (убитые) вакцины: бешенство, грипп, клещевой энцефалит (вирусные вакцины), коклюш, холера, гепатит- А, брюшной тиф, лептоспироз, сыпной тиф ( бактериальные вакцины). Лечебные вакцины (гонококковая вакцина, дизентерийная вакцина, стафило-кокковая вакцина).

#### **Этапы получения живых и убитых вакцин.**

1.Выбор штамма и разработка условий его культивирования.

2.Накопление биомассы клеток в биореакторах после предварительного внесения посевного материала.

3.Концентрирование биомассы.

4.Инактивация культуры в случае получения убитой вакцины и выделение клеток живой вакцины.

5. Стандартизация.

**Химические вакцины** готовят из антигенов, извлекаемых из микробных клеток или вирусов. В отличие от корпускулярных, химические вакцины вызывают защиту против определенных патогенных субстанций возбудителя и не содержат избыточного количества балластных структур. Химические вакцины готовят из поверхностных структур вирусных частиц или микроорганизмов (капсидов и суперкапсидов вирусов, клеточных стенок и мембран бактерий), содержащих антигены, обладающие протективной активностью. К этой группы вакцин относятся также и анатоксины, представляющие собой препараты, полученные из бактериальных экзотоксинов, обезвреженных длительным воздействием формалина при повышенной температуре.

#### **Этапы производства химических вакцин:**

1.Наработка биомассы клеток возбудителя.

2.Выделение протективного антигена путем дезинтефации вирионов или экстракции из клеток с использованием органических растворителей.

3.Очистка антигена (используют: ультрафильтрацию, центрифугирование в градиенте концентрации сахарозы, гель-фильтрацию, хроматографию на ионообменниках, аффинную хроматографию).

4.Стерилизация вакцины.

5.Стандартизация и контроль качества вакцины.

Преимущество химических вакцин - их потенциальная не реактогенность и безвредность в отличие от живых или убитых вакцин, у которых сохраняется носитель генетической информации, и поэтому у живых вакцин имеется опасность реверсии к дикому типу. Химические вакцины обладают слабой реактогенностью, более стабильны и могут вводиться в больших дозах без побочных эффектов. Для

повышения иммуногенности химических вакцин применяют адъюванты, которые способствуют длительному циркулированию протективного антигена в организме. Инфекции, для профилактики которых используют химические вакцины: грипп, менингококковая инфекция, вирус ящура и клещевого энцефалита.

Среди **современных вакцин** необходимо выделить следующие: **Вакцины с искусственными адъювантами**. Принцип создания вакцин с искусственными адъювантами заключается в использовании естественных антигенов и синтетических носителей. Одним из вариантов таких вакцин является гриппозная вакцина, состоящая из белков вируса гриппа (гемагглютинина и нейраминидазы) и искусственного иммуномодулятора – полиоксидония, обладающего выраженными адъювантными свойствами.

**Комбинированные вакцины.** Разработка комбинированных вакцин обычно проводится на основе существующих монопрепаратов. Использование комбинированных вакцин уменьшает количество визитов к врачу, необходимых при отдельной иммунизации, обеспечивая тем самым более высокий (на 20%) охват детей прививками в декретируемые сроки. Помимо этого, при использовании комбинированных препаратов в значительной степени снижается травматизация ребенка, а также нагрузка на медицинский персонал.

К комбинированным вакцинам, выпускаемым в России, относятся вакцины АКДС, менингококковая А+С, а также АДС-анатоксины. За рубежом выпускаются следующие комбинированные вакцины; вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка и полиомиелита (инактивированную) – Тетракок 05; вакцину против коклюша, дифтерии, столбняка, полиомиелита (инактивированную) и гемофильной инфекции типа b – ПЕНТАктХИБ; вакцину против кори, краснухи, эпидемического паротита – ММР, Приорикс, НПО «Биомед» (гПермь) совместно с НПК «Комбиотех» (г.Москва) разработали комбинированные вакцины Бубо-М и Бубо-Кок для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша и гепатита В.

Генно-инженерные вакцины - препараты, полученные с использованием рекомбинантных клеток. Принцип создания **генно-инженерных вакцин** заключается в том, что в геном живых аттенуированных вирусов, бактерий,

дрожжей или клеток эукариотов (вектор) встраивается ген, кодирующий образование протективного антигена того возбудителя, против которого будет направлена вакцина. Успешно реализовано применение генно-инженерных методов в создании противовирусных вакцин.

В процессе создания **рекомбинантных** вакцин можно выделить несколько стадий:

1.Выделение или получение гена, кодирующего протективный антиген.  
2.Внедрение гена в экспрессирующий вектор (плазмида, фаг, вирус) и введение в перmissive клетку.

3.Культивирование модифицированного микроорганизма *in vitro*.  
4,Выделение и очистка требуемого антигенного продукта, используемого затем как вакцинный препарат.

**Антиидиотипические вакцины** коренным образом отличаются от ранее описанных методик получения вакцин. Их суть заключается в изготовлении ряда моноклональных антител к идиотипам молекул иммуноглобулина, обладающего протективной активностью. Препараты таких антиидиотипических антител по своей пространственной конфигурации подобны эпитопам исходного антигена, что позволяет использовать эти антитела взамен антигена для иммунизации. Подобно всем белкам, они способствуют развитию иммунной памяти, что весьма важно в тех случаях, когда введение соответствующих антигенов не сопровождается ее развитием.

## ПРИМЕРЫ ОТВЕТОВ НА СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

### Ситуационная задача № 1.

**Перечислите видоспецифические белки человека, получаемые методами генной инженерии. Укажите преимущества инсулина, полученного методом генетической инженерии, в отличие от инсулина, выделенного из животного сырья.**

В настоящее время с помощью генно-инженерной технологии осуществляется производство инсулина, соматостатина, соматотропина, интерферонов. В различных лабораториях получены рекомбинантные ДНК для синтеза белково-пептидных гормонов гипофиза и гипоталамуса. Основными преимуществами получения **видоспецифических** для человека **белков** путем микробиологического синтеза являются исключение дефицитного сырья и снятие этических проблем.

**Биосинтез инсулина человека** клеткой кишечной палочки - одно из величайших достижений генной инженерии, поставленных на службу человечеству. Так, в 1985 году во всем мире было зарегистрировано 70 миллионов больных диабетом, из них только 4 миллиона получили препарат инсулина.

Инсулин - гормон, вырабатываемый эндокринными железами, был исследован в 1900 году нашим соотечественником Л.В.Соболевым. В его работах впервые показано, что уровень сахара в крови, регулируется специальным гормоном, продуцируемым особыми клетками поджелудочной железы. Через 21 год английские исследователи Бантинг и Бест выделили из этих клеток инсулин.

В 1922 году инсулин, выделенный из поджелудочной железы собаки, был впервые введен девятилетнему мальчику, больному диабетом. Результат превзошел все ожидания. Уже через год американская компания «Эли Лилли» выпустила первый препарат животного инсулина.

Животный инсулин получают из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Опытный персонал на бойнях по разработанной методике осуществляет извлечение желез из туш, быстрое их замораживание. Затем в вагонах -

рефрижераторах они отправляются на фармацевтические предприятия. Поджелудочная железа коровы весит 200-250 грамм, для получения 100 грамм кристаллического инсулина требуется 1000 кг исходного сырья. Инсулины животных, в виду силовой специфичности, обладают негативными побочными эффектами: нарушение работы почек, расстройство зрения, аллергические проявления.

Аминокислотная последовательность человеческого инсулина была определена Сэнгером еще в 1955 году. Было установлено, что инсулин состоит из двух аминокислотных цепей А и В длиной 20 и 30 аминокислот. В 1963-1965 годах коллективами исследователей США, ФРГ и Китая был проведен синтез обеих цепей и соединение их дисульфидными связями для получения инсулина. Однако осуществить в промышленном масштабе дорогостоящий и сложный синтез, который включает 170 химических реакций, оказалось трудно.

В 1980 году датской компанией «Ново индастри» разработан метод ферментативного превращения инсулина свиньи в инсулин человека замещением остатка аланина в В-цепи на треонин. При хроматографической очистке продукта получен препарат с 99% чистоты.

Получение инсулина генно-инженерным методом было выполнено также в начале 80-х гг. В качестве компетентной клетки использовали *E. coli*. Гены обеих цепей молекулы человеческого инсулина были получены методом химического синтеза. Эти гены присоединяли к 3' -концу гена, кодирующего белок  $\beta$  - галактозидазу, и вводили в векторную плазмиду. Трансформированные клетки *E. coli* синтезировали химерные белки, состоящие из А- и В- цепи инсулина, присоединенных через метионин к

3 -галактозидазе. При помощи бромциана, специфически расщепляющего белки по остатку метионина, выделяли индивидуальную цепь инсулина. Далее цепи соединяли в активную молекулу инсулина.

### **Ситуационная задача № 2.**

**Провизор-стажер получил задание к выпускной работе «Особенности производства новогаленовых препаратов».**

При ответе на данную ситуацию изложите основные положения данной темы (преимущества новогаленовых препаратов, способы получения). Назовите возможные варианты очистки, включая методы, используемые в биотехнологии, обоснуйте преимущества хемосорбции перед другими методами.

### **Ситуационная задача № 3.**

**Для лечения вирусных заболеваний глаз врачи часто назначают глазные капли с интерфероном (ИФН). Рассмотрите биологическую природу препарата, классификацию, основные технологические стадии получения а-ИФН. Приведите сравнительную характеристику нативных и генно-инженерных ИФН.**

**Интерфероны (ИФН)** представляют собой гликопротеиды с молекулярной массой 20000-30000 и специфической активностью, равной или превышающей  $10^9$  на 1 мг белка. Они синтезируются *in vitro* и *in vivo* в ответ на воздействие природных (вирусы, эндотоксины, внутриклеточные паразиты) и синтетических (высоко- и низкомолекулярных) индукторов; действуют на внутриклеточные этапы репродукции широкого круга РНК- и ДНК-содержащих вирусов, ингибируя трансляцию вирусных информационных РНК и их биосинтез.

Интерфероны не токсичны, не повреждают нормальных функций клеток (энергетический обмен, синтез макромолекул), но подавляют размножение быстро делящихся клеток, включая опухолевые.

Наиболее детально изученным биологическим свойством интерферонов является их противовирусная активность, которая характеризуется универсальностью, тканевой специфичностью, действием по типу катализаторов и внутриклеточной точкой приложения.

## Классификация интерферонов

В 1980 г. комитетом экспертов Всемирной организации здравоохранения была принята и рекомендована к использованию классификация, согласно которой все ИФН человека подразделяют на 3 класса. Они кодируются разными генами и имеют характерную для каждого класса последовательность аминокислот, из которых построены их молекулы. При наличии рекомбинантных вариантов ИФН их обычно обозначают римскими буквами.

Таблица 3.

### Классификация интерферонов человека

<b>Класс ИФН</b>	<b>Используемое наименование</b>	<b>Индуктор</b>	<b>Клетки-продуценты</b>
Лейкоцитарный	ИФН-а	вирус	лейкоциты периферической крови
Фибробластный	ИФН-р	вирус	фибробласты
Иммунный	ИФН-у	митоген специфический антиген.	лейкоциты периферической крови или Т-лимфобласты лимфоциты

Технологическая схема биосинтеза ИФН- $\alpha$ 

<i>Технологическая стадия.</i>	<i>Условия</i>
<b>ТП-1.</b> Получение чистых лейкоцитов	Отделение плазмы от лейкоэритроцитомассы центрифугированием, фракционирование лейкоцитомассы в присутствии осадителя (метилцеллюлозы) с последующим гемолизом. При этом образуется 3 слоя, раствор метилцеллюлозы с лейкоцитами (верхний слой), лейкопленка (средний слой) и осадок эритроцитов (нижний слой). 2 верхних слоя подвергают центрифугированию и ресуспендированию осадка в питательной среде.
<b>ТП 2.</b> Прайминг(активирование метаболизма лейкоцитов)	Лейкоциты 10-20 млн/мл в среде № 199 с 5% плазмы донорской крови, -2-Юч, 37,5°C 3 ед./мл гепарина, 0,0015 ед./мл инсулина, 200 МЕ/мл нативного ИФН
<b>ТП-3.</b> Получение вируса индуктора.	В качестве индуктора интерферогенеза используют вакцинный штамм вируса Сендай. Предварительное культивирование вирусов проводят в развивающихся 9-11 суточных куриных эмбрионах. Основные технологические операции: овоскопия, отбраковка, инкубирование куриных эмбрионов, введение инфекционной взвеси в аллантоисную полость с

	<p>последующим инкубированием в течение 48-72 часов и стягиванием инфицированной жидкости с погибших куриных эмбрионов. Вирусосодержащую аллантоисную жидкость центрифугируют</p>
<p><b>ТП-4.</b> Введение вируса-индуктора.</p>	<p>Введение вируса -индуктора в дозе Индукция 1 ч, 37,5°С 5 РЦД50 на 1 лейкоцит в реактор с лейкоцитами с последующим центрифугированием при 600 x <math>\delta</math> -15 мин., Сбор осадка индуцированных клеток.</p>
<p><b>ТП-5.</b> Биосинтез. 18 ч, 37,5°С</p>	<p>Суспензионная культура в взвешенном слое. Оптимальные условия для получения высоких титров ИФН-а создаются при культивировании лейкоцитов в круглодонных колбах, накрытых фольгой, заполненных клеточной взвесью наполовину, при постоянном перемешивании.</p> <p>Инактивацию вируса-интерфероногена осуществляют доведением рН среды до 2,2-2,4 и экспозицией полуфабриката не менее 7 суток.</p>
<p><b>ТП-6.</b> Очистка интерферона</p>	<p>Поэтапно: осветляющая, ультрафильтрация, стерилизующая фильтрация</p>
<p><b>ТП-7.</b> Контроль полуфабриката</p>	<p>Контроль на стерильность, интерферона. Противовирусную активность, специфическую безвредность, анализ на специфические примеси, токсичность,</p>

	отсутствие микоплазм.
<b>ТП-8.</b> Стандартизация препарата	Разведение препарата до требуемой специфической активности и доведения значения рН
<b>ТП-9.</b> Розлив препарата в ампулы.	Розлив осуществляют с помощью полуавтоматических дозаторов в ампулы.
<b>ТП-10.</b> Сублимационное высушивание.	Замораживание препарата и сублимация. Запайка ампул препаратом в атмосфере азота.
<b>ТП-11.</b> Контроль готового	Контроль на стерильность, препарата. противовирусную активность, токсичность, рН, растворимость, специфическую безвредность.
<b>УМО-12.</b> Упаковка, маркировка	

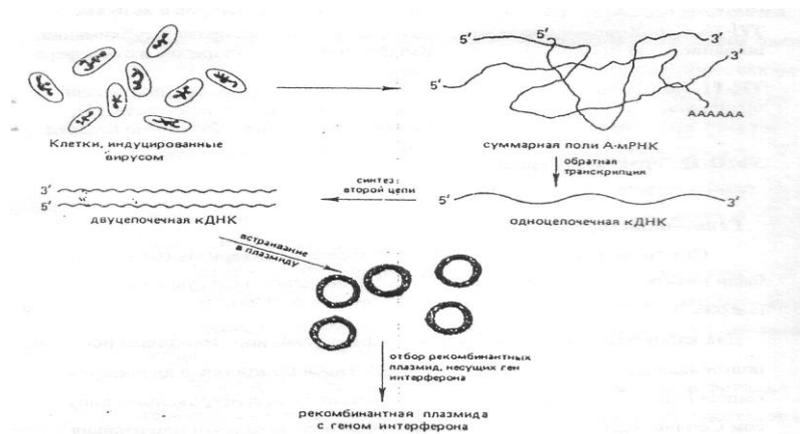
### Генно-инженерные интерфероны

Опыты по переносу генов ИФН человека в бактериальные клетки были начаты в конце 70-х годов. Суть заключалась в следующем (см.рис. 2).

Для клонирования гена  $\alpha$ -ИФН в качестве исходного материала использовали фракцию 12 S поли (А) мРНК (информационная аденилированная РНК), полученную из клеток лейкоцитов, индуцированных вирусом Сендай. На базе информационной РНК получена комплементарная ей ДНК, состоящая из 2 цепей. Полученная двухспиральная ДНК была расщеплена с помощью рестриктаз с образованием липкого конца олиго-dG. Аналогичная операция была проведена с плазмидой с образованием липкого олиго-сЮ-конца. С помощью лигаз

осуществлено встраивание комплементарной ДНК, содержащей информацию о структуре  $\alpha$ -ИФН в плазмиду pBR322.

Эта плазида несет в своем составе гены, определяющие устойчивость к двум антибиотикам: тетрациклину и ампицилину. Вставка ДНК интерферона инактивирует ген, ответственный за устойчивость к ампицилину, поэтому первичный отбор клеток, получивших гибридные плазмиды, проводили по устойчивости к тетрациклину.



рекомбинантная плазида  
с геном интерферона

Рис.2. Схема клонирования генов интерферонов человека

Для отбора нужных клонов использовали следующий метод: смесь нескольких плазмид из разных клонов, одна из которых может содержать ДНК интерферона, денатурируют и связывают с твердой подложкой, с этой ДНК гибридизируют образцы РНК, полученные из продуцирующих ИФН клеток человека. Фильтры промывают, элюируют РНК в денатурирующих условиях и элюат инъецируют в овоциты африканской зеленой лягушки для выявления мРНК интерферона. Среди клонов выбран один, названный Hif-2h, имеющий вставку соответствующую размеру полного гена  $\alpha$ -ИФН.

В СССР первое успешное клонирование гена лейкоцитарного интерферона описано в 1982г. акад. Овчинниковым, фибробластного в 1983 г. - Ю.И. Козловым, иммунного - в 1985 г. Е.Д. Свердловым.

Экспрессия генов ИФН произведена не только в клетки кишечной палочки, но и в клетки грамотрицательных бактерий *Pseudomonas*. Этот способ лежит в основе промышленного производства ИФН в России (НПО «Вектор»).

Расширение использования рекомбинантных (**генно-инженерных**) ИФН и параллельное сокращение в последнее время применения нативных препаратов связано, главным образом, с дефицитом сырья для производства последних (донорская кровь). Современные технологии очистки позволяют получить высококонцентрированные препараты генно-инженерных интерферонов. Однако, на современном уровне **рекомбинантные ИФН** — это лишь воспроизведенные отдельные субтипы ИФН (продукты) одного гена, что сказывается на потенциале терапевтической активности. Идеальный препарат должен, подобно нативному, иметь их физиологически сбалансированное сочетание. Семейство ИФН-а содержит около 20 подтипов, поэтому природные препараты многокомпонентны и содержат все или по крайней мере большинство из подтипов.

Кроме того, природные ИФН не обладают антигенными свойствами и не вызывают сенсibilизации при длительном многократном введении. Некоторые рекомбинантные ИФН, напротив, при введении инъекционным путем могут вызвать образование нейтрализующих или связывающих антител. На пример, наиболее часто используемые рекомбинантные ИФН-а<sub>2а</sub> (Реаферон, Роферон), ИФН-а<sub>2б</sub> (Интрон А, Реальдирон), являются аналогами природных подтипов с точечными мутациями в белковой структуре *lis-his*, *arg-his*, *arg-arg*, соответственно, которые мало влияют на активность, но существенны с точки зрения сенсibilизации. Лекарственные препараты **ИФН**.

К настоящему времени определен круг заболеваний, при которых эффективно использование ИФН. Из вирусных инфекций - это ОРВИ, грипп, энцефалиты, вирусные гепатиты, герпетические поражения (конъюнктивиты, кератоконъюнктивиты) слизистых оболочек и глаз. По мнению клиницистов, при герпетических поражениях кожи и слизистых оболочек следует отдавать предпочтение местному применению препарата. ИФН нашел применение при

пересадках органов как средство, предупреждающее вторичные вирусные инфекции.

Лекарственные формы ИФН-а, разрешенные к медицинскому применению включают природные (нативные) и рекомбинантные. Препараты природного ИФН-а в зависимости от методов очистки можно разделить на две группы - нативные и концентрированные.

Препараты нативного типа по белковому составу практически не отличается от исходных полуфабрикатов, характеризуются невысокой удельной активностью - до  $10^4$  МЕ на 1 мг белка, но сохраняют все цитокины, продуцированные в процессе интерферогенеза, в их естественном соотношении. Поэтому они обладают высоким потенциалом иммунобиологического действия. К этим препаратам относятся человеческий лейкоцитарный ИФН для интраназального применения, мазь и суппозитории с ИФН.

Биотехнология концентрированных препаратов включает химическую очистку, что приводит к снижению иммунобиологического потенциала из-за утраты цитокинов. Однако эти препараты представляют также ценность для практического здравоохранения. Например, высококонцентрированный человеческий лейкоцитарный ИФН - ЧЛИ для инъекций - пока незаменим в ситуациях, когда необходимо ввести высокие разовые дозы (лимфобластный лейкоз в стадии обострения), а также при лечении вирусных и онкологических поражений, локализованных за гематоэнцефалическим барьером.

К препаратам концентрированного типа относится и глазные капли «Локферон», представляющие собой лиофилизированный порошок с противовирусной активностью не менее 8000 МЕ/флакон. Локферон успешно применяется для местного лечения вирусных поражений глаз. В группу рекомбинантных ИФН входят реаферон, реальдон, интрон А и виферон.

Реаферон (человеческий рекомбинантный ИФН-а.2) производства НПО «Вектор» г. Новосибирск получен при культивировании бактериального штамма *Pseudomonas sporogenosa*, содержащего в своем генетическом аппарате встроенную рекомбинантную плазмиду гена ИФН-а2 человека.

## Инtron А

(человеческий рекомбинантный ИФН-а2b) фирмы Schering Plough - США получен по рекомбинантной ДНК-технологии с использованием бактериальных *E.coli*, содержащих встроенный генно-инженерным путем ген, кодирующий этот человеческий белок. Эти препараты широко используются для лечения волосатоклеточного лейкоза, множественной рецидивирующей миеломы у пациентов, нечувствительных ко всем видам химиотерапии, а также саркомы Капоши, ассоциированной со СПИДом.

Введение больших доз белка сопровождается повышением температуры, появлением головной боли, расстройством желудочно-кишечного тракта (тошнота, иногда обострение гепатита), возникают нарушения в работе сердечно-сосудистой системы. На основании изучения онтогенеза системы ИФН разработан новый отечественный препарат «Виферон»-суппозитории, включающие в себя рекомбинантный ИФН-а и препараты антиоксидантного действия (токоферол ацетат, аскорбиновая кислота). «Виферон» положительно зарекомендовал себя в педиатрической практике.

## СХЕМЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ ОТВЕТЕ НА ВОПРОСЫ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ.

1. Характеристика основных методов иммобилизации биопрепаратов.
2. Общая схема получения культуры ткани лекарственных растений.
3. Схема рекомбинации ДНК ин витро.
4. Схема получения инсулина генно-инженерным методом
5. Технологическая схема биосинтеза лейкоцитарного интерферона.
6. Схема клонирования генов интерферонов человека,
7. Схема очистки рекомбинантного интерферона с использованием аффинной хроматографии.
8. Устройство биофильтра и аэротенка.
9. Этапы производства основных вакцин.

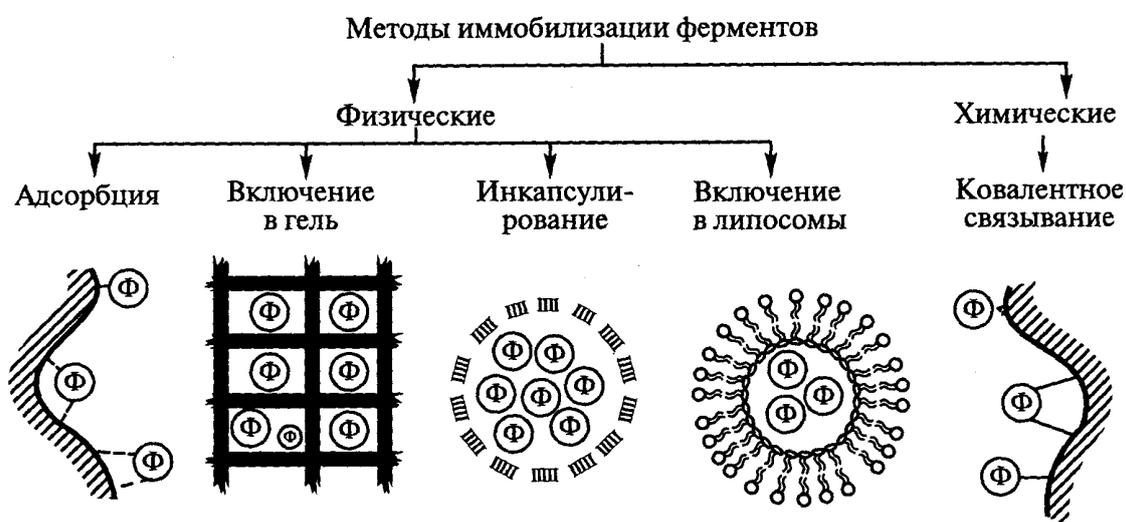


Рис. 3. Методы иммобилизации ферментов

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

### **Обязательная:**

1. Основы фармацевтической биотехнологии: Учебное пособие / Т.П. Прищеп [и др.]. – Ростов-на-Дону.: Феникс; Томск: Издательство НТЛ, 2006. – 256с.

### **Дополнительная:**

1. Волова, Т.Г. Экологическая биотехнология: Учеб. пособие для вузов / Т.Г. Волова. – Новосибирск: Сибирский хронограф, 1997. – 20 с.
2. Введение в биотехнологию: учеб.-метод. пособие / Воронеж. гос. ун-т; сост.: Т.А. Ковалева, М.А. Наквасина. — Воронеж : ЛОП ВГУ, 2006. — 59 с.