



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ, МОЛОДЕЖИ И СПОРТА  
УКРАИНЫ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
«Харьковский политехнический институт»

Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев

**ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ:  
ПРОИЗВОДСТВО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ  
ВЕЩЕСТВ**

Учебное пособие

для студентов (в т.ч. иностранных)  
биотехнологического направления

В двух частях

**ЧАСТЬ I**

Утверждено  
редакционно-издательским  
советом университета,  
протокол № 2 от 07.12. 2011 г.

Харьков  
НТУ «ХПИ»  
2012

УДК 615.012 (075)  
ББК 35.66я73  
К 78

Рецензенты: *С. М. Дроговоз*, д-р фарм. наук, проф., Национальный фармацевтический университет;  
*Е. М. Бабич*, д-р мед. наук, проф., ГП «Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова АМН Украины»

Посібник включає необхідні при вивченні фармацевтичної біотехнології відомості про принципи дослідження, розробки, виробництва і використання біологічно активних субстанцій у фармації та медицині. .

Призначено для студентів і аспірантів біотехнологічного напрямку підготовки.

**Краснопольский Ю. М.**

К 78: Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ : учеб. пособие : в 2 ч. – Ч. 1 / Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2013. – 304 с.– На рус. яз.

ISBN 978-966-593-969-6 (полное изд.)

ISBN 978-966-593-970-2(Ч. 1)

Пособие включает необходимые при изучении фармацевтической биотехнологии сведения о принципах исследования, разработки, производства и использования биологически активных субстанций в фармации и медицине.

Предназначено для студентов и аспирантов биотехнологического направления подготовки.

Ил. 19. Табл. 15. Библиогр.: 77 назв.

УДК 615.012 (075)  
ББК 35.66я73

ISBN 978-966-593-969-6

ISBN 978-966-593-970-2(Ч. 1)

© Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев, 2012

© НТУ «ХПИ», 2012

СОДЕРЖАНИЕ

<b>Введение</b> .....	5
<b>Глава 1. Биотехнология рекомбинантных ДНК</b> .....	8
1.1. Продуценты для генно-инженерной биотехнологии.....	8
1.2. Технологические принципы получения рекомбинантных продуктов.....	14
1.2.1. Векторы для введения рекомбинантных ДНК.....	16
<b>Глава 2. Получение антибиотиков</b> .....	24
2.1. Этапы развития производства антибиотиков.....	24
2.2. Классификация и структура антибиотиков.....	25
2.3. Пути биотехнологического получения антибиотиков.....	35
2.3.1. Получение антибиотиков с использованием биосинтеза.....	38
2.3.2. Получение антибиотиков с использованием генной инженерии.....	42
2.3.3. Получение антибиотиков с использованием иммобилизованных ферментов.....	45
2.4. Условия культивирования продуцентов антибиотиков.....	48
2.5. Выделение и очистка антибиотиков.....	51
2.6. Условия производства антибиотиков .....	52
2.6.1. Получение пенициллина.....	59
2.6.2. Получение стрептомицина.....	66
2.6.3. Получение гентамицина.....	68
2.7. Контроль антибиотиков.....	74
<b>Глава 3. Технология получения гепаринов</b> .....	81
3.1. Нефракционированные гепарины: выделение и характеристика.....	81
3.2. Биотехнологическое получение низкомолекулярных гепаринов.....	85
3.3. Сравнительная характеристика гепаринов.....	96
3.4. Контроль и стандартизация гепаринов.....	111
<b>Глава 4. Биотехнологическое получение витаминов</b> .....	116
4.1. Производство витамина В <sub>2</sub> (рибофлавин).....	123
4.2. Получение витамина В <sub>12</sub> (цианокобаламин).....	128

4.3. Получение витамина D <sub>2</sub> .....	134
4.4. Получение β-каротина.....	137
4.5. Производство L-аскорбиновой кислоты (витамин С).....	144
4.6. Получение никотиновой кислоты (витамин РР).....	147
4.7. Витамины в составе лекарственных препаратов.....	148
<b>Глава 5. Биотехнология получения гормональных препаратов.....</b>	<b>155</b>
5.1. Производство препаратов инсулина.....	155
5.2. Производство гормона роста человека (соматотропный гормон).....	171
5.3. Производство эритропоэтина человека.....	180
<b>Глава 6. Новые технологии в изготовлении иммунобиологических препаратов.....</b>	<b>186</b>
6.1. Биотехнология вакцин.....	186
6.1.1. Живые вакцины.....	190
6.1.2. Рекомбинантные векторы.....	196
6.1.3. Субъединичные / инактивированные вакцины.....	198
6.1.4. Цельные патогенные организмы.....	200
6.1.5. Белковые вакцины.....	201
6.1.6. Индивидуальные полисахаридные вакцины.....	211
6.1.7. ДНК вакцины. Вирусная и бактериальная доставка.....	214
6.1.8. Разработка состава вакцин.....	220
6.2. Биотехнология цитокинов.....	224
6.2.1. Технология получения интерферонов.....	229
6.2.2. Технология получения интерлейкинов.....	248
6.3. Биологически активные факторы.....	254
6.3.1. Колонистимулирующие факторы.....	254
6.3.2. Факторы свертывания крови.....	260
6.3.3. Факторы некроза опухоли.....	266
6.4. Антитромботические препараты.....	274
6.5. Рекомбинантные белки плазмы крови.....	278
6.6. Биотехнология препаратов фагов.....	280
6.6.1. Технологические принципы получения бактериофагов.....	285
<b>Заключение.....</b>	<b>291</b>
<b>Список литературы.....</b>	<b>297</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Уважаемый читатель! Представленная Вам книга является первой попыткой создания обзора по биотехнологии фармацевтических активных субстанций, входящих в состав профилактических, диагностических и лекарственных препаратов: антибиотиков, гормонов, вакцин, факторов свертываемости крови, витаминов и ряда других.

Невозможно сегодня представить нашу жизнь без рекомбинантных белковых субстанций, таких как, инсулин, факторы некроза опухолей, моноклональных антител и вакцин. Вакцинация сегодня является наиболее эффективным методом профилактики ряда инфекционных заболеваний. Препараты иммуноглобулинов последнего поколения и использование моноклональных антител подняли терапию на качественно новый уровень. Существенно изменилось лечение человека с созданием низкомолекулярных гепаринов, факторов свертываемости крови и антитромбиновых препаратов. Активно используется в клинике группа цитокинов, представленная интерферонами и интерлейкинами.

Фармацевтическая биотехнология имеет большие перспективы на мировом фармацевтическом рынке в связи с постоянным ростом потребностей здравоохранения. Среди биотехнологических препаратов присутствуют продукты для направленного воздействия на патологические мишени, в основном, парентеральные. Среди них белки и нуклеиновые кислоты: вакцины, гормоны, моноклональные антитела, цитокины, факторы крови, ДНК, РНК и др. Традиционные лекарственные препараты уступают препаратам, полученным биотехнологическим путем: они чаще всего пе-

рорального применения, обладают небольшой молекулярной массой, производятся с помощью химического или органического синтеза.

Интенсивное развитие биотехнологии, биохимии, иммунологии определило прогресс в развитии мировой фармации и создания высокоэффективных вакцин, как традиционных, так и вакцин нового поколения; препаратов крови, интерферонов, цитокинов и рекомбинантных продуктов различной направленности. С развитием технологии рекомбинантных ДНК стало возможным создание вакцин следующего поколения, лишенных недостатков традиционных вакцин.

Вакцины являются первыми фармацевтическими препаратами, созданными на основе биотехнологии. Все, по-видимому, началось с древних китайцев и арабов, которые много веков назад заметили, что человек, перенесший оспу, редко заболевает ею вновь. В X веке н.э. впервые в Китае была разработана вакцина против оспы. Ни одной медицинской науке человечество не обязано спасением стольких жизней, как вакцинологии. Созданы вакцины против 34-х социально значимых инфекций, что привело к значительному снижению заболеваемости дифтерией, столбняком, корью, туляремией, полиомиелитом и исчезновению оспы.

Широкий спектр биотехнологических препаратов, применяемый сегодня в мировой практике требует дальнейшего исследования и является предметом обсуждения данной публикации. Нами будут рассмотрены вопросы получения и использования ряда генно-инженерных продуктов: интерлейкины, интерфероны, цитокины, различные факторы, гормоны и другие препараты. В данной публикации подробно обсуждены современные технологии выделения и очистки биотехнологических продуктов, используемых для производства лекарственных препаратов: антибиотики, витамины, гепарины и другие. Отдельный раздел посвящен перспективному направлению фармацевтической биотехнологии – созданию лекарственных и диагностических препаратов на основе фагов.

Технологии, приведенные в данной публикации, являются принципиально возможными схемами получения биотехнологических препаратов

и не являются технологией конкретного производителя. Попытка их воспроизводства не может закончиться успешно, так как приведены только общие характеристики процессов, позволяющие представить и оценить современное состояние проблемы.

В этой публикации суммированы основные технологии, ключевые проблемы и иммунологические цели создания различных видов противовирусных и антибактериальных вакцин, цитокинов, биологических факторов, а также производства фармацевтических активных ингредиентов для получения антибиотиков, гормонов, витаминов и ряда других биологически активных компонентов. Необходимо отметить, что *данное учебное пособие не имеет аналогов в Украине.*

Данная публикация является продолжением серии учебных пособий НТУ «ХПИ» по специальности « Фармацевтическая биотехнология»:

✓ Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов (2009 г.);

✓ Фармацевтическая биотехнология: Бионанотехнология в фармации и медицине (2011 г.);

✓ Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ, Часть I (2012 г.). Планируется выпуск Части II пособия, посвященного технологии ряда субстанций: аминокислот, ферментов, липидов и липаз, фармацевтических субстанций на основе биотехнологии растений и др.

Можно надеяться, что представленный на суд читателей материал будет способствовать развитию знаний студентов и аспирантов о производстве, контроле и применении биологически активных веществ, полученных биотехнологическими методами.

## ГЛАВА 1. BIOTEХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

Наиболее активно развивающейся областью биотехнологии является фармацевтическая биотехнология. Мировой рынок фармацевтической продукции, полученной с помощью биотехнологических методов, составляет половину всего фармацевтического рынка. *Существенным сегментом фармацевтической биотехнологии являются генно-инженерные препараты, полученные с использованием рекомбинантной ДНК.* Причем, применение генной технологии используется для получения не только моноклональных антител, вакцин, цитокинов, различных биологических факторов, но и антибиотиков, витаминов и других лекарственных субстанций. В данной главе мы остановимся на биотехнологии рекомбинантных ДНК, используемых для этого продуцентах и основных технологических принципах получения рекомбинантных продуктов.

### 1.1. Продуценты для генно-инженерной биотехнологии

В качестве продуцентов, используемых в биотехнологии рекомбинантных ДНК, применяются прокариотические и эукариотические клетки.

**Бактериальные клетки.** Бактерия *E. Coli* – грамотрицательная непатогенная подвижная палочка длиной менее 1 мкм. Её средой обитания является кишечник человека, но она также может высеваться из воды и почвы. Благодаря способности размножаться простым делением на средах, содержащих только ионы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , микроэлементы и источник углерода (например, глюкозу), *E. Coli* стала излюбленным объектом для научных исследований. При культивировании *E. Coli* на обогащенных жидких питательных средах, содержащих аминокислоты, витамины, соли, микроэлементы и источник углерода, время генерации (т.е. время между образованием бактерии и её делением) в логарифмической фазе роста при температуре 37 °С, составляет примерно 22 мин. *E. Coli* можно культивировать как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Однако для оптимальной продукции рекомбинантных белков *E. Coli* (и другие микроорганизмы), обычно, выращивают в аэробных условиях. Помимо *E. Coli* в биотехнологии используют ряд других микроорганизмов:

*Acremonium chrysogenum*, *Bacillus brevis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas spp.*, *Rhizobium spp.*, *Streptomyces spp.*, *Trichoderma reesei*, *Xanthomonas campestris*, *Zymomonas mobilis* и др. Их можно разделить на две группы:

- ✚ микроорганизмы как источники специфических генов;
- ✚ микроорганизмы, созданные генно-инженерными методами для решения определенных задач.

К специфическим генам относится, например, ген, кодирующий термостабильную ДНК-полимеразу, которая используется в широко применяемой полимеразной цепной реакции (ПЦР). Этот ген был выделен из термофильных бактерий и клонирован в *E. Coli*.

Во второй группе микроорганизмов относятся, например, различные штаммы *Corynebacterium glutamicum*, которые были генетически модифицированы с целью повышения продукции промышленно важных аминокислот.

**Дрожжевые клетки.** Синтезированный бактериальной клеткой эукариотический белок часто приходится подвергать ферментативной модификации, присоединяя к белковой молекуле низкомолекулярные соединения (во многих случаях это необходимо для правильного функционирования белка). К сожалению, *E. Coli* и другие прокариоты не способны осуществлять эти модификации, поэтому для получения полноценных эукариотических белков используют *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* – это непатогенные одноклеточные микроорганизмы с диаметром клетки примерно 5 мкм, которые во многих отношениях представляют собой эукариотический аналог *E. Coli*. Их генетика, молекулярная биология и метаболизм детально изучены. *S. cerevisiae* размножаются почкованием и хорошо растут на такой же простой среде, как и *E. Coli*. Их способность к превращению сахара в этанол и углекислый газ издавна использовались для изготовления алкогольных напитков и хлеба. Ежегодно в мире расходуется 1 млн. тонн *S. cerevisiae*. В 1996 году была определена полная нуклеотидная последовательность всего набора хромосом *S. cerevisiae*, что еще более повысило ценность этого микроорганизма для научных исследований. В настоящее время, кроме *S. cerevisiae* используются и другие виды дрожжей: *Clueveromyces lactis*, *Saccharomyces*



*diastaticus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*. Наиболее эффективными продуцентами рекомбинантных белков являются *P. pastoris* и *H. polymorpha*. Сегодня, с использованием дрожжевых клеток получены интерфероны, компоненты вакцин.

**Эукариотические клетки.** При всех различиях между типами эукариот, методические подходы к культивированию клеток насекомых, растений и млекопитающих имеют много общего. Первоначально берут небольшой кусочек ткани данного организма и обрабатывают его протеолитическими ферментами, расщепляющими белки межклеточного материала (при работе с растительными клетками добавляют специальные ферменты, разрушающие клеточную стенку). Высвободившиеся клетки помещают в сложную питательную среду, содержащую аминокислоты, антибиотики, витамины, соли, глюкозы и факторы роста. В этих условиях клетки делятся до тех пор, пока на стенках емкости с культурой не образуется клеточный монослой. Если после этого не перенести клетки в емкости со свежей питательной средой, то рост прекращается. Обычно удается переносить (перевивать, субкультивировать) и поддерживать до 50–100 генераций исходной (первичной) культуры, затем клетки начинают терять способность к делению и гибнут. Часто некоторые клетки перевиваемых первичных клеточных культур претерпевают генетические изменения, в результате которых ускоряется их рост. Культуры клеток, которые при этом приобретают селективные преимущества, оказываются способными к неограниченному росту *in vitro* и называются *устойчивыми клеточными линиями*. У большинства клеток, способных к неограниченному росту, имеются значительные хромосомные изменения, в частности отмечается увеличение числа хромосом и потеря других. В биотехнологии устойчивые клеточные линии иногда используют для размножения вирусов и для выявления белков, которые кодируются клонированными последовательностями ДНК. Кроме того, они применяются для крупномасштабного производства вакцин и рекомбинантных белков.

Преимущества и недостатки различных штаммов-продуцентов рекомбинантных продуктов приведены в табл. 1.

Таблица 1 – Характеристика штаммов-продуцентов рекомбинантных белков

Продуценты	Преимущества	Недостатки
Бактерии: <i>E. Coli</i> , <i>B. subtilis</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Быстрый рост культуры (6–12 часов от начала посева до окончания индукции).</li> <li>2. Относительно высокий выход целевого продукта (100–2000 мг/л).</li> <li>3. Низкая цена ростовой среды.</li> <li>4. Низкая стоимость ферментации.</li> <li>5. Возможность получения микрокристаллов целевого белка (тельца включения).</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Затруднен биосинтез крупных полипептидов (более 50 кDa).</li> <li>2. Отсутствует система гликозилирования.</li> <li>3. Ограниченные возможности секреции белков.</li> <li>4. Ряд гетерологичных белков токсичны для клеток.</li> <li>5. Многие гетерологичные белки образуют только тела включения.</li> <li>6. Затруднено образование дисульфид. связей.</li> </ol>
Дрожжи: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia pastoris</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Относительно быстрый рост культуры (3–5 суток от начала посева до окончания индукции).</li> <li>2. Высокий выход целевого продукта (до 40 г/л).</li> <li>3. Очень низкая цена ростовой среды (глицерин, метанол, аммиак).</li> <li>4. Умеренная стоимость ферментации.</li> <li>5. Возможна экспрессия крупных полипептидов (более 50 кDa).</li> <li>6. Возможно гликозилирование.</li> <li>7. Секреция белка осуществляется в ростовую среду и низкий уровень секреции протеаз.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. N-гликозилирование дает иммуногенные олигосахариды.</li> <li>2. Не все белки эффективно секретируются.</li> </ol>

Среди молекулярно-биологических свойств систем экспрессии у прокариот наиболее важны следующие:

- ✓ тип промотора и терминатора транскрипции;
- ✓ прочность связывания мРНК с рибосомой;
- ✓ число копий клонированного гена и его локализация;
- ✓ конечная локализация синтезируемого продукта;
- ✓ эффективность трансляции в организме хозяина;
- ✓ стабильность продукта в клетке-хозяине.

Для получения гетерологичных рекомбинантных белков с клонированной эукариотической комплементарной ДНК (кДНК) обычно используются прокариотические системы экспрессии. Однако в некоторых случаях эукариотические белки, синтезированные в бактериях, оказываются нестабильными или биологически неактивными. Кроме того, как бы тщательно не проводилась очистка, конечный продукт может быть загрязнен токсичными веществами или пирогенами. Чтобы решить эти проблемы, для получения рекомбинантных белков, предназначенных для использования в медицине, были разработаны эукариотические системы экспрессии. Такие белки должны быть идентичны природным по своим биохимическим, физическим и функциональным свойствам. Неспособность прокариот синтезировать аутентичные варианты белков обусловлена в основном отсутствием у них адекватных механизмов внесения специфических посттрансляционных модификаций. Белки в клетках эукариот претерпевают следующие посттрансляционные изменения:

- образование дисульфидных связей (эту реакцию катализирует фермент дисульфидизомераза). Неправильно уложенный белок оказывается нестабильным и неактивным;
- протеолитическое расщепление предшественника, удаление определенного участка полипептидной цепи с образованием функционально активного белка;
- гликолизирование (основная модификация, благодаря которой белки приобретают стабильность, а в некоторых случаях – особые свойства). Наиболее распространенная реакция гликозилирования (присоединение специфического сахарного остатка либо к серину или треонину (О-гликозилирование), либо к аспарагину (N-гликозилирование));

➤ модификации аминокислот в составе белка: фосфорилирование, ацетилирование, ацилирование, гамма-карбоксилирование, сульфатирование, миристилирование и пальмитоилирование.

Для эффективной экспрессии любого гена совершенно необходимо наличие сильного регулируемого промотора, расположенного перед данным геном. Такой промотор имеет высокое сродство к РНК-полимеразе, поэтому прилегающие к нему последовательности эффективно транскрибируются. Регулируемость промотора позволяет клетке осуществлять строгий контроль транскрипции. Для экспрессии клонированных генов широко используется промотор хорошо изученного лактозного оперона *E. Coli*. Однако есть и другие промоторы, обладающие полезными для контроля экспрессии свойствами. Для их идентификации перед так называемым геном-репортером, кодирующим легко регистрируемый продукт, но лишенным промотора, встраивают случайные фрагменты ДНК. Если в результате такой вставки ген-репортер эффективно экспрессируется, то делают вывод, что клонированный фрагмент содержит функциональный промотор. Большинство генов-репортеров кодируют либо продукты, обуславливающие устойчивость к антибиотикам, либо фермент, который идентифицируется с помощью достаточно простого колориметрического теста. Использование генов-репортеров позволяет проводить мониторинг рекомбинантных векторов, анализировать активность, например, вирусных промоторов, намечать пути регуляции и переключения генов, осуществлять количественную оценку продуктов экспрессии. В качестве генов-репортеров используют: хлорамфеникол-ацетилтрансферазу, стрептомицинофосфотрансферазу, люциферазу светлячка, бактериальную люциферазу, гентамицин-ацетилтрансферазу и ряд других.

Таким образом, для получения белка с полным набором специфических модификаций необходимо провести тестирование различных эукариотических систем экспрессии и найти систему, которая воспроизводила бы биологически аутентичный продукт.

*Эукариотические экспрессирующие векторы* имеют такую же структуру, что и их прокариотические аналоги и *должны содержать*:

- эукариотический селективный маркер;
- эукариотический промотор;



- соответствующие эукариотические сайты терминации транскрипции и трансляции;
- сигнал полиаденилирования мРНК.

## 1.2. Технологические принципы получения рекомбинантных продуктов

*Технология рекомбинантных ДНК* – это совокупность экспериментальных процедур, позволяющих осуществлять перенос генетического материала (ДНК) из одного организма в другой. В настоящее время можно вырезать отдельные участки ДНК, получать нуклеотиды на ДНК синтезаторах практически в неограниченных количествах, определять последовательность нуклеотидов (разделяя, секвенируя их) сотнями в сутки, изменять выделенный ген, вводить его вновь в геном культивируемых клеток или эмбриона животного, где этот измененный ген начинает функционировать.

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

Различают три основных класса рестриктаз. *Рестриктазы класса I* разрывают молекулы ДНК в произвольных точках, *рестриктазы I и III классов* обладают метилирующей и эндонуклеазной активностью. Ферменты II класса, которые и используются в генной инженерии, состоят из двух отдельных белков: рестрикционной эндонуклеазы и модифицирующей метилазы. Именно использование *рестриктазы класса II* позволило проводить молекулярное клонирование, так как этот фермент узнает определен-

ные последовательности оснований в двухцепочечной молекуле ДНК и расщепляет обе цепи.

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

При молекулярном клонировании важно, чтобы расщепление донорной и векторной ДНК происходило в строго определенных участках (сайтах). Одна из первых рестрицирующих эндонуклеаз типа II была выделена из бактерии *E. Coli*, получивших название *Eco RI*. Этот фермент узнает участок ДНК, содержащий специфическую последовательность из шести пар оснований, и вносит разрыв между остатками гуанина и аденина в каждой цепи, расщепляя связь между атомом кислорода при 3'-углеродном атоме сахарного остатка одного нуклеотида и фосфатной группой, присоединенной к 5'-углеродному атому сахарного остатка соседнего нуклеотида. Разрывы цепи в ДНК располагаются наискось друг от друга, в результате чего образуются одноцепочечные комплементарные концы с «хвостами» из четырех нуклеотидов в каждом («липкие концы»). Каждый одноцепочечный «хвост» заканчивается 5'-фосфатной группой, а 3'-гидроксильная группа противоположной цепи как бы утоплена. Каждый фермент рестрицирующих эндонуклеаз «опознает» в ДНК специфическую последовательность из 4–6 нуклеотидов. Кроме рестриктаз, расщепляющих нуклеотидную цепь с образованием «липких концов», существуют рестриктазы, вносящие разрывы в цепи строго друг против друга с образованием ДНК с «тупыми концами».

Однако ферментов рестрикции при молекулярном клонировании недостаточно, так как водородные связи между теми четырьмя основаниями, которые образуют «липкие концы», не столь прочны, чтобы удержать два объединившихся фрагмента ДНК. Для устранения разрыва в сахарофосфатном остове молекулы служит фермент ДНК-лигаза, катализирующий образование фосфодиэфирных связей между концами полинуклеотидных

цепей, которые удерживаются вместе при спаривании «липких концов». ДНК-лигаза сшивает и «тупые концы».

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

### 1.2.1. Векторы для введения рекомбинантных ДНК

Для введения рекомбинантной ДНК применяют два основных вектора: плазмиды и бактериофаги.

**Плазмиды** – внехромосомный генетический элемент, способный к длительному автономному существованию и репликации. Обычно это двухцепочечная кольцевая ДНК. Плазмиды есть практически у всех бактерий. Размеры плазмид достигают до 500 т.п.н. Плазмиды содержат сайты начала репликации (*ori*), определяющие репликацию в клетке-хозяине, без этих сайтов репликация была бы невозможна. Плазмиды могут быть представлены в клетке 10–100 копиями (высококопийные плазмиды) или 1–4 копиями (низкокопийные плазмиды). На долю плазмидной ДНК обычно приходится 0,1–5,0 % суммарной клеточной ДНК. Одни плазмиды содержат информацию, обеспечивающую их собственный перенос из одной клетки в другую (F–плазмиды), другие несут гены устойчивости к антибиотикам (R–плазмиды) или специфические наборы генов, ответственных за утилизацию необычных метаболитов (плазмиды деградации).

*Свойства высокоэффективного плазмидного вектора* определяются следующими параметрами:

- ❖ небольшой размер, поскольку эффективность переноса экзогенной ДНК в *E. Coli* значительно снижается при длине плазмиды более 15 т.н.п.;

- ❖ наличие уникального сайта рестрикции, в который может быть осуществлена вставка;

- ❖ наличие одного или более селективных генетических маркеров для идентификации реципиентных клеток, несущих рекомбинантную ДНК.

Плазмидные векторы создаются при помощи генной инженерии. Одним из первых векторов был создан плазмидный вектор pBR 322 (см. Глоссарий – «Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов»). Для отличия трансформированных клеток используют специальные маркеры. В качестве маркеров плазмиды может содержать гены, определяющие устойчивость бактерии к антибиотикам. Вставка чужеродного (донорного) гена в маркерный ген приводит к инактивации последнего. Это позволяет отличать трансформированные клетки, получившие векторную плазмиду (утратившие устойчивость к антибиотикам), от клеток, получивших рекомбинантную молекулу (сохранивших устойчивость к одному, но утративших устойчивость к другому антибиотикам). Этот прием называется *инактивацией маркера вставки*. Для отбора трансформированных клеток, содержащих рекомбинантную ДНК (гибридную плазмиду), проводят тестирование на резистентность к определенным антибиотикам. Например, клетки, несущие гибридную плазмиду, устойчивы к ампициллину, но чувствительны к тетрациклину (в маркерный ген которого и внедрена донорная ДНК).

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

Следующим этапом является *процесс трансформации* – введение рекомбинантной ДНК в клетку-хозяина.

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

ций не бывает 100 %-ой. Для отбора используют схемы, позволяющие идентифицировать трансформированные клетки.

Эффективным *методом трансформации E. Coli* плазмидами является *электропорация* (воздействие на клеточные мембраны электрическим током для увеличения их проницаемости). Необходимо отметить, что электропорация в настоящее время самый эффективный и удобный, но довольно дорогой метод, используемый для генетической трансформации бактерий. Для введения клонированных генов в соматические клетки *также применяют микроинъекции и микроукалывания* или слияние с клеткой нагруженных ДНК мембранных везикул (липосом).

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

Кроме указанных векторов в генной инженерии применяют *космиды* – плазмиды, несущие *cos*-участок (комплементарные липкие концы) ДНК фага лямбда. Наличие *cos*-участка позволяет проводить упаковку ДНК в головку фага *in vitro*, что обеспечивает возможность их введения в клетку путем инфекции, а не трансформации.

*Фазмиды* – это гибриды между фагами и плазмидами. Они способны развиваться как фаг и как плазида. Уступая космидам по клонирующей

емкости, фазмиды дают возможность отказаться от переклонирования генов из фаговых в плазмидные векторы.

### Заключение

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

*Методика по клонированию включает следующие биотехнологические этапы:*

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

Таким образом, технология рекомбинантных ДНК включает целый набор процедур, благодаря которым удается клонировать фрагменты ДНК,

содержащие специфические гены. Для отбора клеток, содержащих рекомбинантную ДНК, используют специальные приемы. Чтобы уменьшить количество кольцевых плазмидных молекул, образующихся при сшивании фрагментов ДНК-лигазой Т4, рестрицированную плазмидную ДНК обрабатывают щелочной фосфатазой, удаляющей 5'-концевые фосфатные группы. Для отбора трансформированных клеток, содержащих гибридные плазмиды, проводят: 1) тестирование на резистентность к определенным антибиотикам или колориметрическую реакцию; 2) иммунологические тесты или выявление специфического белка – продукта клонированного гена; 3) гибридизацию с зондом, комплементарным какому-либо участку искомого гена. Чтобы иметь возможность клонировать целый ген, донорскую ДНК расщепляют лишь частично. При этом получают фрагменты разной длины, из которых затем создают геномную библиотеку. Для клонирования крупных фрагментов ДНК были сконструированы векторы на основе бактериофагов лямбда и 31-го, а также плазмиды F. Для получения фрагментов ДНК, кодирующих эукариотические белки, на очищенной мРНК как на матрице синтезируют комплементарную цепь ДНК с помощью обратной транскриптазы; эта цепь в свою очередь используется в качестве матрицы для синтеза второй цепи. После ферментативной обработки эту двухцепочечную комплементарную ДНК встраивают в вектор. Независимо от того, какая именно стратегия клонирования используется, после идентификации клонированной последовательности необходимо показать, что она представляет собой нативный структурный ген.

Весьма перспективным направлением генно-инженерных исследований является создание рекомбинантных препаратов на основе пробиотиков. После того как было установлено, что ряд бактерий способны проявлять пробиотические свойства и благотворно влиять на здоровье человека, началось использование технологии рекомбинантных ДНК с целью получения генетически измененных штаммов и создание пробиотических или производственных культур с заданными уникальными свойствами.

Несомненный интерес представляет один из первых рекомбинантных пробиотиков («Субалин»), разработанный специалистами Украины и Рос-

сии. Предложен препарат, который помимо высокой антагонистической активности по отношению к патогенным и условно патогенным бактериям проявлял противовирусную активность благодаря введению генетической информации, которая кодирует продукцию противовирусной субстанции –  $\alpha$ -2-интерферона. Для этой цели были отобраны несколько штаммов *B. subtilis*. Трансформацию отобранных бактериальных культур проводили плазмидами рВМВ, которые кодируют синтез секреторного (рВМВ 105) и внутриклеточного (рВМВ 104) интерферона. Указанные плазмиды содержат ген интерферона в виде химически-синтезированного аналога гена человеческого лейкоцитарного  $\alpha$ -2-интерферона. В структуре плазмиды рВМВ 105 ген интерферона связан с геном сигнального пептида, гомологической последовательности гена  $\alpha$ -амилазы, который обеспечивает эффективную секрецию из клеток гетерологичного белка. Плазмида рВМВ 104 не имеет в своей структуре такой последовательности нуклеотидов перед геном интерферона в связи с чем продуцируемый белок остается внутри клетки. При изучении стабильности плазмид в разных штаммах бацилл установлено, что максимальной стабильностью обладает плазмида рВМВ 105 в штамме *B. subtilis*. Даже через 10 пассажей обнаруживалась 100 %-ая сохранность плазмиды. На разных экспериментальных инфекциях на животных изучена и подтверждена эффективность и безопасность препарата «Субалин» при пероральном введении. Интерферон  $\alpha$ -2 человека был обнаружен во всех тестируемых органах лабораторных животных. Максимальное количество интерферона зарегистрировано в печени, легких и кишечнике.

Применение плазмидных векторов используют для создания рекомбинантных штаммов бифидобактерий. Так, например, в Японии в настоящее время осуществляют интенсивные исследования по использованию модифицированных генно-инженерными методами штаммов бифидобактерий для терапии онкологических заболеваний. Основанием для этого является тот факт, что штаммы бифидобактерий после системного введения способны селективно локализоваться и быстро пролиферировать в границах солидных опухолей. Используя анаэробные и непатогенные бактерии

*B. Longum*, в экспериментах удалось доставить в опухоль определенные терапевтические гетерологичные гены, в том числе компоненты системы пролекарство – фермент – лекарство. Для этой цели была сконструирована плазида pBLES 100S-eCD, включающая ген цитозиндезаминазы. Трансформированные этой плазмидой *B. longum* были способны продуцировать цитозиндезаминазу в гипоксических опухолях, что приводило к локальной конверсии системно вводимого нетоксичного 5-фторцитозина в токсичное для тканей соединение 5-фторурацил. Противоопухолевый эффект от применения этого продукта был продемонстрирован на модели крыс с опухолями молочных желез при введении трансформированных *B. longum* непосредственно в область опухоли или внутривенно. При этом анаэробная *B. longum* накапливается в гипоксических солидных опухолях (анаэробная среда опухоли). В настоящее время проходит испытания противоопухолевый препарат рекомбинантных бифидобактерий (продуцирует цитозиндезаминазу) под кодовым названием «APS001» селективно накапливающийся в гипоксической среде опухоли. Созданы рекомбинантные штаммы бифидобактерий, являющиеся продуцентами ферментов:  $\alpha$ -амилазы и глутаматдегидрогеназы.

Таким образом, сегодня генно-инженерная технология позволяет получать штаммы-продуценты многих белковых субстанций: ферментов, различных факторов, гормонов, вакцин, цитокинов и других компонентов фармацевтических препаратов. Кроме того, несомненный интерес представляют рекомбинантные штаммы пробиотиков, например, бифидобактерий или бацилл, которые, попадая в организм человека или животных способны продуцировать запрограммированные биологически активные вещества.

### **Контрольные вопросы**

1. Что такое эндонуклеазы рестрикции типа II и почему они так важны для технологии рекомбинантных ДНК?
2. Опишите применение плазмиды hBR322 в качестве вектора. Какими особенностями они обладают?
3. Опишите основные преимущества и недостатки использования в качестве штаммов продуцентов рекомбинантных белков дрожжей и бактерий.
4. Что означает процесс «электропорация» и для чего её применяют?
5. Опишите структуру плазмид и охарактеризуйте плазмидные векторы.
6. Опишите способы введения рекомбинантных плазмид в грамотрицательную бактерию, например, *E. Coli*.
7. Какова структура бактериофагов?
8. Привести примеры фармацевтических субстанций на основе рекомбинантных белков.
9. Что представляет собой банк клонов и каким образом создаются банки клонов?
10. Почему часто прибегают к частичному гидролизу для создания банков клонов?
11. Каковы отличительные особенности прокариотической клетки?
12. Каковы отличительные особенности эукариотической клетки?
13. Указать основные биотехнологические этапы методики клонирования.
14. Каковы основные методы анализа генетически модифицированных организмов?
15. Что представляют собой трансгенные животные? Охарактеризуйте технологию их получения.
16. Классификация векторов, применяемых в генной инженерии.
17. Привести данные об областях применения рекомбинантных микроорганизмов.
18. Какие преимущества у рекомбинантных штаммов пробиотических микроорганизмов?

## ГЛАВА 2. ПОЛУЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ

### 2.1. Этапы развития производства антибиотиков

Широкое применение антибиотиков для лечения инфекционных заболеваний помогло сохранить миллионы жизней. Большинство основных антибиотиков получено из грамположительной почвенной бактерии *Streptomyces*. В тоже время существует ряд антибиотиков, выделенных и из других грамположительных и грамотрицательных бактерий.

*Историю развития науки об антибиотиках* можно представить следующим образом:

- 1870 г. – Д. Сандерсон обнаружил отсутствие роста бактерий в среде, содержащей плесень;
- 1872 г. – Д. Листер доказал способность *Penicillium glaucum* подавлять рост бактерий;
- 1871–1872 г.г. – А. Г. Полотебневым показано, что молодая культура зеленой плесени – грибы рода *Penicillium* способны задерживать развитие возбудителей кожных заболеваний человека;
- 1877 г. – Пастер Л., Джеберт С., Лебединский И. опубликовали сообщение о росте *Bacillus anthracis* анаэробными бактериями;
- 1889 г. – А. Вюимен предложил термин «антибиотик», обозначающий действующий агент процесса «антибиоза», т.е. сопротивления, оказываемого одним живым организмом другому;
- 1894 г. – И. И. Мечников обратил внимание на возможность использования некоторых сапрофитных бактерий в борьбе с патогенными микроорганизмами;
- 1929 г. – А. Флеминг впервые выделил комплекс пенициллинов из *Penicillium notanum*;
- 1939 г. – Р. Дюбо впервые выделил тиротрицин из почвенной споровой аэробной палочки *Bacillus brevis*;
- 1940 г. – Х. Флори, Дж. Чейн выделена субстанция пенициллина;
- 1941 г. – начато клиническое применение очищенного пенициллина;

- 1942 г. – М. Г. Бражникова и Г. Ф. Гаузе выделили грамицидин С.
- 1944 г. – С. А. Ваксман открыл стрептомицин, образуемый лучистыми грибами рода *Actinomyces* (*Streptomyces griseus*).

Применение пенициллина в борьбе с различными инфекционными заболеваниями (пневмонии, сепсиса, гнойных инфекций кожи, дифтерии, сифилисе, гонорее, скарлатине и др.) и воспалительными процессами явилось мощным стимулом для поиска новых, еще более эффективных антибиотических веществ, образуемых различными группами микроорганизмов (бактериями, актиномицетами), низшими растениями (дрожжами, водорослями, плесневыми грибами, высшими грибами), высшими растениями и животными организмами.

### 2.2. Классификация и структура антибиотиков

*Ядро молекулы пенициллина* – 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК) – состоит из 4-членного β-лактамного (А) и 5-членного тиазолидинового (В) колец (см. рис. 1). Пенициллины отличаются характером радикала в боковой цепи. Наиболее ценным оказался бензилпенициллин (радикал =  $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$ ) поэтому при выращивании гриба продуцента, например, *Penicillium crustosum* процесс биосинтеза направляют в сторону образования преимущественно бензилпенициллина. После выделения в 1959 году из *Penicillium chrysogenum* 6-АПК появилась возможность химического синтеза новых пенициллинов путем присоединения к ним различных радикалов к свободной аминогруппе. Известно более 15000 полусинтетических пенициллинов, однако лишь немногие превосходят пенициллин по антибактериальной активности (ампициллин, оксациллин и др.). Пенициллины выпускаются в виде хорошо растворимых в воде натриевых и калиевых солей.



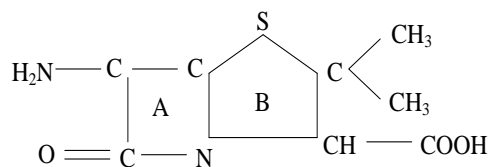


Рисунок 1 – Структура молекулы пенициллина –  
6-аминопенициллановая кислота

*Стрептомицин* – антибиотик широкого спектра действия. Активен в отношении туберкулезных бактерий, возбудителей чумы, туляремии, стрептококков, стафилококков, пневмококков, гонококка и др. По химической природе стрептомицин относится к аминогликозидным антибиотикам.

*Эритромицин* – антибиотик из группы макролидов, продуцентом которого является почвенный гриб *Streptomyces erythreus*. Активен в отношении грамположительных (стафилококки, стрептококки, пневмококки и др.) и грамотрицательных бактерий, например, бруцелл. Эффективен в отношении стафилококков устойчивых к пенициллину, тетрациклинам, стрептомицину.

Со времен открытия пенициллина в конце 20-х годов из различных микроорганизмов было выделено более 6000 антибиотиков. Каждый год ученые обнаруживают от 100 до 200 новых антибиотиков. До клиники доходит 1–2 % всех обнаруживаемых антибиотиков.

Возникает вопрос: каковы причины постоянного роста числа антибиотиков за последние 40–50 лет? Среди них можно назвать следующие:

1. Многие антибиотические вещества – незаменимые лечебные препараты. Они широко применяются при лечении большого числа инфекционных заболеваний, которые ранее, до открытия антибиотиков, считались неизлечимыми или сопровождались высоким легальным исходом. К их числу следует отнести некоторые формы туберкулеза, чуму, азиатскую холеру, брюшной тиф, бруцеллез, пневмонию, различные септические процессы.

2. Антибиотики – необходимые вещества для сельского хозяйства, прежде всего как лечебные препараты, применяемые в животноводстве, пти-

цеводстве, пчеловодстве и растениеводстве, а отдельные антибиотические вещества – и как стимуляторы роста животных.

3. При широком применении антибиотиков в качестве лечебных препаратов происходит быстрое накопление резистентных к этим соединениям форм микроорганизмов. Проблема резистентности микроорганизмов ставит задачу замены одних антибиотиков другими, то есть поиска все новых и новых антибиотических веществ.

4. Антибиотические вещества – новые, ранее неизвестные по химическому строению соединения, представляют огромный интерес для специалистов в области химии природных соединений. Изучение структуры этих веществ, а также синтез некоторых из них способствовали бурному развитию химии, а следовательно, и самой науки об антибиотиках. Достаточно указать, что к настоящему времени синтезированы такие антибиотики, как пенициллина, хлорамфеникол, тетрациклины и др.

5. Антибиотики нашли широкое применение в научных исследованиях в качестве веществ, используемых при изучении отдельных сторон метаболизма организмов, расшифровки тонких молекулярных механизмов биосинтеза белка, механизма функционирования мембран и других биохимических превращений как специфические ингибиторы определенных реакций. Например, одни антибиотики специфически ингибируют отдельные этапы синтеза белка на рибосомах (хлорамфеникол, пурамицин, тетрациклин), другие – синтез на разных уровнях нуклеиновых кислот (саркомицин подавляет активность полимераз; актиномицин, блеомицин, рубомицин и другие нарушают функцию ДНК), третьи – образование клеточных стенок (пенициллины) и т.д.

6. Изучение путей образования антибиотиков способствует глубокому проникновению в механизмы синтетической деятельности продуцентов этих биологически активных соединений, раскрытию основных этапов их метаболизма.

По своему спектру действия, химической структуре и молекулярному механизму действия известные антибиотики классифицируются следующим образом.

По спектру действия:

✓ антибактериальные, губительно действующие на грамположительные (бензилпенициллин, ристомидин, новобиоцин), грамотрицательные (полимиксин) бактерии, а также антибиотики широкого спектра действия (левомецетин, канамицин, мономицин, гентамицин);

✓ противогрибковые (амфотерицин В, нистатин, леворин, гризеофульвин);

✓ противоопухолевые, включающие в себя: актиномицины, антрациклины (доксорубин, эпирубин, идарубин), оливомицины, брунеомицины, блеомицины.

В зависимости от химической структуры и ряда других свойств антибиотики делят на ряд классов:

1. β-лактамы – пенициллины, цефалоспорины, причем составляют более 40 % рынка антибиотиков.

2. Макролиды – макроциклические (эритромицин, джозамицин, олеандомицин).

3. Аминогликозиды – (стрептомицин, канамицин, гентамицин, амикацин, тобрамицин).

4. Тетрациклины – тетрациклин, метациклин.

5. Гликопептиды – ванкомицин, ристомидин, блеомицин.

6. Антрациклины – доксорубин, эпирубин, идарубин.

7. Амфениколы – левомецетин.

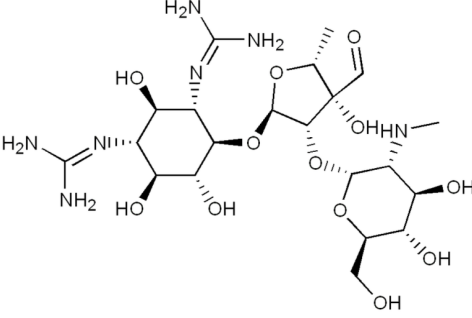
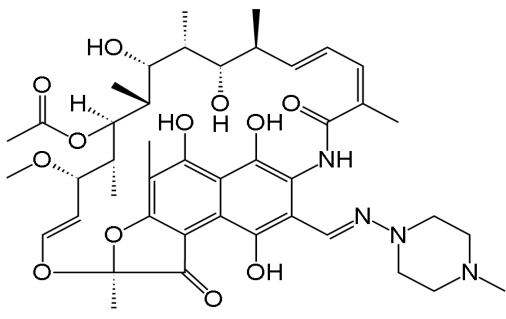
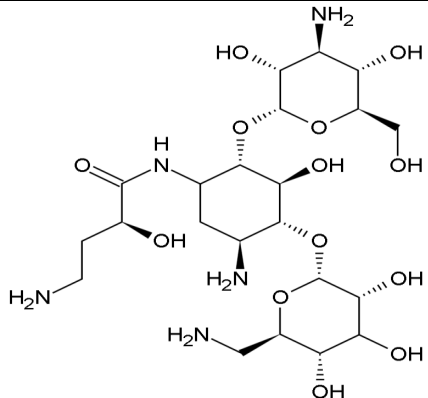
8. Линкосамиды – линкомицин.

9. Полиеновые – ациклические (нистатин, леворин).

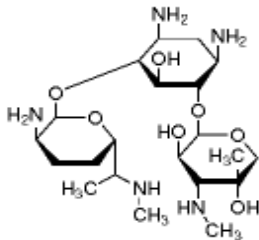
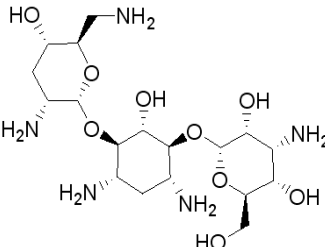
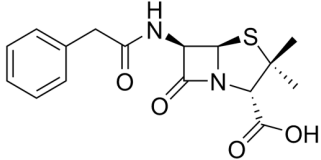
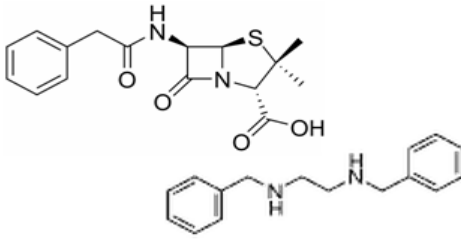
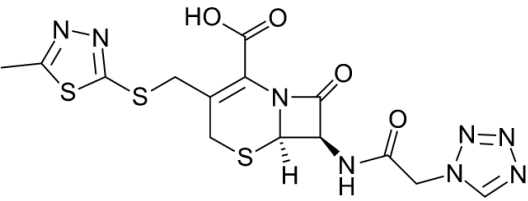
10. Полипептиды – полимиксин, грамицидин.

Мы считаем целесообразным привести химическую структуру широко используемых антибиотиков (табл. 2).

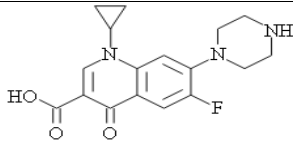
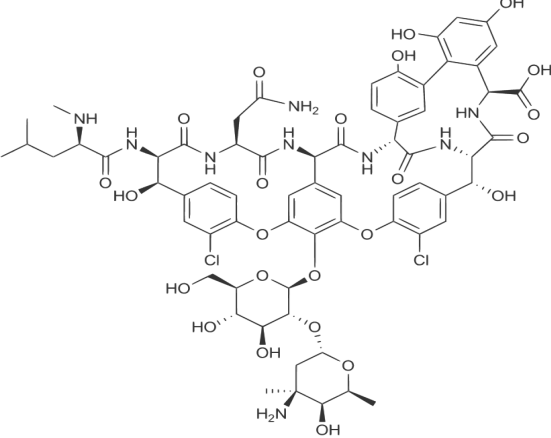
Таблица 2 – Химическая структура антибиотиков

Антибиотик	Химическая структура
1	2
Стрептомицин	 <p>The chemical structure of Streptomycin consists of a streptidine ring system linked to a 2-deoxystreptose sugar, which is further linked to a 2,6-diaminocyclohexane ring. The streptidine ring has two amino groups at the 2 and 6 positions. The 2-deoxystreptose sugar has a hydroxyl group at the 2-position and a 2,6-diaminocyclohexane ring at the 4-position. The 2,6-diaminocyclohexane ring has two amino groups at the 2 and 6 positions.</p>
Рифампицин	 <p>The chemical structure of Rifampin is a complex polycyclic molecule. It features a central naphthalene-like core with a piperazine ring attached to one of the rings. The structure includes several hydroxyl groups, a methyl group, and a piperazine ring with a methyl group on the nitrogen. The overall structure is highly complex and characteristic of the rifamycin class.</p>
Амикацин	 <p>The chemical structure of Amikacin is a complex aminoglycoside. It consists of a 2-deoxystreptose sugar linked to a 2-deoxy-6-aminocyclohexane ring, which is further linked to a 2-deoxy-6-aminocyclohexane ring. The structure includes several hydroxyl groups, amino groups, and a piperazine ring. The overall structure is highly complex and characteristic of the aminoglycoside class.</p>

Продолжение таблицы 2

1	2
Гентамицин	
Тобрамицин	
Бензилпенициллин	
Бензатина-бензилпенициллин	
Цефазолин	

Продолжение таблицы 2

1	2
Ципрофлоксацин	
Ванкомицин	

Анализируя влияние антибиотиков на бактерии и клетки (*молекулярный механизм*) можно определить их действие как:

1. Подавление активности микробных ферментов, ответственных за синтез клеточной мембраны (амоксициллин, цефалоспорины, пенициллины, ампициллин), например, путем конкурентного блокирования транспептидаз, участвующих в синтезе мукопептида, входящего в состав клеточной мембраны.

2. Подавление в микробной клетке синтеза белка путем взаимодействия с 50S рибосомальной субъединицей бактерий (кларитромицин, клиндамицин).

3. Непосредственное взаимодействие с ДНК, что препятствует синтезу нуклеиновых кислот (противоопухолевое действие: антрациклиновые антибиотики – доксорубуцин, эпирубуцин, идарубуцин и др.; блеомицин, митомицин).

4. Нарушение движения рибосомы по нити информационной РНК (эритромицин, линкомицин).

5. Нарушение целостности цитоплазматической мембраны (противогрибковые антибиотики – нистатин, амфотерицин В, полимиксины и др.).

6. Нарушение прикрепления РНК к рибосомам (тетрациклины, макролиды, левомицитин).

7. Селективное ингибирование ДНК-зависимой РНК полимеразы в микробной клетке (рифампицин).

8. Нарушение энергетического обмена (олигомицин).

В табл. 3 представлены продуценты и характеристика антибиотиков.

Таблица 3 – Продуценты и характеристика антибиотиков

Антибиотик	Продуцент	Химическая природа	Спектр и механизм действия
1	2	3	4
Амикацин	Получают полусинтетическим путем из канамицина А	$C_{22}H_{43}N_5O_{13}$ , 585,61 Да Аминогликозид	Грамотрицательные и грамположительные бактерии
Амфотерицин В	<i>Streptomyces nodosus</i>	$C_{47}H_{73}NO_{17}$ , 926,12 Да Полиеновый антибиотик	Дрожжи, дрожжеподобные грибы, включая <i>Candida albicans</i>
Бацитрацин	<i>Bacillus subtilis</i>	Полипептид	Грамположительные бактерии
Бензилпенициллин	<i>Penicillium notatum</i>	$C_{16}H_{18}N_2O_4S$ , 334,4 Да Гетероциклическое соединение, построенное из сконденсированных тиазолидинового и бета-лактмного кольца	Грамотрицательные и грамположительные бактерии
Блеомицин	<i>Streptomyces verticillus</i>	$C_{55}H_{84}N_{20}O_{21}S_2$ $C_{55}H_{84}N_{17}O_{21}S_3$ Гликопептид	Противоопухолевое средство. Вызывает фрагментацию молекул ДНК

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4
Ванкомицин	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	$C_{66}H_{75}N_9O_{24}$ Трициклический гликопептид	Грамположительные бактерии. Ингибирует биосинтез клеточных мембран, изменяет их проницаемость, нарушает синтез РНК
Гентамицин	<i>Micromonospora purpurea</i>	$C_{21}H_{43}N_5O_7$ , 418,54 Да Аминогликозид	Грамположительные и грамотрицательные бактерии
Джозамицин	<i>Streptomyces narbonensis</i> var. <i>Josamyceticus</i> var. nova	$C_{42}H_{69}NO_{15}$ , 828,02 Да Макролид	Грамположительные и грамотрицательные бактерии
Доксорубицин	<i>Streptomyces peucetius</i> var. <i>Caesius</i>	$C_{27}H_{29}NO_{11}$ , 543,53 Да Антрациклиновый антибиотик	Противоопухолевое средство. Взаимодействует с ДНК и препятствует синтезу нуклеиновых кислот
Канамицин А	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	$C_{18}H_{36}N_4O_{11}$ , 484,51 Да Аминогликозид	Грамположительные и грамотрицательные бактерии
Линкомицин	<i>Streptomyces lincolnensis</i> var. <i>Lincolnensis</i>	$C_{18}H_{34}N_2O_6S$ , 406,55 Да Линкозамиды	Грамположительные бактерии
Митомицин С	<i>Streptomyces caespitosus</i>	$C_{15}H_{18}N_4O_5$ , 334,33 Да	Противоопухолевое средство. Взаимодействует с ДНК и препятствует синтезу нуклеиновых кислот
Мономицин	<i>Streptomyces circulatus</i> var. <i>Monomycini</i>	$C_{23}H_{45}N_5O_{14}$ , 615,6 Да Аминогликозид	Лейшманиоз, токсоплазмоз, сальмонеллез

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4
Нистатин	<i>Streptomyces noursei</i>	C <sub>47</sub> H <sub>75</sub> NO <sub>17</sub> , 276,42 Da Антибиотик полиеновой группы	Дрожжеподобные грибы рода <i>Candida</i>
Полимиксин	<i>Bacillus polymyxa</i>	Полипептид	Грамотрицательные и грамположитель- ные бактерии
Рифампицин	<i>Streptomyces mediterranei</i>	C <sub>42</sub> H <sub>58</sub> N <sub>4</sub> O <sub>12</sub> , 822,96 Da	Грамположительные и грамотрицательные бактерии, включая микобактерии тубер- кулеза и лепры
Рубомицина гидрохлорид	<i>Streptomyces coeruleorubidus</i>	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>10</sub> HCl, 563,98 Da	Противоопухолевое
Стрептомицин	<i>Streptomyces griseus</i>	C <sub>21</sub> H <sub>39</sub> N <sub>7</sub> O <sub>12</sub> , 581,58 Da Аминогликозид	Грамотрицательные бактерии и микобак- терии туберкулеза
Тетрациклин	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> , 444,45 Da	Грамположительные и грамотрицательные бактерии. Нарушает образование ком- плекса между транс- портной РНК и ри- босомой, приводя к нарушению синтеза белка
Тобрамицин	<i>Streptomyces tenebrarius</i>	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub> , 467,52 Da Аминогликозид	Грамотрицательные бактерии
Цефалоспорин С	<i>Cephalosporium sp.</i>	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S	Грамположительные и грамотрицательные бактерии
Эритромицин	<i>Streptomyces erythreus</i>	C <sub>37</sub> H <sub>67</sub> NO <sub>13</sub> , 733,95 Da Макролид	Грамположительные бактерии

### 2.3. Пути биотехнологического получения антибиотиков

Необходимость поисков новых антибиотиков обусловлена многими причинами. Постоянно ведутся поиски эффективных антибиотиков для борьбы с теми заболеваниями, на возбудители которых не действуют существующие препараты. Потребность в антибиотиках обусловлена также тем, что при их использовании в лечебных целях происходит накопление резистентных к этим соединениям форм организмов. Длительное и не всегда оправданное применение антибиотиков приводит зачастую к ускорению эволюции патогенных организмов в сторону закрепления их устойчивости к этим препаратам. Поэтому необходимо постоянно заменять одни виды антибиотиков на другие. Для этого нужно находить наиболее активные микроорганизмы – продуценты антибиотиков.

*Основные этапы поисков антибиотиков:*

- выделение микробов-антагонистов из почвы;
- определение антагонистического спектра и активности антибиотиков;
- подбор условий культивирования продуцентов антибиотиков;
- выделение и химическая очистка антибиотиков;
- изучение физико-химических и фармакологических свойств антибиотиков;
- испытание химико-терапевтической эффективности;
- идентификация антибиотиков.

Биосинтез антибиотиков – наследственная особенность организмов, проявляющаяся в том, что каждый вид (штамм) способен образовывать один или несколько вполне определенных, строго специфичных для него антибиотических веществ. Вместе с тем известно, что одинаковые антибиотики могут образовываться несколькими видами организмов.

Выявление потенциальной возможности образовывать в процессе жизнедеятельности антибиотики связано с условиями культивирования организмов. В одних условиях организм образует антибиотик, в других условиях тот же организм не будет обладать способностью синтезировать антибиотическое вещество.

В связи с резистентностью микроорганизмов к антибиотикам постоянно проводится их совершенствование, что приводит к появлению новых поколений. Например, цефалоспориновые антибиотики, приводящие к нарушению синтеза компонентов клеточной мембраны, присутствуют в виде 4-х поколений полусинтетических цефалоспориновых антибиотиков: Цефадроксил, Цефазолин, Цефалексин – 1 поколение; Цефамандол, Цефуроксим – 2 поколение; Цефиксим, Цефоперазон, Цефотаксим, Цефтазидим, Цефтриаксон – 3 поколение; Цефпиром, Цефепим – 4 поколение.

Основными продуцентами антибиотиков являются актиномицеты, плесневые грибы, бактерии. Главным местом их обитания является почва. Для выделения микроорганизмов, образующих антибиотики, берут пробы почвы, высушивают ее до воздушно-сухого состояния и делают высевы на специальные питательные среды.

Выделенные штаммы-продуценты антибиотиков часто переменчивы и нестабильны. Поэтому методом селекции отбирают наиболее перспективные штаммы, а затем проводят отбор индуцированных мутантов. Мутантное действие на микроорганизмы достигается применением различных источников лучистой энергии (УФ-лучи, рентгеновские лучи, нейтроны и др.).

Антибиотики продуцируются плесневыми грибами, актиномицетами, эубактериями и рядом других микроорганизмов. Некоторые из этих организмов способны продуцировать большое количество антибиотиков. Так, шесть родов филаментозных грибов производят 1000 различных антибиотиков, в том числе пенициллин и цефалоспорин, а три рода актиномицетов – 3000 антибиотиков. Среди актиномицетов наибольший вклад вносит род *Streptomyces*, один из видов которого *S. griseus* синтезирует более 50 антибиотиков. В процессе образования антибиотиков задействовано значительное число генов. Массовая расшифровка первичной структуры геномов микроорганизмов показала, что эта величина равна 1–2 %. Так, у *Bacillus subtilis* число таких генов достигает 2 %, что обеспечивает микроорганизму большие возможности для защиты и адаптации. С другой стороны, это обстоятельство затрудняет анализ путей биосинтеза антибиотиков и идентификацию отдельных мутаций, способных увеличить выход продукта. Тем не менее, большинство известных в настоящее время

высокопродуктивных штаммов продуцентов антибиотиков получено традиционными методами мутагенеза и селекции.

Выделенные культуры микроорганизмов-антагонистов изучают по содержанию в них антибиотических веществ, необходимых для практических целей. При этом методом хроматографии определяют наличие известных антибиотиков. Если обнаруживают новый антибиотик, то вначале осуществляют первичное выделение и химическую очистку антибиотика, определяют его токсичность и химико-терапевтические свойства на животных, зараженных возбудителями различных заболеваний.

Биосинтез молекулы любого антибиотика происходит с участием ряда ферментов – от нескольких единиц до нескольких десятков. Координация действия ферментов, т.е. обеспечение правильной последовательности ферментативных реакций, обеспечивается разными, не всегда еще ясными путями.

Процесс развития микроорганизмов (продуцентов антибиотиков) имеет, как правило, двухфазный характер:

*В первой фазе развития культуры*, носящей название *трофофазы* (*тропофазы*) (фаза сбалансированного роста микроорганизма), идет интенсивное накопление биомассы продуцента. Продуцент синтезирует белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, ферменты и другие биологически активные вещества (БАВ), необходимые для роста микроорганизма; наблюдается быстрое потребление основных компонентов субстрата (источников углерода, азота, фосфора и др.), интенсивное поглощение кислорода. В культуральной среде может снижаться рН, как результат накопления органических кислот. В трофофазе антибиотик, как правило, не образуется или его количество незначительно. Возможно, в этой фазе синтез ферментов, принимающих участие в образовании антибиотика, подавлен.

*Вторая фаза развития культуры*, носящая название *идиофазы* (фаза несбалансированного роста) характеризуется снижением общего количества биомассы. В период второй фазы происходит развитие микроорганизма и образование новых клеток, но в культуре начинают преобладать автолитические процессы, что приводит к снижению общего числа биомассы. Продукты метаболизма микроорганизмов частично используются на построение клеток мицелия, частично – на синтез антибиотика. Среда обога-



щается продуктами обмена и продуктами автолиза клеток, возрастает значение рН, происходит интенсивный процесс биосинтеза и максимальное накопление антибиотика.

Биосинтез антибиотиков возрастает в фазе замедленного роста клеточной популяции (конец трофофазы) и достигает максимума в стационарной фазе (идиофазе). Считают, что в конце трофофазы изменяется энзиматический статус клеток, появляются индукторы вторичного метаболизма, освобождающие гены вторичного метаболизма из-под влияния катаболитной репрессии. Поэтому любые механизмы, тормозящие клеточную пролиферацию и активный рост, стрессовые ситуации, активируют процесс образования антибиотиков.

*Процесс культивирования идиолитов происходит в две фазы (двухступенчатое культивирование). На первой фазе* происходит накопление достаточного количества биомассы, которая выращивается на среде для роста микроорганизма. Эта фаза должна быть быстрой, а питательная среда дешевой. *На второй фазе* осуществляется запуск и активный синтез антибиотика. На этой фазе ферментацию ведут на продуктивной среде.

### 2.3.1. Получение антибиотиков с использованием биосинтеза

Методы получения антибиотиков путем химического синтеза достаточно сложны и не могут конкурировать с их биосинтезом методом биотехнологии. Существует несколько способов получения как природных, так и полусинтетических антибиотиков. Направленный биосинтез антибиотиков осуществляется путем прямой ферментации микроорганизма – продуцента с подходящим предшественником, что индуцирует синтез ферментов вторичного метаболизма в идиофазе. Точный механизм индуцирования первичными метаболитами генов, кодирующих синтез ферментов вторичного метаболизма, окончательно не расшифрован, однако выяснено, что молекулы предшественника необходимо добавлять в среду в период фазы роста микроорганизмов. Установлено, что вводимый предшественник должен лимитировать скорость биосинтеза антибиотика. Например, производство бензилпенициллина в значительной степени стимулируется добавками его метаболического предшественника – фенилуксусной кислоты; пропионовая кислота и пропиловый спирт индуцируют биосин-

тез макролидов через метилмалонил КоА; L-фенилаланин – предшественник фенилаланина – ускоряет синтез грамицидина-S. Аналогичный эффект вызывает использование ингибиторов метаболизма. Так, при подавлении процесса введения хлора микроорганизм *S. aureofaciens* образует тетрациклин, а не хлортетрациклин, а при ингибировании реакции метилирования им синтезируются деметилированное производное хлортетрациклина.

Другой способ получения антибиотиков состоит в использовании для их биосинтеза блокированных мутантов, у которых отсутствует (блокировано) определенное звено в цепи реакций, ведущих к синтезу антибиотика. Блокированные мутанты не способны образовывать нужный антибиотик, используя низкую субстратную специфичность ферментов вторичного метаболизма и вводя аналоги предшественника антибиотика, последние переводят в аналоги самого антибиотика в ходе процесса, известного как мутационный биосинтез, или мутасинтез. Схема мутационного биосинтеза антибиотика показана на рис. 2.

□

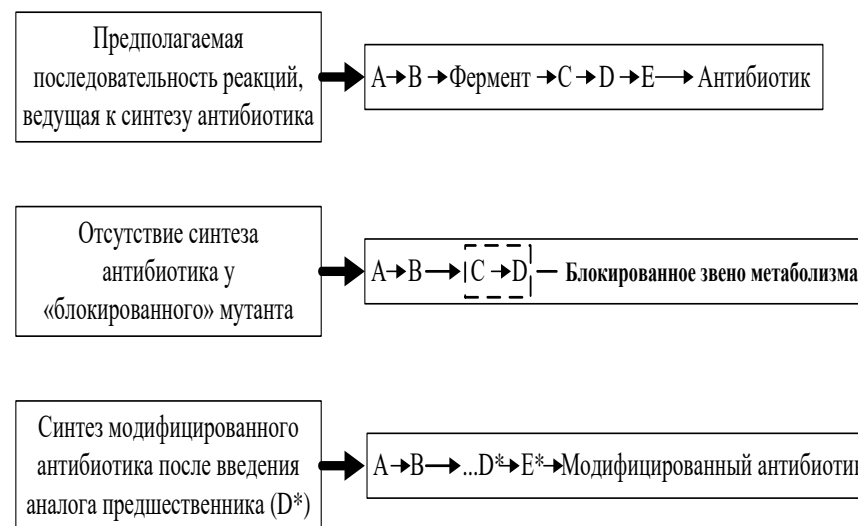


Рисунок 2 – Схема мутационного биосинтеза антибиотика

Так, мутанты *Nocardia mediterranei*, у которых нарушена способность к ацилированию, образуют аналог предшественника рифамицина В – рифамицин SV, который служит исходным веществом для получения многих синтетических рифамицинов.

Особенно успешны разработки в области биосинтеза полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов. Получение новых более эффективных аналогов пенициллина основано на изменении его ацильной группировки при сохранении в неизменном виде ядра пенициллина – 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК). В промышленности 6-АПК получают путем гидролиза природных пенициллинов с помощью специфического фермента пенициллинацилазы, образующейся с высоким выходом в процессе ферментации ряда штаммов микроорганизмов. Ацилазы различают по их субстратной специфичности. Некоторые из них способны катализировать и обратные реакции – процессы ацилирования аминогруппы 6-АПК с образованием модифицированного пенициллина. Таким путем было получено более 40000 полусинтетических пенициллинов. Существенным является то, что во многих случаях 6-АПК не выделяют из культуральной жидкости, например, при превращении бензилпенициллина в ампициллин (рис. 3).

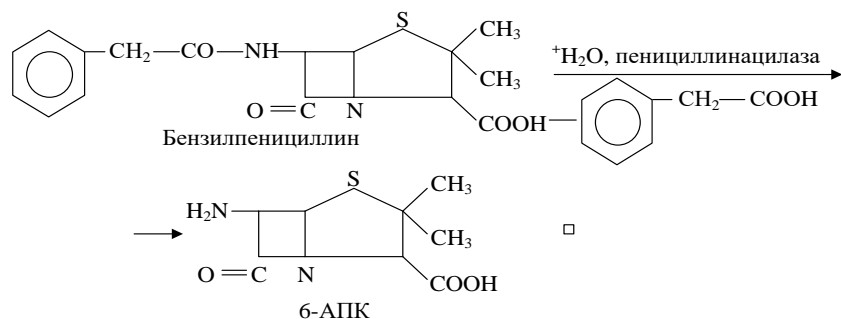


Рисунок 3 – Схема превращения бензилпенициллина в 6-АПК

Бензилпенициллин гидролизуют ацилазой мутанта *Kluyvera citrophila* при pH 7,8–8,0 и температуре 40–50 °С. Затем в ферментер вносят мутант *Pseudomonas melanogenum* и фенилглицин. Условия ферментации изменяют таким образом (pH 5,0–5,5), чтобы ацилаза второго мутантного организма осуществляла синтез ампициллина (рис. 4).

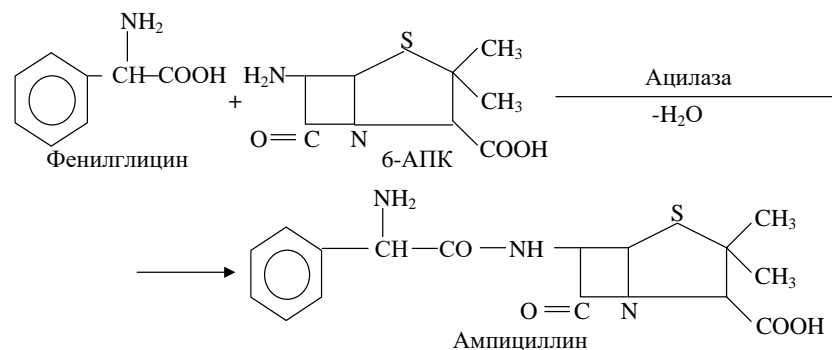


Рисунок 4 – Схема получения ампициллина

Замена ацильного остатка приводит к синтезу других полусинтетических антибиотиков. Так, например, если в структурной формуле антибиотика ацильный остаток представлен в виде (см. рис. 5), а радикал в молекуле пенициллина представлен в виде (см. рис. 6) – образуется метициллин, а в случае представления радикала в виде (см. рис. 7) – оксациллин.

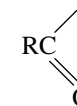


Рисунок 5 – Вид ацильного остатка

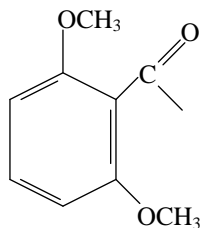


Рисунок 6 – Вид радикала в молекуле пенициллина (метициллин)

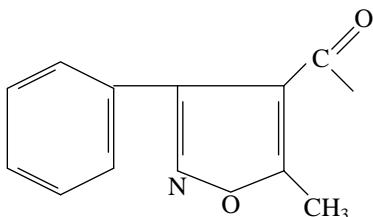


Рисунок 7 – Вид радикала в молекуле пенициллина (оксациллин)

### 2.3.2. Получение антибиотиков с использованием генной инженерии

Весьма перспективным является получение новых антибиотиков путем создания генно-инженерных продуктов, в частности рекомбинантных штаммов продуцентов. *Большой эффект* может дать *технология рекомбинантных ДНК*. При создании рекомбинантных штаммов *Streptomyces* (основного микроорганизма, используемого для получения антибиотиков) важно понять, что трансформация и отбор трансформированных клеток не должны быть слишком сложными. Однако, в отличие от *E. Coli*, *Streptomyces* существует не в виде изолированных клеток, а в виде протяженных мицелл, поэтому перед трансформацией необходимо разрушить клеточную стенку и высвободить отдельные протопласты. Без этого будет невозможно отличить трансформированные клетки от нетрансформированных, поскольку видимые колонии на твердой среде будут образовываться из группы клеток, а не из индивидуальной клетки. Соответственно колонии, растущие в присутствии селективного антибиотика, будут представлять собой смесь трансформированных и не трансформированных кле-

ток. Проникновение плазмидной ДНК в протопласты *Streptomyces* облегчается в присутствии полиэтиленгликоля. После трансформации протопласты сначала высевают на твердую среду, чтобы образовалась клеточная стенка, а затем для отбора трансформированных клеток переносят на селективную среду, обычно содержащую неомицин, либо тиострептон. Актиномицеты являются продуцентами большинства промышленно важных антибиотиков. Известно, что один из эффективных путей воздействия на геном актиномицетов – это протопластирование их клеток. Показано, что протопластирование может влиять на уровень антибиотической активности. *Метод слияния протопластов различных штаммов может служить для получения рекомбинантов, способных синтезировать новый антибиотик*, или обладающих более высоким уровнем образования антибиотика. Биотехнология данного процесса следующая: мицелий отмывают от питательной среды, промывают специальными средами путем центрифугирования; проводят лизис в питательной среде, содержащей 20 % сахарозу и лизоцим в концентрации 1–2 мг/мл; нелизированный материал отделяют центрифугированием при 1000 об/мин; протопласты осаждают путем центрифугирования при 3000 об/мин; протопласты высевают на питательные среды и инкубируют при  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 15 суток.

*Кроме того, с помощью генной инженерии можно не только создавать новые антибиотики, но и увеличивать эффективность синтеза уже известных.* Лимитирующим фактором в промышленном производстве антибиотиков с помощью *Streptomyces* часто является количество доступного клеткам кислорода. Вследствие плохой растворимости кислорода в воде и высокой плотности культуры *Streptomyces* его часто оказывается недостаточно, рост клеток замедляется, и выход антибиотика снижается. Решить эту задачу можно двумя способами: во-первых, изменить конструкцию ферментера, в котором выращивается культура *Streptomyces*, а во-вторых, используя методы генной инженерии, создать штаммы *Streptomyces*, более эффективно использующие имеющийся кислород. Эти два подхода не исключают друг друга. Одна из стратегий, которая используется некоторыми аэробными микроорганизмами для выживания в условиях недостатка кислорода, состоит в синтезе гемоглобинподобного продукта, способного аккумулировать кислород и доставлять его в клетки. Например, аэробная

бактерия *Vitreoscilla* синтезирует гомодимерный гемсодержащий белок, функционально подобный эукариотическому гемоглобину. Ген гемоглобина *Vitreoscilla* был выделен, встроен в плазмидный вектор *Streptomyces* и введен в клетки этого микроорганизма. После его экспрессии на долю гемоглобина *Vitreoscilla* приходилось примерно 0,1 % всех клеточных белков *Streptomyces coelicolor* даже в том случае, когда экспрессия осуществлялась под контролем собственного промотора гена гемоглобина *Vitreoscilla*, а не промотора *Streptomyces*. Трансформированные клетки *Streptomyces coelicolor*, растущие при низком содержании растворенного кислорода (примерно 5 % от насыщающей концентрации) синтезировали в 10 раз больше актинородина на 1 г сухой клеточной массы и имели большую скорость роста, чем нетрансформированные. Этот подход можно использовать и для обеспечения кислородом других микроорганизмов, растущих в условиях недостатка кислорода.

Исходным материалом при химическом синтезе ряда цефалоспоринов – антибиотиков, обладающих незначительным побочным эффектом и обладающий высокой антибактериальной активностью, – является 7-аминоцефалоспороановая кислота (7АСА), которая в свою очередь синтезируется из антибиотика цефалоспорина С. К сожалению, природных микроорганизмов, способных синтезировать 7АСА, до сих пор не выявлено. Предложен путь биосинтеза 7АСА за счет включения специфических генов в плазмиду гриба *Acremonium chrysogenum*, который в обычных условиях синтезирует только цефалоспорин С. Один из этих генов был представлен кДНК гриба *Fusarium solani*, кодирующий оксидазу D-аминокислот, а другой происходил из геномной ДНК *Pseudomonas diminuta* и кодировал фермент – цефалоспоринацилазу. В плазмиде гены находились под контролем промотора *Acremonium chrysogenum*. На первом этапе нового биосинтетического пути цефалоспорин С превращается в 7-β-(5-карбокси-5-оксопентанамид) цефалоспороановую кислоту (кето-AD-7АСА) при помощи оксидазы D-аминокислот. Часть этого продукта, вступая в реакцию с пероксидом водорода, одним из побочных продуктов, превращается в 7-β-(4-карбосибутанамид) цефалоспороановую кислоту (GL-7АСА). И цефалоспорин С, и кето-AD-7АСА, и GL-7АСА могут подвергаться гидролизу цефалоспоринацилазой с образованием 7АСА, однако

только 5 % цефалоспорина С напрямую гидролизуются до 7АСА. Исходя из полученных данных установлено, что для образования 7АСА с высоким выходом необходимы оба фермента.

### 2.3.3. Получение антибиотиков с использованием иммобилизованных ферментов

Хорошо известно, что 6-АПК является исходным соединением для получения эффективных полусинтетических аналогов природных пенициллинов. Получение 6-АПК в промышленности путем химического гидролиза бензилпенициллина сопряжено с большими трудностями в связи с крайней неустойчивостью лактамного цикла его молекулы. Так, при щелочном гидролизе бензилпенициллина выход 6-АПК составляет всего 1 %. *Продуктивность этого метода удалось значительно повысить благодаря применению гидролиза иммобилизованных бактериальных клеток, содержащих пенициллинамидазу.* Со второй половины 70-х годов XX века вся 6-АПК, выпускаемая в России и значительная часть 6-АПК, выпускаемой в Италии производится с помощью иммобилизованных ферментов. Применяют фермент, иммобилизованный путем включения клеток *E. Coli* в волокна триацетата целлюлозы, а на российских предприятиях используют бактериальные клетки, иммобилизованные в полиакриламидном геле. Переход к технологии, применяющей иммобилизованные бактериальные клетки обеспечивают высокий выход 6-АПК, составляющий 80–85 %. По данным японских исследователей, время полуйнактивации пенициллинамидазы в полиакриламидном геле бактериальных клеток равно 42 суткам при 30 °С или 17 суткам при 40 °С.

*Одним из перспективных методов получения антибиотиков является использование ферментов в качестве катализаторов.* Ферментативный синтез полусинтетических β-лактамов антибиотиков является объектом пристального внимания исследователей в течение нескольких десятилетий, а в последние годы он находит все большее практическое применение, благодаря преимуществам биокатализа, перед традиционными химическими технологиями. Прежде всего, это связано с возможностью достижения высокой чистоты конечного продукта, так как уникальная специфичность и высокая реакционная способность ферментов позволяет проводить

направленные реакции, избегая побочных процессов и риска рацемизации. Неоспоримы преимущества биокаталитических технологий с точки зрения охраны окружающей среды: ферментативные реакции протекают в мягких условиях (рН, температура); исключается использование токсических реагентов на стадии активации карбоксильной группы ацилирующего агента и особо вредных галогенсодержащих растворителей; значительно уменьшается общее количество используемых органических растворителей и реагентов. На сегодняшний день известны единичные случаи применения энзиматического синтеза для промышленного производства  $\beta$ -лактамных антибиотиков (например, выпуск цефалексина компанией DSM, Нидерланды).

Исходными соединениями для получения беталактамных антибиотиков являются пенициллины, такие как цефалоспорин С и цефамицин С или получаемые путем их химической или энзиматической трансформации производные (например, 7-фенилацетамидодезацетксифалоспороановая кислота, называемая цефалоспорином G).

Для ферментативного синтеза  $\beta$ -лактамных антибиотиков чаще всего используют широко специфичную пенициллинацилазу из различных микроорганизмов, а также другие ферменты, принадлежащие к тому же классу гидролаз, но более специфичные к синтезу определенных групп антибиотиков (например, синтетазу цефалоспоринов – из *E. Coli*). Пенициллинацилаза проявляет специфичность предпочтительно к фенилуксусной и феноксифуксусной кислотам, а также к их производным, содержащим небольшие заместители в положении (амин, гидроксил, метил) или в ароматическом ядре.

Известно два направления синтеза  $\beta$ -лактамов:

1. *Термодинамически контролируемый синтез* – прямое образование ациламидной связи из свободной карбоновой кислоты и ключевой аминокислоты (ядра антибиотика), являющееся наиболее простым энзиматическим способом синтеза  $\beta$ -лактамных антибиотиков;

2. *Кинетически контролируемый синтез* является альтернативой прямому синтезу, который предусматривает синтез с переносом ацильной части ацилирующего агента на первичную аминогруппу ключевой аминокислоты. Ацилирующим агентом в данном случае служит не свободная

карбоновая кислота, а активированное производное карбоновой кислоты или аминокислоты.

**Выделение продуктов биокаталитического синтеза.** Биокаталитические технологии отличаются от традиционных химических технологий не только стадией собственно синтеза, но и схемой выделения целевых продуктов. Реакционные смеси при ферментативном синтезе, как правило, содержат соединения близкой физико-химической природы, поэтому *разработка процессов разделения компонентов реакционных масс и выделения целевых продуктов, представляет собой, пожалуй, наиболее сложную проблему при создании биокаталитической технологии получения  $\beta$ -лактамов.* Особенно сложной является проблема разделения компонентов реакционной смеси синтеза аминокислот, содержащей три аминокислоты (целевой продукт, ядро  $\beta$ -лактама и побочный продукт синтеза), изоэлектрические точки и растворимость которых достаточно близки. Кроме того, из-за низкой растворимости побочных продуктов синтеза существует опасность осаждения их еще в процессе ферментативного превращения даже при работе с низкоконтцентрированными растворами реагентов, поскольку ацильный донор практически всегда берется в избытке.

Разработаны оригинальные методы отделения иммобилизованных ферментов от реакционной массы, содержащей кристаллические компоненты. *Один из методов основан на использовании иммобилизованного фермента с плотностью меньше единицы, частицы которого флотируют на поверхности жидкости после прекращения перемешивания реакционной массы, в то время как кристаллические продукты удаляются через днище реактора.* Другой подход к этой проблеме базируется на инженерном решении. Сконструированы специальные сита с порами такого размера, который позволяет мелким кристаллическим компонентам реакционной смеси проходить вместе с фильтратом через отверстия в сите, задерживая при этом в реакторе крупные частицы иммобилизованного фермента с диаметром более 150 мкм. Реакторы с такими фильтрующими ситовыми днищами используют, например, для отделения биокатализатора от смеси амоксициллина с парагидрокси-D-фенилглицина при получении амоксициллина.

#### 2.4. Условия культивирования продуцентов антибиотиков

Синтез антибиотиков определяется условиями культивирования микроорганизмов. Поэтому *оптимизация питательной среды является одним из главных факторов*, приводящих к увеличению выхода целевого продукта – антибиотика.

При проведении первой стадии технологического процесса получения антибиотиков применяют натуральные среды неопределенного состава, к числу которых относят продукты крахмалопаточного производства, агар, желатин, отруби, зерно. Композиция натуральных сред неопределенного состава не является постоянной. Например, агар, получаемый из разных видов морских водорослей, по химическому составу является сложным эфирным комплексом полисахарида с серной кислотой и разнообразными микроэлементами. Агар содержит также жирные кислоты, биотин, тиамин или его компоненты. В картофельной среде с глюкозой и пептоном, при одной и той же партии пептона и химически чистой глюкозы, состав картофельного экстракта зависит от сорта картофеля, места его выращивания, время уборки, срока и режима хранения и других причин. Поэтому для получения сопоставимых результатов, особенно при изучении физиологических и биохимических особенностей микроорганизма, применяют синтетические среды, в состав которых входят определенные химически чистые соединения, взятые в точно указанных концентрациях. Для выделения актиномицетов, являющихся основными продуцентами антибиотиков, используют синтетические питательные среды, в которые в качестве источника углерода добавляют крахмал или глицерин. В качестве источника азота в среды добавляют нитратные соли. На этих средах рост бактерий подавляется, а грибы развиваются в малом количестве. Чтобы они росли лучше, нужно подкислить среду до значений  $pH = 4,0-4,5$ . Например, мутантные штаммы культивируют на обогащенной питательными компонентами среде. Процесс контролируют либо по концентрации биомассы, либо по концентрации питательных веществ в среде. Исследования показали, что выход цефалоспорина С уменьшается при переходе от использования в качестве источника углерода сахарозы к быстро усваиваемому углеводу глюкозе. Наиболее оптимальной средой для образования антибиотика культурой

*Streptomyces antibioticus* оказалась смесь 0,1 % глюкозы и 1 % галактозы. При таком соотношении моносахаридов глюкоза быстро утилизируется и микроорганизм переключается на усвоение галактозы, что и инициирует идиофазу. Для производства ряда антибиотиков необходимы липидные компоненты, в частности, насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты. Так, например, для образования цефалоспорина С (штамм *Cephalosporium acremonium*) необходимо потребление в составе питательной среды жирных кислот: миристиновой  $C_{14:0}$ , пальмитиновой  $C_{16:0}$ , олеиновой  $C_{18:1}$ , линолевой  $C_{18:2}$ . Обнаружено, что при культивировании штамма обнаруживается максимальное потребление олеиновой и линолевой кислот.

Для выращивания актиномицетов предложено множество сред различного состава, например: соево-глицериновая среда, содержащая соевую муку – 1,5 %, глицерина – 3 %, натрия хлористого – 0,3 %, кальция карбоната – 0,3 % или соево-глюкозная среда, содержащая соевую муку – 1,5 %, глюкозы – 4 %, натрия хлористого – 0,25 %, кальция карбоната – 0,2 %, кальция хлорида – 0,2 %, сульфата натрия – 0,05 %. На этих средах культуры выращивают при  $28^\circ C$  в течение 6–7 суток.

На примере *Streptomyces hygroscopicus* (продуцент комплекса антибиотика азоломицина, полиеновых и неполиеновых макролидов) было показано, что использование хлористого аммония как единственного источника азота в высоких концентрациях или его добавление в питательные среды, содержащие аминокислоты (валин, треонин, серин) снижает синтез антибиотика. Добавление хлористого аммония в питательную среду, содержащую аланин и лизин, приводит к повышению синтеза антибиотика. Наличие в среде индивидуальных аминокислот валина и треонина также усиливает синтез антибиотика. Данный эффект может быть связан с тем, что у многих видов микроорганизмов ионы аммония ассимилируются по одному или двум метаболитным путям. При высоких концентрациях аммония глутаматдегидрогеназа катализирует восстановительное аминирование  $\alpha$ -кетоглутарата до глутамата, а при недостаточном снабжении ионом аммония глутаматсинтетазы катализирует АТФ-зависимое образование глутамина. Глутамин может быть образован в результате трансаминирования  $\alpha$ -кетоглутарата катализируемого глутаматсинтетазой.

Для увеличения выхода антибиотика и возможности направлять биосинтез в необходимом направлении в питательные среды добавляют ряд веществ – предшественников антибиотиков. Так как многие антибиотики



берут свое начало от промежуточных соединений обмена первичных метаболитов, то их биосинтез возможно регулировать путем ретроингибирования. Например, биосинтез пенициллина культурой гриба *Penicillium chrysogenum* контролируется по принципу обратной связи L-лизинном. Этот эффект объясняется тем, что биосинтез как пенициллина, так и лизина осуществляется через общего предшественника –  $\alpha$ -аминоадипиновую кислоту. Торможение лизином первого фермента биосинтеза (гомоцитратсинтазы) приводит к недостатку  $\alpha$ -аминоадипиновой кислоты, что снижает выход антибиотика. Добавление в питательную среду  $\alpha$ -аминоадипиновой кислоты предотвращает ингибирующий эффект лизина и активирует биосинтез пенициллина в отсутствие лизина. Кроме ретроингибирования биосинтез многих антибиотиков тормозится высокими концентрациями своих же антибиотиков. С накоплением определенной концентрации антибиотика рост микроорганизмов прекращается (например, *Streptomyces griseus* прекращает свой рост при концентрации в среде стрептомицина сульфата 0,5 %). Следует отметить, что в процессе эволюции многие микроорганизмы выработали механизмы защиты от действия собственных антибиотиков. Эта проблема успешно решается в результате использования иммобилизованных ферментов.

Большинство антибиотиков получают при глубокой аэробной ферментации периодического действия в асептических условиях. Период ферментации длится 7–10 суток.

*Стадия выращивания вегетативного инокулюма* в значительной мере определяет конечный результат ферментации. Установлено, что способность продуцента к интенсивному биосинтезу зависит от многих факторов, в том числе, от гидродинамических условий выращивания посевного материала, возраста и количества посевного мицелия. Культуры инокулюма используют от 10 % до 40 % при различных значениях интенсивности дыхания. Кроме того, направленность вторичного синтеза на образование того или иного метаболита определяется интенсивностью углеводного обмена, а именно, соотношением активности ферментов гликолиза и пентозофосфатного пути, которое в свою очередь зависит от характеристики посевного материала. На этом этапе при производстве антибиотиков необходимо проводить определение интенсивности дыхания посевной культуры, например, с помощью газоанализатора. Желательно использовать культуру с максимальной интенсивностью роста.

В процессе культивирования возникает необходимость изучения ферментов, катализирующих ключевые для вторичного метаболизма реакции, обусловленная практической задачей повышения продуктивности промышленных штаммов. Важное значение одного из этих ферментов – пропионил-КоА-карбоксилазы – определяется участием её в синтезе первичного безазотистого предшественника – метил-малонил-КоА, включаемого в макроциклические лактонные кольца макролидных антибиотиков (эритромицин, олеандомицин и др.), полиэфирных антибиотиков (салиномицин, монензин и др.) анзамицинов и др.

## 2.5. Выделение и очистка антибиотиков

Экстракцию антибиотиков из культуральной жидкости проводят ацетоном, бутанолом и другими органическими растворителями. Необходимо отметить, что при экстракции антибиотиков используют различные значения pH: для *A. Rubra* – нейтральное значение pH, для *A. Madurae* и *Carminata* (карминомицин) – щелочное значение pH.

*Технология выделения антибиотиков включает:* экстракцию антибиотиков подходящими растворителями, осаждение и перекристаллизация их из разных сред, фракционирование на ионообменных смолах, лиофильную и распылительную сушку готовых препаратов. На экстракцию антибиотика в значительной степени влияет значение pH. Так, например, при выделении антрациклиновых антибиотиков установлено, что антрациклиновые антибиотики (рубомидин, канамицин, доксорубин) взаимодействуют с полимерными сорбентами по ион-ионному и гидрофобному механизмам. Наиболее селективная сорбция происходит на сегрегированном карбоксильном катионите БДМ-12 (метакрилсодержащий катионит). Показано, что максимальное поглощение антрациклинового антибиотика находится в области нейтральных значений pH, когда в системе сорбент – сорбат реализуются как ион-ионные, так и гидрофобные взаимодействия.

Из культуральной среды антибиотики выделяют экстракцией органическими растворителями, осаждением, адсорбцией. Очистку антибиотиков проводят повторной заменой растворителя, адсорбционно-хроматографическими методами, высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). *От степени чистоты препарата, влажности, температуры, pH растворителя зависит стабильность антибиотика.*

Общая схема получения антибиотиков представлена на рис. 8.

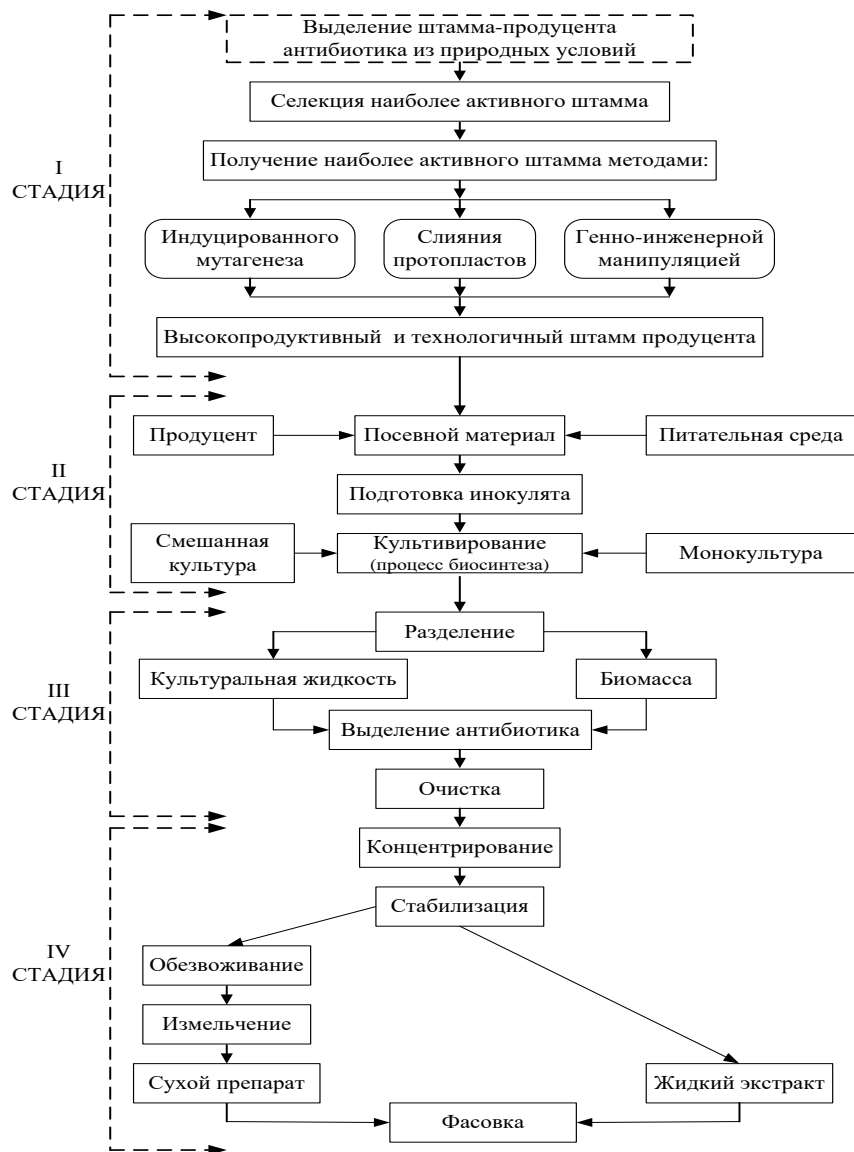


Рисунок 8 – Схема получения антибиотиков в процессе микробного биосинтеза (по Н.Е. Егорову, 1994)

## 2.6. Условия производства антибиотиков

Поскольку основным этапом микробиологического производства антибиотиков является процесс ферментации продуцента, осуществляющего синтез целевого продукта, особое внимание необходимо уделять конструкции ферментеров их автоматизации и обеспечению надежности производственного процесса. Ферментеры должны быть оснащены электронными стойками автоматического управления процессом ферментации в автоматическом режиме и контролировать такие технологические параметры, как значения pH, уровень растворенного кислорода ( $pO_2$ ), температуру, давление, число оборотов мешалки, уровень пены в аппарате, расход подаваемого на аэрацию воздуха. Также необходимо учитывать возможность последовательной передачи биологического материала из аппаратов меньшего объема в аппараты большего объема. Для обеспечения стерильных условий ферментации и защиты окружающей среды в составе обвязки ферментера должны присутствовать стерилизующие фильтры тонкой очистки, например, фирмы PALL или MILLIPORE (DURAPORE, MILIDISK), обеспечивающие подачу в ферментер стерильного воздуха и очистку отработанного воздуха, выбрасываемого в атмосферу.

**Аэрация культуральной жидкости в стерильных условиях.** Степень бактериальной очистки воздуха, подаваемого на аэрацию культуральной жидкости, во многих случаях должна быть выше, чем для воздуха, подаваемого в «чистые» помещения наиболее ответственных стадий фармацевтического производства инъекционных препаратов.

В полном объеме схема получения стерильного сжатого воздуха многостадийна и включает в себя фильтр на входе в компрессор, компрессор, теплообменники для охлаждения и нагрева воздуха, предфильтр, фильтр тонкой очистки. Наиболее ответственным узлом в этом перечне является фильтр тонкой очистки, который должен удовлетворять следующим требованиям:

- ❖ обеспечить гарантию 100 % удаления бактерий из сухого и влажного воздуха;
- ❖ иметь достаточно длительный срок службы (не менее 1 года);

- ❖ работать при низком исходном перепаде давления в продолжении длительного периода времени;

- ❖ обладать свойствами, позволяющими периодически осуществлять стерилизацию паром;

- ❖ быть простым в обслуживании;

- ❖ иметь надежное уплотнение фильтрующего элемента.

По механизму фильтрации фильтры тонкой очистки подразделяются на поверхностные и глубинные.

*Глубинные фильтры* удерживают отделяемые частицы во всем объеме фильтрующего материала. Для их изготовления в настоящее время используют волокнистые, порошковые и прессованные материалы, а также пластик на бумажной или асбестовой основе. Вероятность задержки микроорганизмов в таких фильтрах связана с толщиной фильтрующего слоя, вследствие чего степень эффективности находится в диапазоне 90–99,999 %. Теоретически нельзя удалить из воздушного потока 100 % находящихся в нем микроорганизмов. Поэтому применение глубинных фильтров возможно только на стадии предварительной фильтрации.

*Поверхностным фильтрам* свойственна абсолютная эффективность (100 %). Механизм их действия подобен работе сита. Частицы и микроорганизмы не могут преодолеть мембрану, так как она имеет поры, размер которых меньше, чем размер этих частиц и микроорганизмов. Как правило, мембраны изготавливают в виде простых листов из эфира целлюлозы, чистой целлюлозы, неорганических микроволокон, покрытых смолами, полипропилена, нейлона, капрона, фторопласта и других материалов, изготовленных как одно целое. Размеры пор мембран в этих материалах лежат в широком диапазоне от 0,1 мкм до 5 мкм. Для стерилизующих фильтров воздуха, подаваемого в ферментеры, как правило, используют мембраны с размерами пор 0,22 мкм. Большинство фильтров выдерживают в течение 1 года многократную стерилизацию при режиме 121 °С в течение 30 мин, либо 141 °С в течение 10 мин.

**Регулирование параметров процесса биосинтеза.** Управление технологическим процессом микробиологического синтеза заключается в поддержании на заданных уровнях значений основных технологических параметров.

Наиболее широко применяют следующие *контуры управления*:

- регулирование температуры культуральной жидкости путем изменения параметров теплоносителя;

- контроль и регулирование концентрации растворенного кислорода ( $pO_2$ ) путем изменения расхода воздуха, подаваемого на аэрацию или числа оборотов мешалки;

- поддержание давления в ферментере путем открытия или закрытия клапана на линии выходящего воздуха;

- стабилизация pH путем добавления кислоты или щелочи;

- поддержание уровня пены в заданных пределах путем внесения пеногасителя, снижения расхода воздуха или уменьшения числа оборотов мешалки;

- поддержание на заданном уровне концентрации ингредиентов субстрата в культуральной жидкости путем их добавления в ферментер.

**Регулирование температуры суспензии в ферментере.** Процесс обеспечивается за счет подачи в «рубашку» аппарата теплоносителя – смеси воды и пара, транспортируемой циркуляционным насосом. Регулировка температуры теплоносителя в диапазоне от 0 до 150 °С с точностью  $\pm 0,5$  °С обеспечивается за счет установления требуемой температуры на стойке управления. Паровоздушная смесь, пройдя через обратный клапан и инжектор, в котором происходит смешение воды и пара, поступает в рубашку ферментера. После выхода из рубашки, теплоноситель поступает на вход циркуляционного насоса. Избыток теплоносителя, образующийся за счет конденсации пара, отводится в канализацию через отрегулированный на определенное давление клапан.

**Контроль уровня растворенного кислорода.** Растворенный кислород имеет исключительно большое значение в процессах биосинтеза, характеризующихся интенсивными скоростями роста биомассы и повышенными вязкостями культуральной жидкости, что характерно для процессов получения антибиотиков. При анаэробном метаболизме кислород играет роль акцептора электронов или водорода при участии фермента оксидазы. Кроме того, с помощью оксигеназ кислород может встраиваться в молекулу углеродных субстратов при их катаболизме. Причем, требующееся на единицу биомассы количество кислорода зависит от свойств субстрата

(углеводы требуют меньшего количества кислорода, а углеводороды – значительно большего). Экспериментально установлено, что в случае ферментации бактерий и грибов, использующих в качестве источника энергии углеводы, на 1 г сухой биомассы требуется 1 г кислорода (теоретически для биосинтеза 3,39 г сухой биомассы – 1 г кислорода).

Кислород является трудно растворимым газом (8 мг/л при 25 °С; 7 мг/л при 35 °С), причем наличие солей в жидкости существенно снижает растворимость в ней кислорода. При высоком содержании биомассы в культуральной жидкости (потребление кислорода может достигать 50 г/л) необходимо интенсивно пополнять среду растворенным кислородом. Датчики, регистрирующие концентрацию растворенного кислорода, выдерживающие многократную стерилизацию, основаны на методе полярографического определения диффузионного потока кислорода через полупроницаемую мембрану, под которой располагается анод (материал – свинец или серебро) и катод (материал – платина) в растворе электролита. Датчики имеют температурную компенсацию в диапазоне 0–50 °С.

**Рабочее давление в ферментере** может изменяться от 0 до 2,5 атм. Результирующий сигнал от датчика давления преобразуется в электрический сигнал и по команде от блока управления с помощью клапана обратного давления поддерживает его в заданных пределах. Контур давления дополнительно оснащен контрольным манометром.

**Концентрация водородных ионов (pH)** – важный параметр, влияющий на рост микроорганизмов и образование конечного продукта. Бактерии обычно растут в диапазоне значений pH 4–8, дрожжи при pH 3–6, микроскопические грибы при pH 3–7. По разным причинам pH в ходе ферментации имеют тенденцию к изменению, поэтому необходима схема управления и поддержания pH на оптимальном уровне. Регулирование pH осуществляется автоматически добавлением кислоты или щелочи при помощи перистальтических насосов (температурная компенсация 0–100 °С).

**Регулирование уровня пены.** Процесс культивирования аэробных микроорганизмов сопровождается образованием пены. Это связано, во-первых, с введением в жидкость воздуха, во-вторых, с наличием в составе культуральной жидкости белков и других поверхностно активных веществ,

стабилизирующих пузырьки пены. В стойких пенах длительность существования пузырька 1–15 мин.

Интенсивное пенообразование затрудняет максимальное использование емкости биореактора, так как способствует выбросу пены и потери целевого продукта. Кроме того выброс пены зачастую приводит к нестерильности продукта. Для пеногашения в настоящее время используют различные методы: механические (разрушение пены за счет ударного воздействия твердых поверхностей, воздействия струями жидкости или газа, резкое изменение давления и др.); химические (добавление поверхностно-активных веществ, уменьшающих прочность пленок, добавление веществ, связывающих пенообразователи в поверхностно-неактивные комплексы); физические методы (электрическое пеногашение, воздействие колебаний звуковой или ультразвуковой частоты и др.); стабилизация уровня пены путем временного уменьшения подачи воздуха или временного прекращения механического перемешивания, вывода избыточной пены из биореактора. Наиболее эффективными по нашему мнению являются химические и механические способы пеногашения или их комбинации. Проблему вспенивания можно решить, если оставить в верхней части реактора достаточный объем пустого пространства, в котором бы лопались пузырьки воздуха, но это уменьшает рабочий объем реактора на 25–30 %.

Таким образом, регулирование уровня пены осуществляется несколькими способами:

- ✓ воздействие на пену химическими и физико-химическими средствами;
- ✓ разрушение пены механическими, гидро- и аэродинамическими способами;
- ✓ разрушение пены колебаниями звуковой и ультразвуковой частоты;
- ✓ стабилизация уровня пены уменьшением расхода аэрирующего воздуха и снижением числа оборотов мешалки.

Для химического пеногашения наибольшее распространение получили полиэфирные препараты пропинол Б-400 и адеканоль, полиметилсилоксаны АС-60 и др. В ходе культивирования химические пеногасители

могут подаваться либо по заранее заданной программе, либо по мере необходимости при повышении уровня пены.

**Стерилизация питательных сред и аппаратуры.** В биотехнологии наибольшее распространение получила *термическая стерилизация*. В технических системах, работающих в асептических условиях, должна обеспечиваться стерилизуемость всех точек внутренних объемов аппаратов, коммуникаций, арматуры, контрольно-измерительных приборов, непосредственно соприкасающихся с чистыми культурами целевых микроорганизмов или со стерильными материальными потоками. Для этого в каждой точке необходимо создать требуемую температуру и поддерживать её в течение заданного промежутка времени.

Наибольшим бактерицидным эффектом обладает насыщенный водяной пар под давлением. При стерилизации насыщенным водяным паром споры наиболее устойчивых термофилов гибнут при температуре 121 °С и времени экспозиции 25 мин, при 132 °С – за 4 мин. При использовании сухого пара время гибели спор составляет при 160 °С – 60 мин., а при 180 °С – 10 мин. Инактивация спор в кипящей воде при 100 °С происходит медленно, они гибнут через 8–9 часов. Большое значение имеет содержание воды в клетке микроорганизма – чем больше воды, тем ниже температура коагуляции белков. Именно этим объясняется высокий стерилизующий эффект насыщенного водяного пара – он не только нагревает, но и увлажняет клетки, что повышает термочувствительность.

*Стерилизацию жидких питательных сред* при работе с небольшими объемами целесообразно вести в периодическом режиме в несколько этапов:

- стерилизация всех коммуникаций и ферментера острым или глужим паром;
- наполнение аппарата прогретой гомогенизированной средой;
- нагревание питательной среды до температуры стерилизации;
- выдерживание при температуре стерилизации в течение времени, необходимого для гибели всех микроорганизмов;
- охлаждение стерильной питательной среды в этой же емкости.

Этот способ стерилизации длителен, и поэтому во избежание существенных изменений в составе среды, процесс ведут при избыточном дав-

лении 0,5–1 атм при температуре 110–120 °С в течение 1–1,5 часов с момента достижения заданной температуры.

Особое внимание следует уделять *стерилизации аппаратуры и коммуникаций, предназначенных для подачи пеногасителя* (125–135 °С в течение 1,5–2 часов). Стерилизацию осуществляют в следующей последовательности:

- входной и выходной фильтры тонкой очистки, трубопроводы, арматура;
- ферментеры;
- питательная среда при следующих режимах: температура – 120–124 °С, время выдержки после достижения заданной температуры – 40–60 мин.

### **2.6.1. Получение пенициллина**

*Для производства пенициллина используют специально отобранные расы плесневых грибов* (суперпродуцентов), принадлежащие к роду *Penicillium*. Для промышленного производства пенициллина применяют биореакторы-ферментеры с механическим перемешиванием, объемом свыше 10000 дм<sup>3</sup>. Питательная среда, используемая для производства пенициллина, обычно содержит кукурузный экстракт, лактозу, глюкозу и др.

После стерилизации и охлаждения среда засеивается проросшими спорами гриба, аэрируется путем пропускания через нее воздуха и перемешивается с помощью мешалки. Температуру культивирования поддерживают в пределах 24–25 °С. Для предотвращения чрезмерного образования пены применяются химические пеногасители. После окончания ферментации мицелий гриба отделяется вакуумной фильтрацией или центрифугированием.

Технологическая схема производства пенициллина приведена на рис. 9.

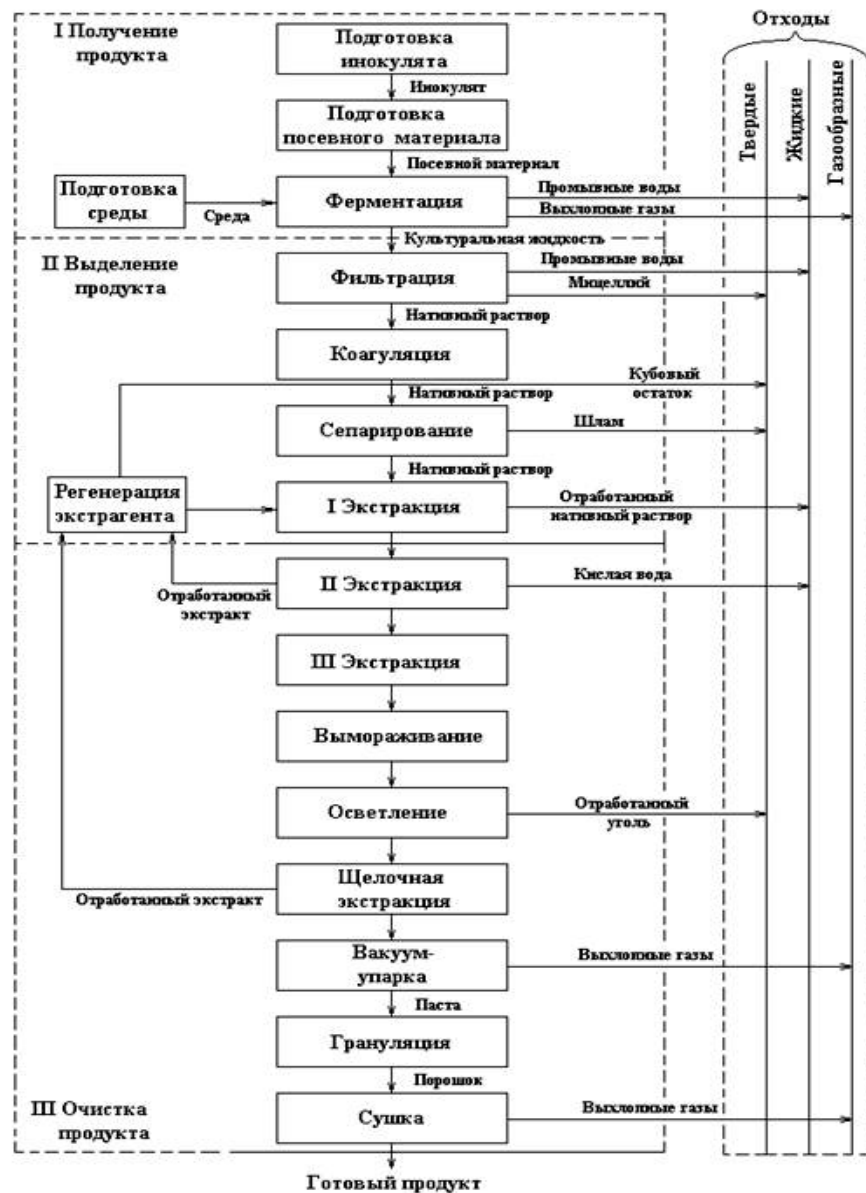


Рисунок 9 – Технологическая схема производства пенициллина

Для концентрирования пенициллина применяется экстракция органическими растворителями и адсорбция на активированном угле. Возможно также применение упаривания и осаждения.

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

Вместо кукурузного экстракта может быть применена арахисовая мука, жмыхи, мука из хлопковых семян и другие источники. Возможность широкого использования продуктов растительного происхождения обусловлена тем, что у *P. chrysogenum* имеются сильные протеолитические ферменты. В качестве углеводов часто используют сахарозу или смесь лактозы с глюкозой в соотношении 1 : 1. Глюкоза может снижать биосинтез антибиотика; на средах, содержащих лактозу или сахарозу (в условиях депрессии), биосинтез антибиотика идет активнее. Важную роль в процессе биосинтеза пенициллина играет сера, которая содержится в структуре антибиотика. В качестве источника серы используются натрия сульфат и натрия тиосульфат. Избыток ионов меди не влияет на рост гриба, но подавляет биосинтез пенициллина. Эффект торможения биосинтеза снимается добавлением в среду ионов железа. *P. Chrysogenum* в качестве источника фосфора может использовать не только фосфаты, но и фитаты (соли инозитфосфорных кислот). Этот продуцент содержит фермент, разрушающий фитин с освобождением неорганического фосфора.

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

Синтез того или иного пенициллина зависит от наличия специфического вещества в среде, иначе говоря, предшественника, который микроорганизм включает в молекулу антибиотика без предварительного расщепления. Следует отметить, что предшественники биосинтеза пенициллина (фенилуксусная кислота, фенилацетамид, феноксиуксусная кислота) при определенных концентрациях и рН среды оказывают токсическое влияние

на продуцент. Фенилуксусная кислота ( $C_6H_5CH_2COOH$ ) наименее токсична. Добавление её в среду в концентрации выше 500 мкг/мл угнетает рост мицелия, особенно в первые 24 часа его развития. При таких условиях обеспечивается наибольший выход бензилпенициллина, который через 72 часа развития может достигать 500–1000 мкг/мл.

При развитии гриба без внесения предшественника образуется около 45 % бензилпенициллина (пенициллин G) и около 53 % пенициллина K (радикал – п-гептилпенициллин). При добавлении к среде фенилуксусной кислоты меняется соотношение образующихся компонентов в сторону резкого увеличения бензилпенициллина, количество которого в зависимости от возраста достигает 75–99 % от смеси пенициллинов. В процессе культивирования *P. Chrysogenum* в среде, не содержащей фенилуксусной кислоты, в ней накапливаются серосодержащие соединения не β-лактамного характера, близкие к цистеину и метионину. Добавление в среду фенилуксусной кислоты способствует более интенсивному метаболизму серосодержащих компонентов в соединения β-лактамного характера.

При развитии продуцента пенициллина (гриба *P. Chrysogenum*) на кукурузно-лактозной среде выделяют три фазы.

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

*Вторая фаза* – максимальное образование пенициллина. Это связано с быстрым потреблением лактозы и аммонийного азота. Увеличение массы мицелия незначительное, потребление кислорода снижается, pH среды остается почти без изменений.

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

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

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

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

Процесс биосинтеза пенициллина ведется при самом тщательном соблюдении стерильности всех операций, так как загрязнение культур посторонней микрофлорой резко снижает накопление антибиотика. Это связано с тем, что многие бактерии воздуха способны образовывать пенициллиназу. Особенно активно продуцируют этот фермент *B. subtilis* и *B. cereus*. Одним из активных продуцентов пенициллиназы является туберкулезная палочка (*Mycob. tuberculosis*). Предположительно именно с этим свойством связана резистентность этого микроорганизма к пенициллину.

Механизм биосинтеза молекулы пенициллина представлен на рис. 10.

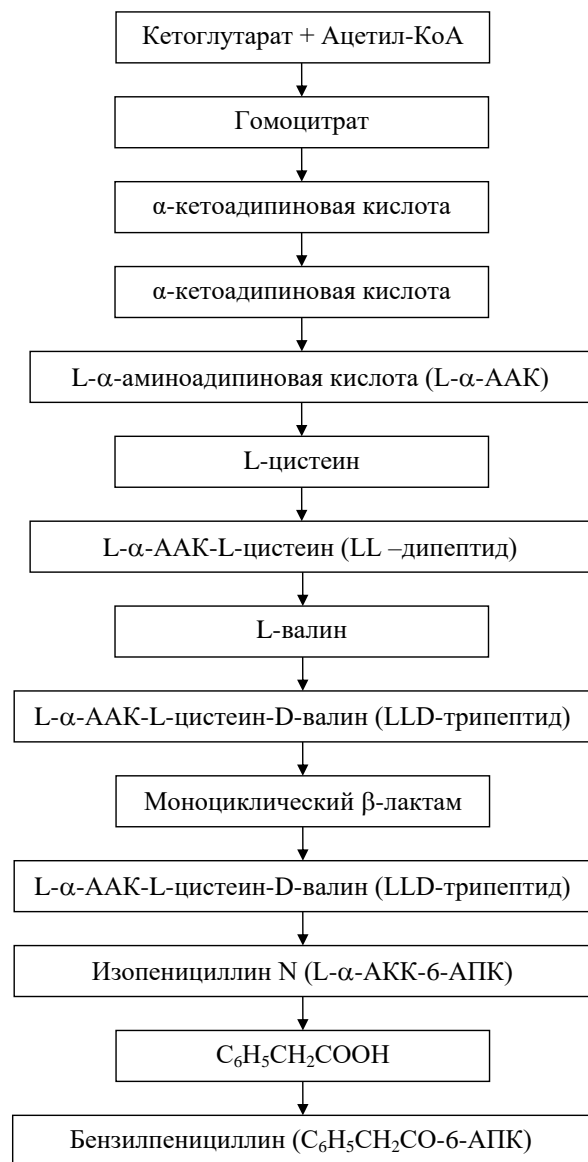


Рисунок 10 – Механизм биосинтез молекулы пенициллина

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

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

В сухой кристаллической форме пенициллиновые соли достаточно стабильны в течение длительного времени при температуре 4 °С. Растворы быстро теряют активность (в течение 24 часов при температуре 20 °С), их готовят непосредственно перед введением.

В настоящее время большое практическое значение имеет *полусинтетический* (биологический + химический) способ получения аналогов природного пенициллина. Исходным продуктом служит 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК). Эту кислоту получают в результате биосинтеза при развитии *P. Chrysogenum* при отсутствии предшественника в среде или путем ферментативного дезацилирования бензилпенициллина или феноксиметилпенициллина при участии фермента пенициллинацилазы (пенициллинамидазы). Второй способ наиболее перспективен. Используется иммобилизованная пенициллинацилаза, которая гидролизует бензилпенициллин с образованием 6-АПК и фенилуксусной кислоты. Пенициллинацилаза образуется различными группами микроорганизмов, в том числе она образуется всеми продуцирующими пенициллин грибами. В настоящее время предложен способ получения иммобилизо-



ванных клеток *E. Coli* с высокой пенициллинацилазной активностью, пригодных для многократного применения.

Сама по себе 6-АПК не активна. Её подвергают химическому ацилированию и получают аналоги пенициллина (оксациллин, ампициллин, метициллин, амоксициллин и др.) с улучшенными или новыми свойствами. Всего в настоящее время используется порядка четырех десятков таких препаратов.

Из всего общего количества природных пеницилинов примерно 35 % используется как медицинские препараты, а 65 % – для получения 6-АПК.

### 2.6.2. Получение стрептомицина

Для производства стрептомицина используют штаммы актиномицета *Streptomyces griseus*, образующего воздушный мицелий и споры. Продуцент образует максимальное количество стрептомицина в жидкой питательной среде, содержащей мясной экстракт.

В качестве основы питательных сред используют продукты гидролиза растительных или животных белков. Среду стерилизуют при 120 °С, охлаждают и засевают посевным материалом. Культивирование проводится при 25–30 °С и сопровождается аэрацией и перемешиванием.

На рис. 11 представлена аппаратурная схема производства стрептомицина.

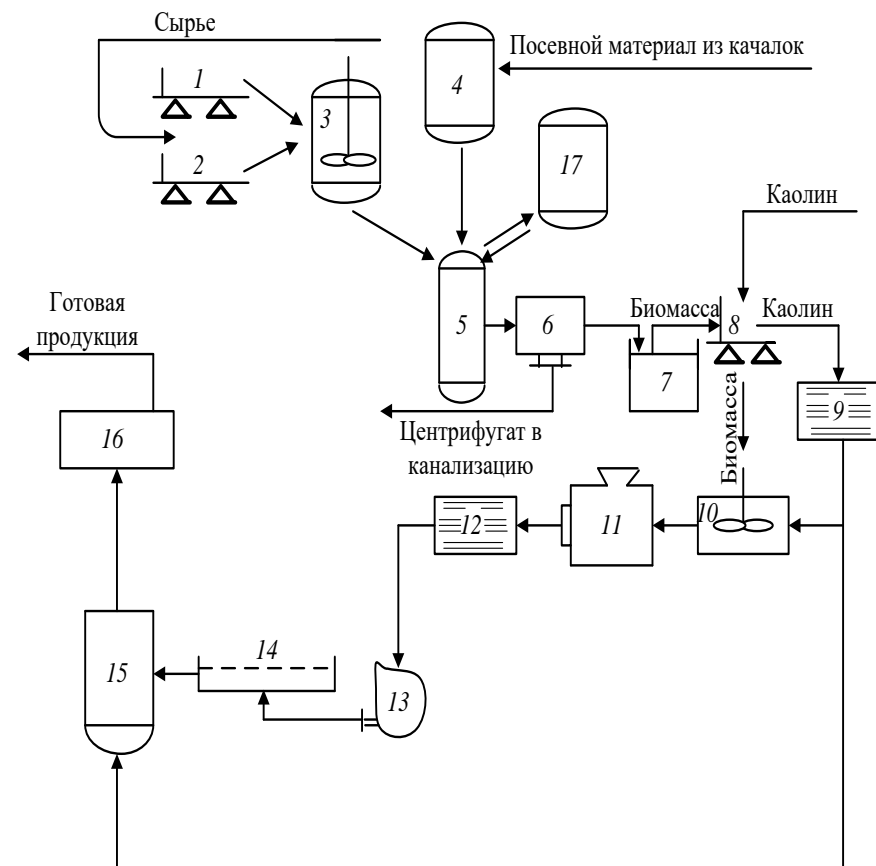


Рисунок 11 – Аппаратурная схема производства стрептомицина:

1,2 – весы для сырья; 3 – емкость для приготовления питательной среды; 4 – аппарат для посева; 5 – биореактор; 6 – центрифуга; 7 – емкость для биомассы; 8 – весы для биомассы и каолина; 9 – электросушильный шкаф для стерилизации каолина; 10 – смеситель; 11 – гранулятор; 12 – электросушильный шкаф для сушки гранулированной биомассы с каолином; 13 – мельница; 14 – вибрационное сито; 15 – емкость для стандартизации продукта; 16 – агрегат для упаковки и маркировки готового продукта; 17 – емкость для дезинфицирующего раствора

Затем культуральная жидкость фильтруется для удаления мицелия. С этой целью пользуются фильтр-прессами, обеспечивающими высокую скорость фильтрации. До подачи жидкости в фильтр к ней для улучшения фильтрации примешивают наполнитель, не поглощающий стрептомицин. После такой первичной фильтрации рН фильтрата доводят до определенной величины, а затем окончательно отфильтровывают его с помощью второго фильтра. Осадок, оставшийся после фильтрации, утилизируется.

Стрептомицин и некоторые примеси извлекают из фильтрата путем адсорбции на активированном угле, который затем автоматически подается в фильтр-пресс, где остатки неактивной жидкости отделяются. Стрептомицин смывается с активированного угля разбавленным спиртовым раствором соляной кислоты, нейтрализуется и затем концентрируется путем упаривания. Полученный концентрат обрабатывается ацетоном, который осаждает солянокислый стрептомицин. Смесь фильтруется через пресс, причем фильтрат поступает на регенерацию растворителя. К безводному спиртовому раствору соли стрептомицина добавляют спиртовой раствор хлористого кальция, чтобы получить кристаллическую соль стрептомицина. В асептических условиях соль стрептомицина растворяют в воде, пропускают через фильтр (0,22 мкм) для стерилизующей фильтрации с целью удаления микроорганизмов, затем подвергают лиофилизации, измельчают в порошок и фасуют.

### 2.6.3. Получение гентамицина

Гентамицина сульфат – антибиотик, относящийся к группе аминогликозидов; представляет собой смесь гентамицинов сульфатов, которые образуются культурой *Micromonospora purpurea*. Основные компоненты гентамицина сульфата представлены как:

C1 ( $C_{21}H_{43}N_5O_7$ ), где R1 – CH<sub>3</sub>, R2 – CH<sub>3</sub>, R3 – H;

C1a ( $C_{19}H_{39}N_5O_7$ ), где R1 – H, R2 – H, R3 – H;

C2 ( $C_{20}H_{41}N_5O_7$ ), где R1 – H, R2 – CH<sub>3</sub>, R3 – H;

C2a ( $C_{20}H_{41}N_5O_7$ ), где R1 – H, R2 – H, R3 – CH<sub>3</sub>;

C2b ( $C_{20}H_{41}N_5O_7$ ), где R1 – CH<sub>3</sub>, R2 – H, R3 – H.

В соответствии с требованиями фармакопеи проводят нормирование каждого компонента: C1 – от 20 % до 40 %; C1a – от 10 % до 30 %; C2, C2a, C2b – от 40 % до 60 %.

Гентамицин подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе *Proteus*, *Pseudomonas*, не оказывает действия на грибы. Применяют гентамицин сульфат при различных инфекционных заболеваниях, вызванных чувствительными к нему микроорганизмами. Препарат особенно эффективен при инфекциях мочевыводящих путей, респираторных и желудочно-кишечных болезнях. В связи с широким спектром действия гентамицин назначают часто при смешанной инфекции, а также когда возбудитель не установлен (в том числе, при общей экстренной профилактике).

Субстанция гентамицина сульфата представляет собой пористую массу или порошок белого или почти белого цвета. Гигроскопичен, легко растворим в воде, практически не растворим в 95 %-ном спирте, хлороформе, эфире.

Современное промышленное получение гентамицина сульфата – это сложная многоступенчатая система, состоящая из ряда последовательных технологических стадий. На рис. 12 представлена технологическая схема получения гентамицина сульфата.



Рисунок 12 – Технологическая схема получения гентамицина сульфата

**Приготовление посевного материала.** Исходной в производстве гентамицина является культура *Micromonospora purpurea* var. *Violacea* штамм ВНИИ-7R, выращенная в пробирках на скошенной агаризированной среде Гаузе-1.

**Подготовка посевного материала** – одна из ответственных операций в цикле биотехнологических процессов получения гентамицина. От количества и качества посевного материала зависит как развитие культуры в ферментере, так и биосинтез гентамицина в целом.

При получении вегетативного посевного материала второй генерации используют вегетативный посевной материал первой генерации, если он отвечает следующим требованиям:

- биомасса средней густоты от бежевого до розово-сиреневого цвета, при взбалтывании мицелий обволакивает стенки флакона, не оседает на дно и не расслаивается;
- при микроскопии окрашенного препарата наблюдаются микроколонии, гифы длинные или средней длины, волнистые, протоплазма базофильная, иногда в виде пунктира;
- посторонняя микрофлора отсутствует.

Выращивание вегетативного посевного материала второй генерации осуществляют в посевном биореакторе для глубинного культивирования, снабженного мешалкой, барбатером для подачи воздуха, рубашкой для нагрева и охлаждения среды. Приготовление посевной среды проводят в биореакторе БИОР-0,1.

**Биосинтез гентамицина (культивирование).** Процесс биосинтеза гентамицина в аппаратах БИОР-0,25 осуществляется *методом периодического глубинного культивирования*. Посевной материал вносят в среду для культивирования в количестве 5–10 % от её объема. Культивирование длится 6–7 суток. В табл. 4 показаны режимы культивирования продуцента гентамицина в биореакторе БИОР-0,25.

Таблица 4 – Режимы культивирования продуцента гентамицина в биореакторе БИОР-0,25

Регулируемые показатели	Продолжительность культивирования, ч		
	0–24	24–96	96 – до слива
Температура, °С	37 ± 1	33 ± 1	33 ± 1
Расход воздуха на аэрацию, дм <sup>3</sup> /мин	75	105	75
Частота вращения мешалки, об/мин	3,5	4,16	3,5

Изменение режимов аэрации в ферментере проводят с учетом массо-обменных характеристик аппаратов по сульфитному числу. Давление в процессе биосинтеза поддерживается в пределе 0,05–0,2 кгс/см<sup>2</sup>. При вспенивании культуральной жидкости вводят порционно 50 см<sup>3</sup> стерильного пенногасителя.

**Предварительная обработка и ультрафильтрация культуральной жидкости.** Культуральную жидкость из ферментера загружают в приемную емкость, включают насос на перемешивание и проводят предварительную обработку последовательным добавлением реагентов (растворы щавелевой кислоты, цетилперидиний бромида) для коагуляции белков и удаления поливалентных металлов.

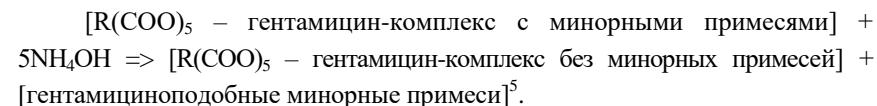
Процесс ультрафильтрации осуществляют на установке типа УСФ-1. При ультрафильтрации культуральной жидкости происходит процесс концентрации растворов высокомолекулярных соединений (в том числе и антибиотиков) с одновременной очисткой их от низкомолекулярных примесей путем пропускания раствора через мембрану.

**Сорбция гентамицина на катионите КБ-2 в аммонийной форме и десорбция.** Процесс выделения и химической очистки гентамицина на катионите КБ-2 включает следующие операции: сорбция гентамицина из нативного раствора, элюирование минорных компонентов, десорбция гентамицина.

Для сорбции гентамицина его нативный раствор из сборной емкости подают насосом снизу вверх на ионно-обменную колонку, заполненную катионитом КБ-2 в аммонийной форме.

В колонне десорбции проводят стадию химической очистки (удаление гентамициноподобных и окрашивающих примесей) и десорбцию гентамицина.

Элюирование минорных компонентов примесей проводят 0,043Н раствором аммиака, пропуская его через слой катионита в ионообменной колонне сверху вниз:



Десорбцию гентамицина проводят 5 %-ным раствором аммиака, пропуская его через колонну с катионитом сверху вниз.

**Получение концентрата гентамицина.** Полученный элюат гентамицина упаривают на роторном испарителе (Т = 50–55 °С, Р = 0,085 МПа) для удаления аммиака и концентрирования гентамицина до 60000–70000 мкг/см<sup>3</sup>.

**Осветление концентрата гентамицина основания углем и перевод его в сульфат форму.** Очищенный и сконцентрированный раствор гентамицина основания помещают в колбу и подкисляют раствор 20 %-ной серной кислоты до рН 6,0–6,5; добавляют активированный уголь (7 % от объема концентрата) и нагревают до 40–45 °С при перемешивании 30 мин, затем уголь отфильтровывают.

**Распылительная сушка водных растворов гентамицина сульфата.** Распылительную сушку осветленного концентрата гентамицина сульфата производят на лабораторной сушилке типа УРС-0,5, предназначенной для распылительного обезвоживания растворов в асептических условиях. Сушителем является очищенный воздух.

Перед началом работы все детали сушильной камеры моют, протирают спиртом, собирают и высушивают горячим воздухом при 108 °С.

Далее устанавливают значения температур воздуха-теплоносителя: на входе в сушильную камеру – 175–185 °С; на выходе из сушильной камеры – 103–105 °С.

Раствор антибиотика, подаваемый в сушильную камеру, распыляется в токе нагретого воздуха до мелких капель.

**Фасовка, упаковка и маркировка препарата гентамицина сульфата.** Загрузку и выгрузку препарата из сушилок, а также фасовку проводят в помещениях, где поддерживаются асептические условия.

Фасовка осуществляется в ламинарном боксе. Порошок гентамицина сульфата переносят из приемной тары распылительной сушилки в банки из оранжевого стекла с винтовой горловиной и навинчиваемой крышкой.

## 2.7. Контроль антибиотиков

Требования к качеству антибиотиков изложены в Государственной Фармакопее Украины и Европейской фармакопее. *Методов определения активности антибиотиков много, но главным из них является микробиологический.*

Способность убивать или тормозить рост и развитие микроорганизмов называют биологической активностью препарата. В связи с этим различают цидное и статическое действия веществ. Например, антибиотики обладают фунгицидным, бактерицидным действием или фунгистатическим и бактериостатическим действием.

*Для количественного определения активности антибиотика введено понятие единицы действия (ЕД).* При определении активности выделенного антибиотика обычно в качестве эталона используют химически чистый препарат с заранее известной величиной активности. *ЕД* – это активность определенного весового количества антибиотика, принятого за эталон.

Активность антибиотиков определяют путем сравнения степени угнетения роста чувствительных микроорганизмов в результате действия испытуемого антибиотика и стандартного образца в известных концентрациях. Стандартные образцы, используемые для количественного определения, представляют собой вещества, активность которых точно установлена в соответствии с международным стандартом препарата. При количественном определении активности доверительные интервалы ( $P = 0,05$ ) должны составлять не менее 95 % и не более 105 % от установленной активности.

*Количественное определение* проводят, используя один из двух методов: *метод диффузии* или *турбометрический метод*.

**Метод диффузии.** Питательную среду, рекомендованную для количественного определения, расплавляют и вносят в нее при температуре, например, от 48 °С до 50 °С определенное количество суспензии микроорганизмов, чувствительных к исследуемому антибиотику. После внесения тест-микроорганизма, питательную среду разливают в чашки Петри (слой от 2 мм до 5 мм). Затем готовят растворы стандартного образца с известными концентрациями и растворы исследуемого антибиотика в концентрациях аналогичных концентрациям стандартного образца. Растворы вносят в лунки на твердой среде, содержащей тест-микроорганизмы. Чашки инкубируют при подходящей температуре около 18 часов. Затем измеряют диаметры круглых зон угнетения роста с точностью не менее 0,1 мм (или их площадь) и рассчитывают активность, используя подходящие статистические методы.

**Турбометрический метод.** В питательную среду вносят суспензию микроорганизмов, чувствительность которых к испытуемому антибиотику обеспечивает достаточно сильное угнетение роста в условиях проведения эксперимента. Затем готовят растворы стандартного образца с известными концентрациями и растворы исследуемого антибиотика в концентрациях аналогичных концентрациям стандартного образца. Равные объемы каждого из растворов вносят в одинаковые пробирки и добавляют в каждую пробирку равные объемы инокулированной питательной среды. Пробирки выдерживают при указанной температуре от 3 до 4 часов. После окончания периода инкубации останавливают рост микроорганизмов путем добавления в каждую из пробирок 0,5 мл формальдегида. Проводят измерение мутности и проводят расчет активности, используя подходящие статистические методы.

Кроме микробиологического метода контроля *применяют химические и физико-химические методы:* колориметрию, жидкостную и тонкослойную хроматографию, спектрофотометрию в ультрафиолетовой и инфракрасной областях и др.

В табл. 5 приведена характеристика субстанций антибиотиков в соответствии с требованиями фармакопее Украины. Субстанция антибиотиков также проходит контроль по следующим тестам: стерильность, бакте-

риальные эндотоксины или пирогенность, тяжелые металлы, аномальная токсичность, оптическая плотность, компонентный состав и др.

Таблица 5 – Характеристика субстанций антибиотиков в соответствии с требованиями фармакопеи Украины

Наименование антибиотика	Количественное определение	Описание; растворимость	Идентификация; оптическое вращение	pH; вода	Примеси; сульфатная зола
1	2	3	4	5	6
Азитромицин $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$	96–102	Порошок белого или почти белого цвета; практически не растворим в воде, легко в этаноле	ИКС кач. реакции; от $-45^\circ$ до $-49^\circ$	9,0–11,0; от 1,8 % до 6,5 %	ВЭЖХ не более 6,2 %; не более 0,2 %
Тетрациклина гидрохлорид $C_{22}H_{25}ClN_2O_8$	95–102	Порошок желтого цвета; растворим в воде, мало в спирте, не растворим в ацетоне	ТСХ кач. реакции; от $-240^\circ$ до $-49^\circ$	1,8–2,8; не более 2,0 %	ВЭЖХ не более 5,5 %; не более 0,5 %
Гентамицина сульфат $C_{21}H_{43}N_5O_7$ $C_{19}H_{39}N_5O_7$ $C_{20}H_{41}N_5O_7$	Не менее 590 МЕ/мг	Порошок белого или почти белого цвета; растворим в воде, практически не растворим в спирте	УФС, ТСХ кач. реакции; от $+107^\circ$ до $+121^\circ$	3,5–5,5; не более 15,0 %	ВЭЖХ не более 10 %; не более 1,0 %
Линкомицина гидрохлорид $C_{18}H_{35}ClN_2O_6S.H_2O$	82,5–93,0	Порошок белого или почти белого цвета; растворим в воде, мало растворим в спирте и ацетоне	ИКС, ТСХ кач. реакции; от $+135^\circ$ до $+150^\circ$	3,5–5,5; от 3,1 % до 4,6 %	ГЖХ не более 5,0 %; не более 0,5 %

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5	6
Бензилпенициллина калиевая соль $C_{16}H_{17}KN_2O_4S$	96,0–101,0	Порошок белого или почти белого цвета; растворим в воде	ИКС, ТСХ кач. реакции; от $+270^\circ$ до $+300^\circ$	5,5–7,5;	ВЭЖХ Каждая примесь не более 1,0 %;
Нистатин $C_{47}H_{75}NO_{17}$	Не менее 4400 МЕ/мг, нистатина не менее 85,0 %	Порошок желтого или слегка коричневого цвета; не растворим в воде, растворим в диметилсульфоксиде	УФС, ИКС кач. реакции;	-; не более 5,0 %	Каждая примесь не более 4,0 %; не более 3,5 %

### Заключение

Необходимость поисков новых антибиотиков обусловлена многими причинами. Так, ежегодно на нашей планете умирают от инфекционной патологии более 50 млн. человек. С инфекционными и паразитарными болезнями связаны 25 % смертности в мире, а с учетом роли инфекции в «неинфекционных» заболеваниях – почти 35 %. Кроме того, наблюдаются «возвращающиеся инфекции», т.е. инфекции, которые достались нам в наследство от предыдущих веков. Среди них туберкулез, малярия, лейшманиоз, инфекции, передающиеся половым путем (например, сифилис). В то же время, наблюдается появление новых инфекций.

Наряду с этим выявлены и недостатки, связанные с высокой резистентностью микроорганизмов к антибиотикам и появлению штаммов не только антибиотикоустойчивых, но и антибиотикозависимых.

Кроме того, установлено, что широкое и бесконтрольное применение антибиотиков быстро привело к появлению резистентных и атипичных форм

большинства актуальных возбудителей инфекционных болезней. Началась гонка по созданию все новых и новых антибактериальных препаратов, большинство из которых быстро становились малоэффективными. В настоящее время описано более 6000 антибиотиков. Однако только 2–3 % известных антибиотиков применяется на практике. Остальные из-за их токсичности, инактивации в организме и других причин не используются. Большую часть выпускаемых антибиотиков составляют пенициллины, цефалоспорины, тетрациклины, эритролин, стрептомицин.

С учетом этих данных стали появляться высказывания об отказе от производства и применения антибиотиков. Но в настоящее время пока нет других надежных лекарственных препаратов, которыми можно заменить антибиотики. Поэтому их продолжают выпускать и применять во врачебной практике. Наряду с выпуском известных антибиотиков ведутся поиски новых, более эффективных препаратов.

Необходимо остановиться еще на одном вопросе. Весьма перспективной является липосомальная форма антибиотика, открывающая значительные возможности для воздействия на внутриклеточных возбудителей.

При лечении инфекционных заболеваний липосомы применяют в качестве носителей антимикробных агентов – антибиотиков различной структуры. *Преимуществом липосомальной формы антибиотиков* для лечения бактериальной контаминации является:

- ✓ антибиотики, инкапсулированные в липосомы не подвергаются действию экзогенных гидролаз, что является одним из путей борьбы с резистентностью к антибиотикам;

- ✓ при попадании в организм липосомальные лекарственные формы антибиотиков обладают выраженным пролонгированным действием по сравнению со свободными формами антибиотиков;

- ✓ липосомы, содержащие антибиотики сливаются с наружной мембраной клеточной стенки бактерий, проникая во внутрь бактериальной клетки, что приводит к её гибели.

- ✓ липосомы, содержащие антибиотики приводят к снижению проявления побочных эффектов по сравнению со свободными формами антибиотиков;

- ✓ антибиотики, инкапсулированные в липосомы проявляют большую антимикробную активность по сравнению со свободными формами антибиотиков.

За прошедший период изучения липосомальных форм антибиотиков были изучены липосомы, содержащие: адриамицин, амикацин, амфотерицин, ампицилин, азитромицин, блеомицин, доксициклин, доксорубицин, вакомицин, стрептомицин, изониазид, гентамицин, канамицин, тобрамицин, рифампицин, цефалин и многие другие. Созданы липосомальные коммерческие препараты содержащие антибиотики: доксорубицин, даунорубицин, амфотерицин В, тобрамицин, амикацин и ряд других. Для большинства антибиотиков установлена возможность преодоления резистентности при их использовании в липосомальной форме. По нашему мнению, в ряде случаев, липосомальная форма антибиотиков позволит расширить их применение в клинике.

Таким образом, развитие исследований в биотехнологии, создание новых штаммов-продуцентов антибиотиков, включая рекомбинантные, производство высокоэффективного оборудования даст возможность пополнить номенклатуру антибиотиков и их лекарственных форм.

### **Контрольные вопросы**

1. Описать историю открытия антибиотиков.
2. Классификация антибиотиков по спектру действия и химической структуре.
3. Классификация антибиотиков по молекулярному механизму действия.
4. Назовите бактерии продуценты антибиотиков на примере пенициллина.
5. Как определяют антагонистический спектр и активность антибиотиков?
6. Какие требования предъявляют к ферментерам для производства антибиотиков?
7. Охарактеризуйте основные технологические этапы получения антибиотиков и методы их очистки.
8. Условия культивирования продуцентов антибиотиков (состав питательных сред, температура, аэрация и др.).
9. Схема производства гентамицина.
10. Как получают и для чего используют 6-АПК?
11. Почему существует необходимость в создании нескольких поколений антибиотиков?
12. Схема производства пенициллина. Какие формы пенициллина сегодня используются в медицине?
13. Схема производства стрептомицина.
14. Физико-химические и фармакологические свойства антибиотика.
15. Какие основные лекарственные формы антибиотиков?
16. Какие методы применяют для очистки антибиотиков?
17. Влияние состава питательных сред и предшественника на эффективность синтеза антибиотика штаммами продуцентами.
18. Чем объясняется необходимость создания новых антибиотиков?
19. Что означает резистентность бактерий?

## **ГЛАВА 3. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕПАРИНОВ**

### **3.1. Нефракционированные гепарины: выделение и характеристика**

Препараты на основе гепаринов хорошо известны сегодня, и трудно представить профилактику и лечение патологических поражений сосудов и тканей без этой группы биологически активных соединений. Известно, что гепарины применяют для лечения большого числа заболеваний: тромбозы и тромбоэмболии, ишемическая болезнь сердца и инфаркт миокарда, гломерулонефрит и другие. Препараты гепарина вводят человеку в виде инъекций, гелей в форме липосомальных препаратов и перорально.

*Гепарин* – протеогликан, в котором несколько полисахаридных цепочек связаны с общим белковым ядром. Дисахаридный компонент полисахаридных цепочек гепарина содержит глюкозамин и уроновую кислоту. Большинство аминокрупп остатков глюкозамина существуют в N-сульфатированной форме, но есть и небольшое количество ацетилированных аминокрупп. Более 90 % уроновой кислоты представлено идуроновой кислотой и только 10 % – глюкуроновой. Белковая составляющая протеогликана уникальна тем, что состоит только из сериновых и глициновых остатков.

*Нефракционированные гепарины* (НФГ) представляют собой гетерогенную смесь мукополисахаридов. Они связываются с поверхностью эндотелиальных клеток и различными белками плазмы. *Биологическая активность НФГ зависит от плазменного протеазного ингибитора* – антитромбина III. Антитромбин III ингибирует факторы свертывания – протеазы, особенно тромбин (фактор IIa), факторы IX и Xa, при помощи формирования эквимолярных стабильных комплексов с ними. При отсутствии гепарина эти реакции протекают медленно, присутствие гепарина ускоряет их в 1000 раз. Только три молекулы в коммерческих препаратах НФГ имеют этот ускоряющий эффект ввиду наличия уникального пентасахаридного участка, необходимого для высокоаффинной связи с антитромбином. Активная молекула гепарина связывается с антитромбином и вызывает кон-



формационные изменения этого ингибитора. Конформационные изменения антитромбина предоставляют его активный участок для более интенсивного взаимодействия с протеазами. С тканевым фактором (ТФ) фактор VII формирует активированный комплекс (VII-ТФ), который катализирует активацию ферментного каскада от фактора IX до фактора IXa. Активированный фактор Xa также катализирует эту реакцию. Ингибитор тканевого фактора ингибирует каталитическое действие VIIa-ТФ комплекса. Результатом этого каскада является превращение фибриногена в фибрин, эссенциальный компонент функционального сгустка. Гепарин, действующий в крови, прямо активирует противосвертывающие факторы, особенно антитромбин, который в свою очередь инактивирует ряд факторов.

Препараты гепарина представляют собой гетерогенную смесь сульфатированных мукополисахаридов (гликозаминогликанов) с различными молекулярными массами. В полимере гепарина *главная повторяющаяся дисахаридная единица* имеет следующую формулу:  $\rightarrow 4$ -2-дезоксисульфамино- $\alpha$ -D-глюкопираноза-6-сульфат-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-идопиранозилуриновая кислота-2-сульфат (1 $\rightarrow$ ). Повторяющаяся единица составляет в гепарине из легких крупного рогатого скота свыше 90 %, а в слизистой оболочке (мукозе) тонкого кишечника свиней около 75 %. В макромолекуле мукозного гепарина, кроме указанных дисахаридных фрагментов, присутствуют остатки 2-ацета-мидо-2-дезоксисульфамино- $\alpha$ -D-глюкопиранозы и  $\beta$ -D-глюкуроновой кислоты. На рис. 13 представлены структурные компоненты гепарина. Высокое содержание сульфатных и карбоксильных групп обуславливает высокий отрицательный заряд гепарина; изоэлектрическая точка составляет pI – 3,2–4,2.

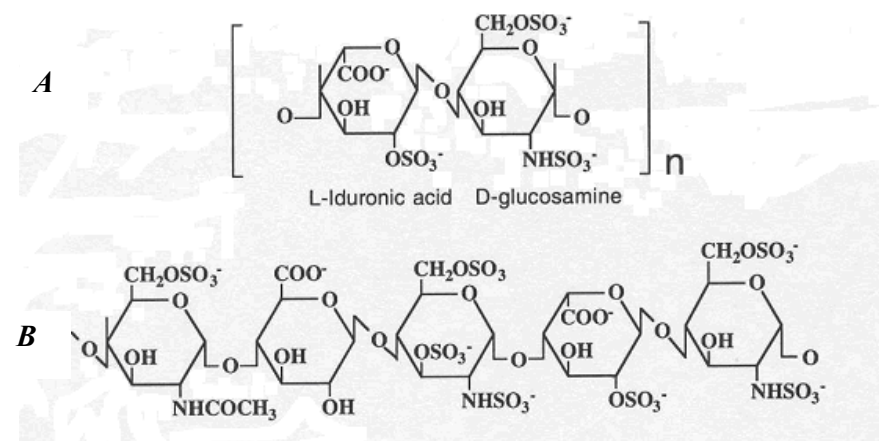


Рисунок 13 – Структурные компоненты гепарина:

A – наиболее частый тип дисахаридной единицы;

B – схематическое изображение уникальной пентасахаридной последовательности (места связывания для антитромбина III (АТ III)), являющейся основным структурным центром, определяющим антикоагулянтную способность гепарина

НФГ неоднородны по своему составу. Их молекулярная масса колеблется от 2 кДа до 80 кДа. Фракции НФГ с низкой молекулярной массой (менее 5 кДа) обладают более мощной анти-Xa активностью, но меньшей антитромбиновой активностью. Фракции гепарина с высокой молекулярной массой (более 20 кДа) имеют противоположные свойства, т. е. в основном, обладают антитромбиновой активностью. Обнаружено, что антикоагулянтная активность гепарина связана с особенностями строения его молекулы. Так, антикоагулянтная активность зависит от содержания серы, степени сульфатирования, количества и расположения O-сульфатных групп, а также от размера скелета молекулы. Более высокая активность в препаратах с большим содержанием эфирсвязанной серы. Показано, что активность фракции, в которой на дисахаридную структурную единицу

приходится четыре остатка серной кислоты, в 1,4 раза превышает активность фракции гепарина с тремя остатками.

В качестве примера технологии получения субстанции гепарина натрия мы приводим *методику получения гепарина из легких сельскохозяйственных животных*:

1. *Подготовка сырья* (дефростация легких, отмывка от крови, взвешивание ткани, измельчение (4,5–5,0 мм)).

2. *Экстракция гепарина* (суспензию легких помещают в 20-й % раствор хлорида натрия, добавляют натрия карбонат, доводят 20 %-ным раствором натрия гидроксида до значения рН 8,5–8,7; кипятят 5 мин, охлаждают до 50–60 °С).

3. *Отделение экстракта гепарина от ткани легких и проведение осветляющей фильтрации раствора*.

4. *Сорбция гепарина* (проводят последовательную сорбцию при 60–65 °С на нескольких ионообменных колонках с анионитом; после сорбции последовательно промывают анионит 1 М раствором хлорида натрия, очищенной водой, раствором для удаления липидов и снова очищенной водой).

5. *Десорбция гепарина* (проводят 20 %-ным раствором хлорида натрия, содержащим трилон Б с рН 7,5–8,0).

6. *Выделение гепарина сырца* (раствор гепарина охлаждают до 10–15 °С прибавляют охлажденный до 0–2 °С этанол, перемешивают и выдерживают для формирования осадка, который отделяют на нутч-фильтре, промывают охлажденным этанолом).

7. *Сушка осадка при комнатной температуре, а затем при 50–60 °С*.

8. *Очистка гепарина сырца* (сухой гепарин помещают в очищенную воду, доводят рН до 8,3–8,5 при помощи 18 %-ого раствора кислоты хлористоводородной, нагревают до 68–72 °С, прибавляют 5–10 %-ный раствор калия марганцовокислого, нагревают до 90–95 °С; осадок отделяют на мембранных фильтрах; доводят рН раствора 18 %-ным раствором кислоты хлористоводородной до значения 6,9–7,1; добавляют безводный натрий сернокислый, нагревают при 40–50 °С в течение 10 мин, охлаждают до

20–25 °С, прибавляют хлорид натрия, выдерживают 12 часов и раствор гепарина отделяют мембранной фильтрацией).

9. *Выделение гепарина* (к раствору гепарина прибавляют трилон Б из расчета 0,7 грамма на 1 литр раствора, доводят рН раствора 18 %-ным раствором кислоты хлористоводородной до значения 6,0–6,2; охлаждают до 5–10 °С и прибавляют этанол, выдерживают 24 часа; осадок отделяют на нутч-фильтре, промывают охлажденным этанолом; сушка осадка при комнатной температуре, а затем при 50–60 °С);

Однако *НФГ* имеют ряд *существенных недостатков*: они не способны ингибировать тромбин, связанный с тромбом, который продолжает активировать свертывание крови и ингибировать фибринолиз (процесс растворения тромбов и сгустков крови). Известным осложнением применения *НФГ* является гепарин-индуцированная тромбоцитопения. Кроме того, действие тромбина зависит от наличия *кофактора* – антитромбина III. Также гепарин может быть инактивирован тромбоцитарным фактором IV, белками плазмы крови или путем связывания его макрофагами. В следствии этого, для повышения эффективности антикоагулянтного действия *НФГ* необходимо прибегать к непрерывной внутривенной инфузии с систематическим контролем *активированного частично тромбопластинового времени* (АЧТВ) для корректировки дозы препарата. Тем не менее, даже такой подход может не обеспечить получение адекватного эффекта из-за несовершенства АЧТВ как показателя антикоагулянтной активности гепарина и отсутствия других, более эффективных, лабораторных тестов.

### 3.2. Биотехнологическое получение низкомолекулярных гепаринов

*Наличие побочного действия у НФГ* привело во второй половине 80-х годов к созданию *низкомолекулярных гепаринов (НМГ)*. *НМГ* получают различными химическими и ферментативными способами деполимеризации гепарина из *НФГ*, полученного из слизистой кишечника свиньи. Образуется фрагменты от 4,0 до 6,5 кДа. *НМГ* обладают большей активностью в ингибировании фактора Ха и меньше влияют на тромбин

(фактор II). Отношение анти-Ха к анти-IIa (антитромбин) у различных НМГ варьирует от 2 : 1 до 4 : 1. В отличие от НФГ, у которого соотношение анти-Ха к активности АЧТВ составляет 1 : 1 ингибирование Ха фактора свертывания НМГ значительно более выражено, чем его влияние на АЧТВ. Это оказывает более благоприятное влияние на эффективность и переносимость НМГ и, соответственно, на ожидаемую противотромбическую активность и риск развития кровотечения. *С химической и фармакологической точки зрения НМГ являются гетерогенной смесью полисахаридов*, которые содержат также биологически неактивные компоненты. По мнению ряда исследователей, *способы получения НМГ*: ферментативная деполимеризация, химическая деградация или фракционирование *не влияют на их активность*. Относительное содержание высоко- (более 7,5 кДа) и низко- (менее 2,5 кДа) молекулярных фрагментов полисахаридных цепочек определяет фармакодинамический и фармакокинетический профиль отдельных препаратов в клинических исследованиях. НМГ получают из слизистой оболочки кишок свиней, при этом НФГ был получен из слизистой оболочки кишок крупного рогатого скота с помощью ферментативной деполимеризации или прямой экстракции серной кислотой. При этом образуются фрагменты разной длины: а) молекулы, которые содержат около 16 моносахаридов и могут ингибировать не только фактор Ха, но и тромбин (IIa); б) молекулы из 8–18 моносахаридов (молекулярная масса меньше 5,4 кДа), которые ингибируют только фактор Ха; в) молекулы, которые имеют меньше, чем 8 моносахаридов и не проявляют ингибирующего эффекта; г) по меньшей мере, 24 сахаридных остатка должны быть в молекуле гепарина (что соответствует молекулярной массе около 7,2 кДа), чтобы он мог ускорять инактивацию тромбина антитромбином III.

Сегодня существует около 20 препаратов НМГ с молекулярной средней массой около 5 кДа. **Главное преимущество НМГ** следует из их *фармакокинетических свойств*: в 2–4 раза большее время полувыведения из организма, заметно лучшая биодоступность при подкожном введении и более стабильная дозовая реакция (доза может быть рассчитана только исходя из веса пациента, без дополнительного лабораторного исследования). Меньший токсический эффект связан с вызываемой НФГ тромбоцитопе-

нией, которая в свою очередь обусловлена взаимодействием НМГ с тромбоцитами. Кроме того, на лабораторных животных продемонстрирована возможность проникновения гепарина с молекулярной массой 1,9–4,6 кДа через гематоэнцефалический барьер.

**Одним из первых способов получения НМГ явилась работа по ферментативной деполимеризации НФГ при помощи гепариназы, выделенной из *Flavobacterium heparinum***. Для этой цели использовали гепарин натрия с молекулярной массой 17,3 кДа. НФГ растворяли в 0,1 М натрия ацетата и 0,01 М кальция ацетата. К раствору прибавляли гепариназу с активностью 1050 МЕ/мг, растворенную в 0,1 М натрия ацетата. Смесь термостатировали при 30 °С при постоянном перемешивании. Были получены НМГ со средней молекулярной массой около 5 кДа. С целью повышения эффективности технологии предложено использовать биотехнологический процесс деполимеризации НФГ на иммобилизованном комплексе ферментов.

Предложен способ **получения НМГ путем ферментативной деполимеризации с помощью комплекса ферментов (гепариназы), выделенных из *Streptomyces kurssanovii***, иммобилизованных на силихроме, при весовом соотношении – гепарин (выделенный из слизистой оболочки свиньи с молекулярной массой 7,5–15 кДа) : иммобилизованный фермент (1 : 1). Суспензию перемешивают при 37 °С в течение 3 часов. Иммобилизованный фермент отделяют центрифугированием, промывают 0,5 М раствором натрия хлорида и водой для инъекций. Имеются данные о целесообразности проведения гидролиза гепариназами *Streptomyces kurssanovii* при температуре 40–45 °С. Промывную жидкость объединяют с супернатантом и обессоливают на колонке с сефадексом G-10. Элюирование проводится водой со скоростью 80 мл/ч. Полученный продукт НМГ подвергают лиофилизации. Получают НМГ с выходом около 70 % и молекулярной массой на 50–75 % ниже, чем у исходного гепарина. Анти-Ха активность составляет 130–170 МЕ/мг, что соответствует удельной активности таких препаратов как Фраксипарин и Дельтапарин. Молекулярная масса полученного НМГ составляла 4,5 кДа (при использовании исходного гепарина с молекулярной массой 15 кДа) и 2,7 кДа (при использовании исходного гепарина с молекулярной массой 7,5 кДа).

Интересен способ *получения НМГ на основе предварительной ультрафильтрации НФГ* с целью их освобождения от фракций с молекулярной массой менее 3 кДа *и проведения деполимеризации и фракционирования* за счет различного растворения продуктов в водной и органической фазах. Несмотря на то, что гепарин не растворим в органических растворителях, его комплексы с катионами четвертичного аммония при определенных условиях растворимы в дихлорметане. Для деполимеризации использовались коммерческие препараты НФГ с молекулярной массой 17 кДа, выделенные из слизистой оболочки свиньи. Гепарин натрия растворяют в воде и проводят ультрафильтрацию на полых волокнах до полного удаления фракций с молекулярными массами менее 3 кДа. К концентрированному раствору до половины исходного объема прибавляют натрия хлорида и 7,5 % раствор бензетония хлорида в дихлорметане. Раствор смешивают с водным 0,17 М раствором натрия хлорида. Затем к смеси при температуре 20–25 °С прибавляют хлористый бензил. Смесь перемешивают при указанной температуре в течение 6 часов. Затем к смеси прибавляют бензилтриметиламмония гидроксид и продолжают перемешивание в течение 3-х часов. После окончания перемешивания к раствору бензилгепаринат прибавляют 2 N раствор натрия гидроксида и выдерживают в течение 2-х часов при 4 °С. Реакция деполимеризации прекращается добавлением 1 N хлористоводородной кислоты. Полученный продукт подвергают ультрафильтрации на мембранах с порогом отсечения 1 кДа для удаления хлорид-ионов, а затем продукт лиофилизируют. На этом этапе, возможно, олигосахариды можно выделить из водного раствора осаждением НМГ метанолом, ацетоном, этанолом в виде натриевой соли. Необходимо отметить, что *ультрафильтрация является методом очистки гепаринов от различных низкомолекулярных примесей*, включая целенаправленное концентрирование активных фракций вещества. Комбинации ультра- и диафильтрации дают возможность с выходом 90 % проводить десятикратное концентрирование растворов гепарина. Этот метод используется большинством авторов, работающих в области выделения гетерополисахаридов из экстрактов животных тканей, в том числе и очистки НМГ. Полученный продукт характеризовался молекулярной массой 3,0–7,0 кДа; средней молекулярной массой – 3,8 кДа; содержанием: уоновой кислоты (25–40 %), серы (10–13 %), азота (1,8–2,5 %); величиной оптического вра-

щения при 20 °С равной 28 °–55 °; анти-Ха – 163 МЕ/мг и анти-Па – 53 МЕ/мг.

Достаточно часто используют *метод деполимеризации с применением азотной кислоты*. НФГ, полученный из слизистой кишечника свиньи растворяют в очищенной воде до конечной концентрации 5,0 %. К раствору НФГ прибавляют натрия нитрат до конечной концентрации 0,01М. Смесь доводят до температуры 18–24 °С и в течение двух минут прибавляют 37 %-ый раствор хлористоводородной кислоты до значения pH = 3,2. Раствор перемешивают в течение двух часов при указанной температуре. После двух часовой инкубации при помощи 50 % раствора натрия гидроксида устанавливают значение pH = 6,75. Затем проводят процесс ультрафильтрации через мембраны с порогом отсечения 10 кДа и диализ против воды очищенной. Получены НМГ с выходом 42,0 %.

Описан *метод деполимеризации НФГ путем термической обработки*. НФГ натрия растворяют в воде в соотношении 1 : 5, охлаждают до 5–10 °С. Добавляют катионит до снижения значения pH до 3,5 для получения гепариновой кислоты. Смола удаляется центрифугированием. К раствору прибавляют перекись водорода до конечной концентрации около 3,5 %. После чего незамедлительно подвергают автоклавированию при 125 °С в течение 10 минут. Раствор охлаждают, доводят pH до значения 6,8 при помощи гидроксида натрия. НМГ осаждают добавлением этилового спирта до конечной концентрации 50,0 %. Осадок отделяют центрифугированием и сушат в вакууме. Средняя молекулярная масса НМГ около 5 кДа.

Авторы предлагают ознакомиться с *технологией получения НМГ Эноксапарина*, который сегодня широко применяется в Украине.

1. *Предварительная стадия*. Субстанцию гепарина натрия растворяют в очищенной воде, охлаждают до температуры 4–8 °С и добавляют охлажденный этанол. Смесь выдерживают при температуре 4–8 °С в течение 10–12 часов для формирования осадка. Осадок отделяют центрифугированием или фильтрацией и высушивают. Аликвоту осадка (3 % граммов) обработанного таким образом гепарина используют в качестве образца для определения деполимеризации путем добавления к растворенному в воде очищенному образцу азотной кислоты. *Степень деполимеризации определяют исследованием материала методом высокоэффективной жидкостной хроматографии* (эксклюзионной хроматографии). Полученное таким

образом вещество должно содержать менее 1 % дерматансульфата и хондроитинсульфата (т.е. небольшой пик должен составлять менее 1 % от общего). В случае соответствия продукта указанным требованиям обработанный гепарин натрия передают на стадию «Солеобразование». В случае несоответствия – проводят дополнительную обработку.

2. *Солеобразование.* Обработанный гепарин натрия растворяют в воде очищенной. К раствору добавляют бензэтония хлорид и оставляют на 10–12 часов при температуре 4–8 °С для формирования осадка. Осадок отделяют фильтрацией, промывают водой очищенной и высушивают. Осадок, представляющий собой бензэтониевую соль гепарина (бензэтония гепаринат) передают на стадию «Этерификация».

3. *Этерификация.* Осадок бензэтония гепарината растворяют в хлористом метиле и добавляют хлористый бензил. Смесь выдерживают определенное время, которое необходимо для осуществления реакции этерификации. После чего к смеси добавляют метанол, собирают осадок путем фильтрования, промывают метанолом и высушивают. В результате реакций получают бензиловый эфир гепарина в виде натриевой соли, которую передают на стадию «Деполимеризация».

4. *Деполимеризация.* Натриевую соль бензинового эфира гепарина растворяют в воде очищенной и добавляют гидроксид натрия до получения среды со щелочным уровнем pH ≈ 9,0. Смесь выдерживают определенное время для осуществления реакции деполимеризации. Добавляют хлористоводородную кислоту, чтобы нейтрализовать реакцию смесь. Для выделения осадка НМГ добавляют натрия хлорид и метанол. Выпавший осадок отделяют центрифугированием или фильтрацией и растворяют в воде очищенной. Раствор передают на стадию «Обработка активированным углем».

5. *Обработка активированным углем.* Добавляют в раствор гепарина активированный уголь до концентрации 1–2 %. Смесь выдерживают 8–10 часов. Затем активированный уголь отделяют фильтрацией. На этом этапе проводят обесцвечивание раствора гепарина. Очищенный бесцветный раствор передают на стадию «Лиофилизации».

6. *Лиофилизация.* Раствор НМГ замораживают и лиофилизируют. Молекулярная масса полученного НМГ (Эноксапарин) – 4500 Da.

Контроль продукта осуществляется методами, приведенными в табл. 6.

Таблица 6 – Характеристика примесей в субстанции Эноксапарина

Наименования примесей	Метод устранения в процессе производства	Спецификация	Метод испытаний
Дерматансульфат и хондроитинсульфат	Осаждение гепарина с помощью этанола	< 1 %	Эксклюзионная хроматография (ВЭЖХ)
Тяжелые металлы	Активированный уголь	≤ 30 частей на миллион	Фармакопейный метод
Нерастворимые частицы	Активированный уголь	В соответствии с ДФУ	Фармакопейный метод
Вода и другие растворители	Лиофилизация	≤ 10 %	Потеря массы при высушивании
Бензиловый спирт	Осаждение метанолом несколько раз в конце этапа «Деполимеризации»	≤ 0,1 % (м/м)	Газовая хроматография
Бактериальные эндотоксины	Активированный уголь	≤ 0,01 МЕ/МЕ анти-Ха	Пирогенность или LAL-тест
Хлорид бензэтония	Промывка метанолом в конце стадии «Этерификации»	14,0 до 20,0	Абсорбция
Метанол	Лиофилизация	≤ 0,3 %	Газовая хроматография
Этанол	Лиофилизация	≤ 0,5 %	Газовая хроматография
Хлористый метилен	Лиофилизация	≤ 0,06 %	Газовая хроматография

### **Технология получения НМГ сводится к трем стадиям:**

1. *Деполимеризация НФГ и фракционирование этанолом.* Гепарин натрия, полученный из мукозы свиньи, растворяют в очищенной воде до конечной концентрации около 10 %. С помощью концентрированной хлористоводородной кислоты устанавливают рН раствора до значения 2,5. Деполимеризацию проводят под постоянным контролем. При помощи натрия гидроксида устанавливают значение рН = 10,0 и к раствору прибавляют натрия боргидрида ( $\text{NaBH}_4$ ). Смесь перемешивают в течение 15 часов, а затем с помощью концентрированной хлористоводородной кислоты величину рН устанавливают на уровне 3,5–4,0 для разрушения избытка боргидрата натрия. Затем с помощью натрия гидроксида доводят значение рН до 7,0. К раствору прибавляют два объема этилового спирта для осаждения целевого продукта. Осадок отделяют и растворяют в воде очищенной и прибавляют натрия хлорид до определенной величины ионной силы, определяемой кондуктометрически. В растворе с помощью хлористоводородной кислоты устанавливают рН = 4,0 и добавляют для осаждения гепарина один объем этилового спирта. Для формирования осадка гепаринов смесь выдерживают около 60 часов и спиртово-водный слой удаляют. Полученный осадок НМГ (надропарин) находится в натриевой форме. Осадок растворяют в воде очищенной до концентрации приблизительно 18 % и устанавливают значение рН = 7,0 при помощи раствора натрия гидроксида. Раствор подвергают стерилизующей фильтрации через картридж с размером пор 0,2 мкм.

2. *Обработка полученных продуктов в ультрафиолете.* Исследования физико-химических и биологических свойств полученных препаратов убедительно показало, что обработка ультрафиолетом не приводит к изменению свойств надропарина и к его деградации. Средняя молекулярная масса препарата около 5 кДа. Активность против факторов: Ха – 124 МЕ/мг и Па – 30 МЕ/мг.

На этой стадии проводят обработку ультрафиолетом при длине волны 254 нм в течение 9–10 минут со скоростью 4,8 литра в час при комнатной температуре и рН раствора около 7,0. Раствор вводится в специальную систему облучения и с помощью перистальтического насоса циркулирует со скоростью 19 л/час в течение 16 часов при температуре 30 °С.

Деполимеризации можно добиться также использованием высоких энергий излучения, например,  $\gamma$ -излучением в присутствии органических растворителей. В качестве растворителей использовали спирты (изопропиловый, этиловый, метиловый и др.); эфиры (диоксан, тетрагидрофуран и др.); альдегиды (формальдегид, ацетальальдегид и др.). Использовали  $\gamma$ -излучение  $^{60}\text{Co}$ . НФГ с молекулярной массой 14,8 кДа растворяли в дистиллированной воде, содержащей, например, 0,5 % изопропилового спирта. Раствор помещали в сосуд из стекла Pyrex, используя энергию в 150 КГу. Получен раствор темно-желтого цвета. Для обесцвечивания раствора значение рН при помощи 32 % раствора натрия гидроксида довели до 8,0–8,5 и перемешивали в течение 7 часов. Затем при помощи раствора 10 % хлористоводородной кислоты значение рН довели до 6,5, обрабатывали ацетоном, и полученный порошок высушивали в вакууме при температуре не выше 60 °С. Получен НМГ со следующими характеристиками: средняя молекулярная масса – 4,89 кДа; урановых кислот – 28,2 %; рН 4,8–5,5; органических сульфатов – 12,2 %; активность анти-Ха – 104 МЕ/мг. Также установлено, что облучение необходимо проводить ступенчато т.к. при однократном облучении не полностью деполимеризуется НФГ. По мнению авторов необходимо, по крайней мере, два этапа облучения, при этом на последующих этапах при облучении  $\gamma$ -лучами происходит полная деполимеризация гепарина. Предложено несколько источников получения  $\gamma$ -излучения –  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{60}\text{Co}$ . Обработку материала излучением предлагают проводить в атмосфере азота при 100–200 КГу.

3. *Хроматографическая очистка и перевод в кальциевую соль.* Раствор надропарина натрия подвергают *анионообменной хроматографии*. В собранные фракции очищенного НМГ прибавляют натрия хлорид и осаждают 1,5 объемами этилового спирта. Смесь выдерживают около 41 часа и супернатант отделяют. Осадок гепарина растворяют в воде очищенной до концентрации приблизительно 18 % и прибавляют гексагидрат кальция хлористого и перемешивают. К смеси прибавляют 1,5 объема этилового спирта и выпавший осадок отделяют и сушат при температуре не более 60 °С.

Интерес представляют данные, полученные при выделении гепаринов при помощи *аффинной хроматографии*. В качестве сорбента исполь-

зована сефароза 4В, связанная с протамином. НФГ наносили на колонку с аффинным сорбентом в 0,6 М растворе натрия хлорида с рН = 7,35. Затем связавшийся с носителем гепарин элюировали при помощи раствора натрия хлорида с возрастающей концентрацией от 1,3 М до 2,0 М, содержащие 0,02 М имидазола с рН = 7,35. Полученные фракции контролировали по специфической активности (антифактор Ха). Наиболее активные фракции объединяли и подвергали гельфильтрации на сефадексе G-25. Получен препарат с активностью 270 МЕ/мг, который может быть использован для производства НМГ.

Учитывая, что в НМГ обладают относительно невысокой анти-Па активностью появляются работы, авторы которых ставят задачу *создания препаратов с большей биодоступностью, сокращения гепарин индуцированной тромбоцитопении и повышения активности анти-Па*. Предложен препарат НМГ с молекулярной массой от 5,5 до 8,3 кДа, содержащий цепочку дисахаридов с 8–18 единицами. В препарате по сравнению с коммерческими препаратами увеличено содержание 3-О сульфатов. Соотношение антифактор Ха к антифактору Па от 0,5 до 3,5.

В последние годы проявляется большой интерес к получению и исследованию биологических свойств химически модифицированных аналогов гепарина или других антикоагулянтов. Функционализация гепарина позволяет изменить физико-химические и биологические свойства гепарина. *Конъюгаты гепарина с лекарственными субстанциями* могут обладать большей растворимостью и продолжительностью действия по сравнению с НФГ и НМГ, могут использоваться как препараты комбинированного действия. Так, были предложены конъюгаты гепарина с новокаином, тауфоном, изониазидом и другими лекарственными препаратами. Предложены способы получения нитропроизводных НМГ. Препарат представлял фракцию НМГ с молекулярными массами от 3,0 до 6,5 кДа. Средняя молекулярная масса  $5,0 \pm 0,4$  кДа. Препарат содержит нитрогруппы –  $\text{ONO}_2$  ковалентно связанные с сахарами.

Несомненный интерес представляет работа посвященная получению *НМГ из морских животных, в частности из рыб*. Установлено, что рыбы содержат НМГ с молекулярными массами не более 3,0 кДа. Авторами установлено, что выделенный препарат НМГ, по крайней мере, на 20 % активней, чем НМГ с массой 8000 дальтон. Полученные препараты не тре-

буют деполимеризации, хроматографических методов очистки и дополнительных этапов фильтрации, что позволяет снизить стоимость препаратов НМГ и сделать эти препараты более доступными. Для выделения препарата используют около двух десятков рыб, предпочтительно сайра, кефаль, лосось, скумбрия. Для выделения используют жабры и головы рыб. Ткань измельчают в буферном растворе: 5 мМ карбонат аммония в 0,1 М натрия хлорида, рН = 9,0. Гомогенат инкубируют при 80 °С в течение одного часа и центрифугируют при 13000 об/мин. Супернатант подвергают ионно-обменной хроматографии, элюирование проводят 4 М раствором натрия хлорида в указанном буферном растворе. Проводят концентрацию раствора с последующей лиофилизацией.

Таким образом, *существующие сегодня способы выделения и очистки НМГ основаны на:*

1. Окислительной деполимеризации с пероксидом водорода например, ардепарин («Normiflarin»).
2. Расщеплении, например, цертопарин («Sandoparin»).
3. Щелочном гидролизе бензиловых эфиров гепарина, например, эноксипарин («Clexan»).
4. Окислительной деполимеризации с  $\text{Cu}^{+2}$  и пероксидом водорода, например, парнапарин («Fluxum»).
5. Деполимеризации ферментом гепариназой, например, тинзапарин («Innoher»).
6. Деполимеризации гидролизом серной кислотой, например, дальтепарин («Fragmin»), ревиварин («Clivarin»).
7. Деполимеризации гидролизом азотной кислотой, например, надропарин («Fraxiparine»).

По данным ряда авторов метод производства НМГ может существенно влиять на их фармакокинетические свойства и антикоагуляционную активность. Так, например, Фрагмин, в отличие от Логипарина и Эноксапарина не имеет отрицательно заряженных сульфогрупп. Кроме того, нам хотелось бы отметить, что НМГ посвящен большой объем литературных материалов, в том числе и по методам получения продукта. В то же время, вопрос о механизме процесса деполимеризации и сегодня является не полностью изученным.

Суммируя изложенное, можно заключить, что в настоящее время большинство исследователей считают НМГ по силе действия не уступающим НФГ. В то же время, препараты НМГ имеют ряд преимуществ, в том числе, они приводят к значительно меньшему количеству осложнений.

### 3.3. Сравнительная характеристика гепаринов

Преимущества НМГ (надропарина кальция) над НФГ были впервые продемонстрированы в 1995 году на 219 больных нестабильной стенокардией. В рандомизированном, открытом исследовании комбинация надропарина с аспирином по сравнению только с аспирином или аспирином в комплексе с НФГ была признана более эффективной, что сопровождалось уменьшением летальности.

Международным эталоном для НМГ является стандартный препарат, 1 мг которого имеет специфическую активность 168 анти-Ха единиц и 68 анти-Па антитромбиновых единиц (в соотношении 2,5 : 1).

Показаниями к применению НМГ являются:

- ✓ профилактика тромбоэмболических осложнений, в особенности тех, которые связаны с общей хирургией или ортопедией;
- ✓ у нехирургических больных с высоким тромбоэмболическим риском (острая дыхательная недостаточность и/или респираторная инфекция, и/или острая сердечная недостаточность);
- ✓ лечение тромбоэмболических осложнений;
- ✓ профилактика свертывания крови в ходе гемодиализа;
- ✓ острый инфаркт миокарда, острые коронарные нарушения.

Метаболизм НМГ происходит путем десульфатации и/или деполимеризации с образованием разновидностей гепарина низкой молекулярной массы с существенно более низкой биологической активностью.

В табл. 7 приведена характеристика наиболее часто используемых низкомолекулярных гепаринов.

Таблица 7 – Характеристика низкомолекулярных гепаринов

Наименование НМГ, INN	Молекулярная масса, кДа	Соотношение анти-Ха/анти-Па	Период полужизни (T <sub>1/2</sub> ) в плазме, мин	Наименование препарата
Дальтепарин натрия, Kabi, Швеция	5,0–6,0	2,0–4,0	119–139	Фрагмин, Pfizer Inc.
Надропарин кальция, Sanofi-Synthelabo, Франция	4,3–4,5	3,2–3,6	132–162	Фраксипарин, Glaxo Smith Kline
Эноксапарин натрия, Rhone-Poylenc, Франция	4,2–4,5	3,7–3,8	129–180	Клексан, Sanofi Aventis

Рассмотрим ряд НМГ хорошо зарекомендовавших себя в клинической практике.

**ФРАКСИПАРИН** (Надропарин кальция) – синтетический гликозаминогликан – первый из НМГ, изученный в клинике. Его получают из слизистой оболочки кишок свиней путем расщепления азотной кислотой, редукцией концевых групп боргидридом натрия, очисткой и замещением натрия на кальций. Фраксипарин имеет 70 % регулярных и 30 % нерегулярных дисахаридов. В основном, смеси семи дисахаридов 80 % цепочек этого НМГ имеют молекулярную массу в пределах 2,0–7,0 кДа, которые состоят из 4–12 дисахаридных единиц, а около 50 % имеют молекулярную массу 4,0–5,0 кДа и состоят из 12–16 дисахаридных единиц. Около 25 % молекул Фраксипарина имеют специфический участок связывания с антитромби-



ном III. Полисахаридные цепочки Фраксипарина разделяются на высоко- и низкоаффинные фракции. Высокоаффинные фракции отвечают за анти-Ха и анти-Па активность, а низкоаффинные компоненты препарата активностью не обладают. Биодоступность Фраксипарина при подкожном введении достигает по данным ряда авторов от 80 % до 98 %, в то время как у НФГ биодоступность лишь 24 %. Уже после однократного внутривенного введения Фраксипарина наступает длительный анти-Ха эффект; активированное частичное тромбопластиновое и тромбиновое время увеличивается уже на 5-ой минуте, а после 24 часов нормализуется. После подкожных инъекций анти-Ха эффект обнаруживается только через 3–4 часа и продолжается в течение 18 часов. *Преимущества Фраксипарина по сравнению с НФГ* и выгодные отличия от других НМГ сегодня признаны многими специалистами. Установлено, что кальциевые соли вызывают достоверно меньше местных осложнений, чем натриевые соли НМГ.

ФРАГМИН (Дальтепарин натрия) – представляет собой НМГ, выделенный в процессе контролируемой деполимеризации (с помощью серной кислоты) гепарина натрия из слизистой оболочки тонкой кишки свиньи и подвергнутый дополнительной очистке при помощи ионно-обменной хроматографии. Лекарственный препарат состоит из сульфатированных полисахаридных цепочек, имеющих среднюю молекулярную массу 5,0 кДа (от 3,0 до 6,0 кДа). Низкая молекулярная масса молекул Фрагмина способствует селективному ингибированию факторов Ха, XIIa и калликрейна и более низкую активность к ингибированию факторов IIa, IXa и XIa. Соотношение анти-Ха к анти-Па Фрагмина достигает по данным ряда авторов от 2,2 до 4,0. Биодоступность препарата достаточно высока –  $87 \pm 6$  % и по данным она в 9 раз превышает активность НФГ. Фрагмин метаболизируется преимущественно в ретикуло-эндотелиальной системе печени, селезенки и почек путем N- и O-десульфатирования и в незначительной степени выделяется с мочой в неизменном состоянии. АЧТВ после подкожного введения 2500 МЕ анти-Ха Фрагмина удлиняется на 3 секунды (при 5000 МЕ анти-Ха – на 6 секунд) и возвращается к первоначальному уровню, соответственно, через 12 и 24 часа. Период полувыведения препарата после подкожного введения, колеблется от  $160 \pm 50$  до  $228 \pm 40$  минут.

Дальтепарин связывается с антитромбином III и усиливает его ингибирующее влияние на активность преимущественно фактора свертывания Ха. В меньшей степени уменьшает активность фактора IIa (тромбин) т.к. полисахаридные цепочки необходимой для ингибирования тромбина длины (содержащие не менее 18 олигосахаридов) обнаруживаются лишь в 25–30 % молекул НМГ.

КЛЕКСАН (Эноксапарин натрия) – представляет собой НМГ со средней молекулярной массой 4,5 кДа. Препарат с высокой активностью анти-Ха (100 МЕ/мл) и низкой ингибирующей активностью в отношении фактора IIa (тромбина) (28 МЕ/мл), соотношение 3 : 1. Фракционный состав эноксапарина натрия: фрагменты менее 2,0 кДа – менее 20 %; от 2,0 до 8,0 кДа – более 68 %; более 8,0 кДа – менее 18 %. Эноксапарин натрия получают щелочным гидролизом бензилового эфира гепарина, выделенного из слизистой оболочки тонкого кишечника свиньи. Его структура характеризуется невосстанавливающимися фрагментами 2-O-сульфо-4-эпиурациносурановой кислоты и восстанавливающимся фрагментом 2-N,6-O-дисульфо-O-глюкопиранозидом. Структура эноксапарина содержит 20 % (в пределах от 15 до 25 %) 1,6-ангидропроизводного в восстанавливаемом фрагменте полисахаридной цепи. Эноксапарин содержит много коротких цепей (31 %) с молекулярной массой 2,5 кДа, которые обладают высокой анти-Ха активностью, но практически не могут инактивировать тромбин, в отличие от гепарина, который в одинаковой степени инактивирует тромбин и фактор Ха. Необходимо отметить, что препараты эноксапарина, произведенные различными производителями отличаются по своим характеристикам.

После подкожного введения препарат полностью адсорбируется, достигая максимального уровня в плазме крови уже в течение первого часа, а максимальная активность наблюдается на 3-й час после введения. Анти-Ха активность продолжается в течение 24 часов. Период полувыведения Клексана продолжается в среднем 4 часа. Эноксапарин не влияет на АЧТВ и протромбиновое время, что позволяет не проводить мониторинг этих показателей лабораторными методами.

ИННОГЕП (Тинзапарин натрия) – НМГ, получаемый ферментологией стандартного НФГ при помощи гепариназы, выделенной из *Flavobacterium*

*heparinum*. Средняя молекулярная масса препарата  $4,5 \pm 1,5$  кДа. При сравнении активности с первым международным стандартом анти-Ха активность тинзапарина составляет 75 МЕ/мг, а активность анти-Па значительно меньше и составляет 50 МЕ/мг. Соотношение этих активностей 1,5–2,5 : 1. Пик анти-Ха и анти-Па активности после подкожного введения Инногепа обнаруживается на 4–6 часу и, несомненно, зависит от дозы введенного препарата. Общая биодоступность, определяемая этой активностью достигает, соответственно, 90 % и 67 %. При введении препарата в течение нескольких дней, пиковые значения этих активностей прогрессивно нарастают, но аккумуляция не наблюдается. Период полувыведения анти-Ха активности тинзапарина после подкожного введения составляет 82 минуты, а для анти-Па – 71 минуту. Эффект анти-Ха активности тинзапарина в три раза (в дозе 2500 МЕ анти-Ха), в шесть раз (в дозе 5000 МЕ анти-Ха) и в 11 раз (в дозе 10000 МЕ анти-Ха) выше, чем при использовании 5000 МЕ НФГ. При гемодиализе Инногеп вводится болюсно в артериальную линию диализатора перед сеансом в дозе 4250 МЕ, что позволяет эффективно предупредить образование сгустков во время процедуры.

ЦИБОР (Бемипарин натрия) – один из последних препаратов НМГ попавший на фармацевтический рынок, относится к НМГ второго поколения. Препарат используется для профилактики и лечения венозных тромбоэмболических осложнений (ВТЭО) у пациентов. Цибор® 2500 МЕ предназначен для профилактики ВТЭО у пациентов с умеренным и средним риском, а Цибор® 3500 – для профилактики ВТЭО у больных высокого риска. С этим препаратом проведено несколько мультицентровых, рандомизированных, двойных слепых клинических исследований в 2000–2004 г.г. в Испании, США, Франции. Изучено количество случаев тромбоза глубоких вен и тромбоемболии легочной артерии, а также количество геморрагических осложнений у хирургических, онкологических, ортопедических больных на фоне тромбопрофилактики. Цибор сравнивали с эноксапарином и НФГ. Проведенные исследования подтвердили эффективность Цибора: количество случаев тромбоза глубоких вен и тромбоемболии легочной артерии снизилось с 5,4 % (Эноксапарин) до 1,8 % (Цибор). По-видимому, это связано с рядом факторов: Бемипарин имеет самую низкую молекулярную массу из всех НМГ – 3,6 кДа, при молекулярной

массе известных НМГ – 4,5–6,0 кДа; самое значительное преимущество Цибора это соотношение Ха / Па (антитромботическая активность / антикоагуляционная активность), составляющее у данного препарата 8 : 1, что значительно отличает Цибор от других НМГ (см. табл. 7). Кроме того, период полужизни препарата в плазме крови составляет около 300 минут, что делает его применение 1 раз в день более предпочтительным по сравнению с другими НМГ.

Необходимо остановиться еще на одной группе гепаринов. За последнее время предложены *гепарины со средней молекулярной массой (СМГ)*, около 10,5 кДа с узким диапазоном молекулярной массы (9,5–11,5 кДа). Препарат СМГ обладает практически одинаковой анти-Ха (174,9 МЕ/мг) и анти-Па (170 МЕ/мг) активностью и объединяет высокую антитромбиновую активность, характерную для НФГ и высокую биодоступность, свойственную для НМГ. Предложен гепарин со средней молекулярной массой, полученный путем контролируемой деполимеризации НФГ и последующего выделения методами молекулярной фильтрации. Препарат предназначен для получения лекарственного средства для профилактики и терапии тромбоэмболических процессов, в частности, для торможения свертывания крови при экстракорпоральном кровообращении. Предложенный препарат отличает отсутствие по сравнению с известными гепаринами кровоточивости при наибольшей активности против фактора Па, что достоверно повышает его терапевтический индекс. Сравнение препарата проводили с НФГ (Liquemin) и НМГ (Эноксапарин). Гельпроникающей хроматографией (ГПХ) изучены их молекулярные массы и молекулярно-массовое распределение. Было установлено, что кривые элюирования, полученные при ГПХ для НФГ имеют среднюю молекулярную массу, равную 13,0 кДа, и одновременно с этим характеризуются исключительно широким молекулярно-массовым распределением. НМГ имеют среднюю молекулярную массу, равную 4,5 кДа, и значительно более узкое молекулярно-массовое распределение. Предложенный СМГ имеет среднюю молекулярную массу, равную 10,5 кДа, и наиболее узкое среди всех трех различных гепаринов молекулярно-массовое распределение. При этом, авторы придают особое значение узкому молекулярно-массовому распределению, поскольку именно подобным молекулярно-массовым распределением

обусловлено наличие у СМГ уникального и неожиданного спектра фармакологического действия – СМГ при его сопоставлении с обоими сравниваемыми действующими веществами (НФГ и НМГ) обладает более высокой активностью как против фактора Ха, так и против фактора Па. При изучении СМГ в клинике обнаружено, что СМГ проявляет наибольшую активность в опыте по определению АЧТВ и в опыте по определению активности против фактора Па, причем предлагаемый гепарин именно по показателям его активности против фактора Па значительно отличается от двух других гепаринов, что, по мнению авторов, является неожиданным. Ожидаемый результат был получен только при анализе активности против фактора Ха. В этом случае СМГ занимает примерно среднее положение между Эноксапарином и Liquemin. Хотя активность эноксапарина против фактора Ха более чем в два раза превышает активность СМГ, тем не менее антитромбиновая активность эноксапарина составляет лишь приблизительно 66 % от активности СМГ (см. табл. 8). Авторы пришли к выводу, что эноксапарин действительно обладает более высокой по сравнению с СМГ биодоступностью, однако его ингибирующее тромбин действие, которым в первую очередь определяется противосвертывающая эффективность, проявляется существенно в меньшей степени, чем у предлагаемого СМГ. Результаты эксперимента на кроликах однозначно свидетельствовали о наличии у СМГ более высокого терапевтического действия касательно предупреждения и лечения тромбоэмболических процессов по сравнению с НМГ. Помимо этого было установлено, что введение СМГ сопровождается меньшим по сравнению с эноксапарином риском кровотечений. С учетом экспериментально полученных результатов СМГ предпочтительно применять и для терапии острого инфаркта миокарда и нестабильной стенокардии, а также для ингибирования свертывания крови при экстракорпоральном кровообращении.

В табл. 8 дана сравнительная характеристика НФГ, НМГ и СМГ.

Таблица 8 – Сравнительная характеристика гепаринов с разной молекулярной массой

Характеристика	НФГ	СМГ	НМГ
Молекулярная масса, кДа	3,0–30,0	10,0–11,5	2,0–8,0
Средняя молекулярная масса, кДа	13,0	10,5	5,0
Активность против фактора Ха / фактора Па	1,0	1,03	3,8
Активность против фактора Ха	219	439	1028
Активность против фактора Па	308	544	358
Активность в опыте по определению АЧТВ	104	154	126
Биологическая доступность, % (подкожно)	10–25	70	90

Одним из основных преимуществ НМГ по сравнению с обычным гепарином является низкая частота развития тромбоцитопении. Так как способность вызывать агрегацию тромбоцитов более выражена у высокомолекулярных фракций гепарина, включая НФГ, у больных с исходной тромбоцитопенией в качестве прямых антикоагулянтов лучше использовать НМГ. В то же время не следует назначать НМГ больным с индуцированной обычным гепарином тромбоцитопенией из-за высокой частоты перекрестных реакций с гепаринзависимыми антителами. Для лечения больных с индуцированной гепарином тромбоцитопенией рекомендуется использовать *гепариноиды*, например, Данапароид натрия. Этот препарат содержит смесь гликозамингликанов: 84,0 % гепарина сульфата, 120 % дерматана сульфата, 4,0 % хондроитин сульфата, обладает анти-Ха активностью. Средняя молекулярная масса Данапароида 6,5 кДа. Препарат не обладает антитромбиновой активностью. Отношение активности против фактора Ха к активности против фактора Па для Данапароида составляет 20 : 1.

В последние годы проявляется большой интерес к получению и исследованию биологических свойств химически модифицированных аналогов гепарина или других антикоагулянтов. Функционализация гепарина

позволяет изменить физико-химические и биологические свойства гепарина. Конъюгаты гепарина с лекарственными субстанциями могут обладать большей растворимостью и продолжительностью действия по сравнению с НФГ и НМГ, могут использоваться как препараты комбинированного действия. Так, были предложены конъюгаты гепарина с новокаином, тауфоном, изониазидом и другими лекарственными препаратами. Предложены способы получения *нитропроизводных НМГ*. Такой препарат представляет фракцию НМГ с молекулярными массами от 3,0 до 6,5 кДа. Средняя молекулярная масса  $5,0 \pm 0,4$  кДа. Препарат содержит нитрогруппы ( $\text{ONO}_2$ ) ковалентно связанные с сахарами.

По данным ряда авторов метод производства НМГ может существенно влиять на их фармакокинетические свойства и антикоагуляционную активность. Так, например, Дальтепарин, в отличие от Логипарина и Эноксапарина не имеет отрицательно заряженных сульфоаминогрупп. Кроме того, нам хотелось бы отметить, что НМГ посвящен большой объем литературных данных, в том числе и по методам получения продукта. В то же время, вопрос о механизме процесса деполимеризации и сегодня является не полностью изученным.

Исследования, проведенные в 1993–1995 гг. на 1482 *больных нестабильной стенокардией или с инфарктом миокарда без зубца Q*, показало, что применение Дальтепарина, назначаемого подкожно дважды в сутки в дозе 120 ЕД/кг массы тела больного, является безопасной и эффективной альтернативой НФГ у пациентов с данной патологией.

На 65 *больных панкреонекрозом* проведено сравнительное изучение эффективности Эноксапарина и нефракционированного гепарина. Полученные данные свидетельствуют о более высоком уровне тканевой перфузии у больных, получавших Клексан (Эноксапарин), что способствовало более эффективному дренированию очага поражения в зоне деструкции. Усиление тканевой перфузии вне зоны деструкции предотвращает распространение некроза и прогрессированию заболевания.

При исследовании эффективности гепаринов для лечения *больных острым коронарным синдромом без подъемов сегмента ST* на ЭКГ обнаружено, что Эноксапарин не более эффективен, чем нефракционирован-

ный гепарин. Между двумя сравниваемыми препаратами не было значимой разницы по количеству инфаркта миокарда и летальных исходов.

Геморрагические осложнения были довольно редкими, но тем не менее, они достоверно чаще возникали у больных, получавших Эноксапарин 15,2 % и 12,5 % при использовании НФГ. Предположение продемонстрировать явное превосходство Эноксапарина над НФГ в отношении эффективности при равном риске кровотечений не подтвердилось. В действительности эффективность оказалась одинаковой, а риск кровотечений при использовании Эноксапарина достоверно более высокий. Тем не менее, основным результатом вполне благоприятен для Эноксапарина, если учесть удобство его применения.

В исследованиях ESSENCE установлено, что антитромбическая терапия с использованием Эноксапарина и ацетилсалициловой кислоты *снижает риск развития ишемических осложнений у пациентов с нестабильной стенокардией или острым инфарктом миокарда без зубца Q*. В исследовании TIMI 11B установлено, что Эноксапарин снижает смертность и необходимость проведения неотложной реваскуляризации у больных нестабильной стенокардией и острым инфарктом миокарда без подъема сегмента ST более эффективно, чем НФГ. Исследование TIMI 11B было начато в 1984 году в клинике Гарвардской медицинской школы (США). В рамках научного проекта TIMI 11B изучали клиническую эффективность применения тромболитических, антитромботических и антитромбоцитарных средств у пациентов с нестабильной стенокардией и острым инфарктом миокарда без/с элевацией сегмента ST. Установлено, что указанные лекарственные средства играют важную роль в лечении больных с острым коронарным синдромом. Кроме того, была разработана специальная клиническая шкала для оценки степени риска возможного развития осложнений нестабильной стенокардии / острого инфаркта миокарда без подъема сегмента ST.

Эноксапарин оказывает более сбалансированное сберегающее действие на систему гемостаза. Исследования проводили на 536 больных. Двукратное введение Эноксапарина в дозе 40 мг в сутки после транскатетерной деструкции обеспечивает более стабильное снижение активности системы коагуляции, чем гепарин введенный подкожно по 5000 ЕД с интер-

валом 6 часов. Применение Эноксапарина для профилактики тромботических осложнений после транскатетерной деструкции также удобно в смысле частоты введения и длительности применения. Сегодня ведущие специалисты в области кардиологии считают что, следует отказаться от использования НФГ и применять Эноксапарин в целях снижения смертности и заболеваемости инфарктом миокарда.

Исследования по оценке влияния НМГ (Фраксипарина) на частоту фатальной тромбоэмболии проводили на 4498 пациентах с умеренным риском тромбоэмболических осложнений после общехирургических операций (абдоминальной, торакальной и др.). Авторы выявили существенное снижение частоты фатальной тромбоэмболии легочной артерии (с 0,18 до 0,09 %), тромбоэмболической смертности (с 0,36 % до 0,05 %).

При использовании Фраксипарина для экстракорпорального метода детоксикации кардиологических больных было установлено, что доза препарата в эквивалентных международных единицах действия приблизительно на 70 % ниже, чем при использовании НФГ. Фраксипарин вводили один раз непосредственно перед процедурой, и не было необходимости в повторных введениях и инфузиях препарата в период всей процедуры. Количество геморрагических осложнений при использовании Фраксипарина было значительно меньше, чем в контрольной группе. В связи с малым влиянием на время образования сгустка не требуется постоянного коагуляционного контроля – АЧТВ. При лечении коротким курсом в течение 4 дней не успевают закончиться запас антитромбина III в организме. Однако бесконтрольное применение этого препарата снижает эффективность его использования и вызывает опасные для жизни осложнения.

Интерес представляют данные, полученные авторами при сравнительном изучении фармакокинетических характеристик НМГ при использовании в целях предотвращения тромбоэмболических осложнений. Полученные данные, как показывает табл. 9, подтверждают, что используемые НМГ: Дальтепарин, Эноксапарин и Надропарин существенно отличаются по основным фармакокинетическим характеристикам (при подкожном введении).

Таблица 9 – Фармакокинетические характеристики низкомолекулярных гепаринов

Наименование препарата	Период полуэлиминации (T <sub>1/2</sub> ), час	Время достижения максимальной активности, час	Среднее время нахождения в организме, час
Эноксапарин-2000 МЕ	3,95 ± 0,65	2,35	6,68 ± 0,94
Эноксапарин-4000 МЕ	4,37 ± 0,47	2,91	7,38 ± 0,74
Надропарин-3075 МЕ	3,75 ± 0,68	3,62	7,10 ± 0,99
Дальтепарин-2500 МЕ	2,81 ± 0,84	2,82	5,26 ± 1,15

*Сравнение фармакологической эффективности НМГ и обычного НФГ затруднено, поскольку определение АЧТВ, которое обычно применяется для оценки антикоагулянтного действия НФГ, непригодно для оценки биологической активности НМГ. Сравнить эффективность НМГ и НФГ можно лишь путем измерения его активности против фактора Ха. Анализ литературных данных позволяет нам сделать вывод о том, что НМГ обладают более продолжительной биологической активностью по сравнению с НФГ. Период полужизни (T<sub>1/2</sub>) НМГ после внутривенного введения колеблется от 1,5 до 4,5 часов, в то время как T<sub>1/2</sub> для НФГ составляет 50–60 минут. Биодоступность большинства НМГ после подкожной инъекции составляет более 90 %, в то время как для НФГ – лишь 15–25 %. Различны механизмы и пути клиренса НМГ и НФГ. Как известно после внутривенного введения НФГ наблюдается две фазы элиминации – быстрая и медленная. Предполагают, что быстрая элиминация НФГ обусловлена его связыванием с рецепторами эндотелиальных клеток и макрофагов. В клетках происходит частичная деполимеризация и десульфатирование гепаринов, после чего его небольшие фрагменты, по-видимому, высвобождаются в кровоток, а затем выводятся почками. Фаза медленного клиренса, очевидно, начинается тогда, когда насыщены все клеточные рецепторы гепарина. Этими особенностями клиренса НФГ объясняется тот факт, что T<sub>1/2</sub> НФГ зависит от вводимой дозы. Клиренс НМГ более медлен-*

ный и более равномерный, чем у НФГ. Это объясняется тем, что НМГ значительно хуже связываются с эндотелиальными клетками и белками плазмы крови. Выведение почками является основным путем элиминации НМГ. При почечной недостаточности  $T_{1/2}$  НМГ значительно увеличивается. НМГ в значительно меньшей степени, чем НФГ, связываются с белками плазмы (например, гликопротеидом, богатым гистидином, фактором 4 тромбоцитов и т.д.), которые способны нейтрализовать их антикоагулянтную активность. НМГ более резистентны к тромбоцитарному фактору 4, освобождаемому из тромбоцитов при их активации. Именно низким сродством НМГ к гепарин-нейтрализующим белкам плазмы можно объяснить высокую биодоступность при их применении в низких дозах. Все указанные особенности фармакокинетики и фармакодинамики НМГ обуславливают их несомненное преимущество. *Другое преимущество НМГ перед НФГ низкая частота развития тромбоцитопении.* Частота тромбоцитопении при лечении НФГ колеблется от 1 до 3 %. Тромбоцитопения чаще встречается при лечении препаратами гепаринов, полученных из легких крупного рогатого скота (15,6 %), чем при лечении гепаринами, выделенными из слизистой оболочки кишечника (5,8 %). Использование эноксапарина натрия (Клексана) – эффективный способ предупреждения тромбоэмболических осложнений у больных онкоторакального профиля при проведении комплексного лечения. Применение этого препарата не увеличивает объем интра- и послеоперационной кровопотери при онкоторакальных вмешательствах, включая расширенные операции и медиастинальную лимфодиссекцию, способствует сокращению продолжительности лимфорей и сопровождается уменьшением количества пневмоний, развивающихся на фоне индукционной полихимиотерапии и в послеоперационный период.

Антитромботические средства применяют при беременности для лечения и профилактики венозной тромбоэмболической болезни, эмболий, связанных с клапанными пороками сердца или возникающих после протезирования клапанов, для предотвращения задержки развития плода и его потери у женщин с антифосфолипидным синдромом, а также при тромбофилических состояниях. Применяли следующие НМГ: надропарин (Фраксипарин) – 208 случаев, эноксапарин (Клексан) – 137, дальтепарин (Фрагмин) – 59, ревиварин (Кливарин) – 43, тинзапарин (Инногеп) – 19. *Дли-*

*тельное применение НМГ в сравнении с использованием НФГ значительно реже приводит к осложнениям, в том числе остеопорозу, тромбоцитопении, кровоточивости.* В целом на основании проведенного анализа авторы утверждают, что *применение НМГ во время беременности безопасно как для плода, так и матери и позволяет предупредить ряд осложнений.*

Тромбоз глубоких вен и тромбоэмболия легочной артерии являются главной причиной осложнений и смертности у пациентов с травмами. Крупномасштабные исследования в электропедической хирургии показали *эффективность и безопасность применения НМГ для профилактики тромбоза глубоких вен.* Было проведено рандомизированное, открытое многоцентровое исследование. В исследование были включены пациенты с переломами позвоночника, костей таза и нижних конечностей. Показано, что профилактика тромбоза глубоких вен и тромбоэмболии легочной артерии НМГ (надропарином кальция) у больных с ортопедической травмой один раз в день в фиксированной дозе так же эффективна, как и в дозе, рассчитанной в соответствии с массой тела пациента. Частота возникновения массивных кровотечений и низкая тромбоцитопения, индуцированная НМГ, свидетельствует о безопасности применения НМГ у пациентов с ортопедической травмой.

Продемонстрирована *высокая клиническая эффективность при использовании НМГ в нефрологии при хронических заболеваниях почек.* Таким образом, НМГ так же как НФГ являются катализаторами антитромбина III. Однако благодаря уменьшению количества мукополисахаридных цепей и соответственно уменьшению молекулярной массы их антитромботическое действие более селективно и поэтому более предсказуемо, чем у НФГ, и главным образом, заключается в инактивации фактора Ха. В меньшей степени НМГ влияют на фактор IIa, что уменьшает риск выраженных кровотечений, которые, в принципе, могут возникать на фоне любой антитромботической терапии. НМГ не связываются с эндотелием и обладают меньшей способностью связываться с белками плазмы. Это обуславливает большую биодоступность, значительное увеличение времени полувыведения и стабильный дозозависимый эффект при подкожном введении.

*Основными нежелательными эффектами НМГ являются кровотечения, тромбоцитопения и остеопороз.* К редким нежелательным реакциям относят гипоальдостеронизм, преходящее повышение сывороточной ак-

тивности аминотрансфераз и уровня свободных жирных кислот, аллергические кожные реакции и некроз кожи при подкожном применении. В контролируемых клинических исследованиях частота геморрагических осложнений при применении НМГ была в целом сопоставимой с таковой при лечении НФГ или ниже. Для купирования кровотечений, вызванных НМГ, может быть использован протамин, хотя он нейтрализует их активность менее эффективно, чем активность НФГ. *Серьезным нежелательным эффектом НФГ* является тромбоцитопения, которая развивается у 1–3 % больных и может привести к серьезным осложнениям. При лечении НМГ частота тромбоцитопении ниже, чем при использовании НФГ. При появлении тромбоцитопении на фоне введения НФГ его не следует менять на НМГ, учитывая высокую частоту перекрестной их реактивности с гепарин-зависимыми антителами. Остеопороз развивается при длительном применении НФГ, особенно при беременности. Случаи его описаны и при лечении НМГ, хотя препараты этой группы реже вызывают развитие остеопороза. Частота аллергических кожных реакций при лечении НМГ низкая, хотя возможно её до сих пор несколько недооценивают. Аллергические реакции включают в себя крапивницу, эритему, некроз кожи, нередко сочетающийся с тромбоцитопенией.

*НМГ различаются по способу производства, молекулярной массе и активности.* В связи с этим не рекомендуется в ходе лечения заменять один препарат на другой.

Таким образом, проанализировав данные о *побочном действии НМГ*, зарегистрированных сегодня в Украине, мы можем отметить *следующее*:

- кровотечения в разных местах более частые у больных с другими факторами риска;
- описаны спорадические случаи тромбоцитопений, иногда тромбообразующих;
- кожные реакции;
- описаны отдельные случаи кожного некроза, обычно возникающие в месте введения, при применении стандартного гепарина и НМГ;
- небольшие гематомы в месте введения;
- обратимая эозинофилия;
- генерализованные реакции повышенной чувствительности, включая отек кровеносных сосудов;
- повышенный уровень трансаминаз;

- описаны редкие случаи гематомы спинного мозга при использовании эноксапарина натрия на фоне спинальной анестезии с развитием стойкого или необратимого паралича. Риск этого осложнения выше при использовании катетеров после операции.

Суммируя изложенное, можно заключить, что в настоящее время большинство исследователей считают, что НМГ по силе действия не уступают НФГ. В то же время, препараты НМГ имеют ряд преимуществ, в том числе, они приводят к значительно меньшему количеству осложнений.

### 3.4. Контроль и стандартизация гепаринов

*Требования к качеству НМГ изложены в Государственной Фармакопее Украины и Европейской фармакопее.* В соответствии с требованиями фармакопей НМГ представляют собой соли сульфатированных глюкозаминогликанов со средней молекулярной массой меньше 8,0 кДа, которой должно быть не менее 60 % общей массы. НМГ имеют разную химическую структуру на концах полисахаридных цепочек.

#### **Контроль осуществляют по следующим характеристикам:**

- *идентификация*: А – ядерномагнитный резонанс (в сравнении с соответствующим стандартным образцом); В – определение отношения активности антифактора Ха к активности антифактора Па (не менее 1,5); С – эксклюзивная хроматография (молекулярные массы должны соответствовать препарату сравнения производителя); D – субстанция должна давать реакции либо на натрий, либо на кальций;

- *испытания на чистоту*: рН – от 5,5 до 8,0; азот – от 1,5 до 2,5 %; кальций – от 9,5 до 11,5 % (для гепарина кальция); натрий – от 9,5 до 12,5 % (для гепарина натрия);

- *молярное соотношение сульфат ионов к карбоксилат ионам* – не менее 1,8;

- *тяжелые металлы* – не более 0,003 %;

- *потеря в массе при высушивании* – не более 10,0 %;

- *бактериальные эндотоксины* – менее 0,01 МЕ/МЕ анти-Ха активности;

- *количественное определение* – активность не менее 70 МЕ активности анти-фактора Ха (также проводят определение активности к анти-фактору Па).

Проанализировав указанные тесты, мы не обнаружили методов, позволяющих оценить присутствие в препаратах гепарина гиперсульфатированного хондроитин сульфата и дерматан сульфата. В то же время, именно с одним из этих компонентов (гиперсульфатированным хондроитин сульфатом) связывают серьезные побочные эффекты. В настоящее время, в России предложено всем производителям ввести в нормативную документацию тестирование субстанций по данному продукту. В качестве метода предлагается капиллярный электрофорез в свободном растворе (зональный капиллярный электрофорез). На электрофореграмме тестируемого раствора не должен присутствовать остроконечный пик гиперсульфатированного хондроитин сульфата перед пиком гепарина. Допускается наличие пика дерматан сульфата после пика гепарина. Также предлагается проведение ЯМР спектроскопии в диапазоне 1,5–2,5 м.д.; не допускается присутствие характерного для гиперсульфатированного хондроитин сульфата сигнала при м.д. Необходимо отметить, что ряд производителей вводят дополнительные тесты, например, содержание дерматан сульфата не более 0,9 % (Shenzhen Hepflink (TONGDA) Biological Technology Co. LTD). Кроме того, обязательным является определение: остаточных органических растворителей, используемых при производстве (ацетона, этанола, метанола и др.); микробиологической чистоты; специфического оптического вращения (не менее чем 35 °). Возможно применение масс-спектропии для получения информации о структурной организации гликозаминогликанов. В Европейской фармакопее представлена монография «Надропарин кальция». Для идентификации субстанции необходимо определять фракционный состав и анти-фактор Ха активность. Фракционный состав предлагается определять методом ВЭЖХ с рефрактометрическим детектором; анти-фактор Ха с помощью реактивов для спектрофотометрического определения.

### Заключение

Хотелось бы отметить, что НМГ (Дальтепарин, Эноксапарин, Надропарин и др.) существенно различаются между собой по фармакодинамике влияния на каскад свертывания и фармакокинетическим характеристикам. Анализ литературы позволяет нам рассматривать НМГ как различные препараты, каждый из которых характеризуется собственным профилем эффективности и безопасности. Таким образом, даже препараты с близким

составом по молекулярным массам все же отличаются один от другого и по разному влияют на систему свертывания крови. Все НМГ отличаются между собой средней молекулярной массой, её распределением и биологической активностью *in vitro* и *in vivo*. НМГ более длительный период циркулируют в крови, значительно дольше инактивируют (на фосфолипидных мембранах) фактор Ха (не снижая его синтез), минимально ингибируют тромбин. Высокое родство НМГ к антитромбину III, их пролонгированная антитромбиновая активность дают возможность использовать меньшиеточные дозы, при однократном подкожном введении надежно предотвращать тромбоэмболии, в том числе и послеоперационные. После подкожного введения НМГ полностью адсорбируются и длительность полувыведения их анти-Ха активности почти в два раза больше, чем НФГ. В то же время, период элиминации анти-IIa активности такой же, как у НФГ. Биодоступность НМГ достигает 90 %. Даже при низких дозах доступность НМГ выше, чем у НФГ. Последнее связано с низкой аффинностью НМГ к эндотелию, белкам плазмы, внеклеточному матриксу, а также к 4 фактору тромбоцитов, которые нейтрализуют антикоагулянтный эффект НФГ. НМГ усиливают фибринолиз: они высвобождают из эндотелия сосудов эндогенные антитромботические вещества и активаторы пламиногена, непосредственно повышают антитромботический потенциал стенок сосудов и опосредовано стимулируют выделение антитромботических гликозаминогликанов и простаглицлинов – эффективных ингибиторов агрегации тромбоцитов и вазодилаторов, которые являются существенным компонентом антикоагулянтной активности этих гепаринов. Одним из важнейших факторов для более широкого использования НМГ является экономия средств для лечения больных. Так, по данным ряда исследователей, учитывая, что терапевтический эффект наблюдается при приеме НМГ 1 раз в сутки, стоимость лечения практически в два раза ниже, чем при использовании НФГ. В отличие от НФГ различные препараты НМГ могут быть дифференцированы по биологическим и клиническим признакам. НМГ рассматриваются специалистами как различные лекарственные средства, требующие определения дозировки и спецификаций для каждого продукта. Различия между НМГ обусловлены их молекулярными и структурными свойствами. В зависимости от метода деполимеризации: химическая (Эноксапарин), ферментативная (Гинзапарин), обработка азотистой кислотой (Дальтепарин), окислением (Ардепарин) мы сталкиваемся с различны-



ми по составу и свойствам препаратами. В каждом препарате установлено различное соотношение отдельных цепей гепарина, обуславливающее различные молекулярные массы. Любые минимальные изменения технологического процесса могут изменять ряд свойств препаратов НМГ: плотность заряда, формирование ангидро-манно или ангидро-глюко группировок, различное содержание сульфо- и ацетил- групп. Так, например, для Эноксапарина около 30 % молекул не охарактеризованы путем прямого анализа. Таким образом, существует вероятность, что могут быть определенные различия между различными препаратами НМГ.

В то же время при клиническом применении НМГ существует проблема правильного подбора препарата и его вводимой дозы, что вызвано отличающимися свойствами гепарина из-за различной специфичности, молекулярной массы, различного состава и наличия сопутствующих примесей. По нашему мнению, необходимо в субстанциях препаратов определять содержание каждой молекулярной фракции. При средней молекулярной массе от 3,8 до 5,0 кДа, по-видимому, необходимо определять содержание именно этого компонента. Кроме того, необходим контроль препаратов по другим примесным компонентам: хондроитинсульфату (присутствие в препаратах хондроитинсульфата может приводить к реакциям анафилактического типа), гипертсульфатированному хондроитинсульфату, дерматан сульфату и др. Учитывая, что соотношение антифактора Ха к антифактору Па даже в пределах одного продукта широко варьирует (так, для надропарина кальция это соотношение колеблется от 2,5 до 4,0) необходимо стандартизовать продукт по этому показателю. Используемые сегодня НМГ должны рассматриваться как оригинальные, а не генерические препараты (непатентованные лекарственные препараты, являющиеся воспроизведением оригинального препарата, на действующее вещество которого истёк срок патентной защиты, могут отличаться от оригинального препарата по составу вспомогательных веществ), отличающиеся по способам получения, составу и клиническому действию. Все это требует проведения соответствующих исследований по изучению их физико-химических, биологических и клинических свойств. Перспективы у тех производителей НМГ, которые сумеют своевременно дополнить требования фармакопейными методами анализа, позволяющими стандартизовать препараты низкомолекулярных гепаринов с целью снижения побочного действия.

### ***Контрольные вопросы***

1. Какой механизм действия характерен для гепарина?
2. Классификация гепаринов по спектру действия и химической структуре.
3. Какими свойствами обладает нефракционированный гепарин?
4. В чем преимущества низкомолекулярного гепарина?
5. Какими методами определяют биологическую активность гепаринов?
6. Каковы основные методы применяют для получения низкомолекулярных гепаринов?
7. Охарактеризуйте основные технологические этапы получения гепаринов и методы их очистки.
8. Какие ферменты используются для получения низкомолекулярных гепаринов?
9. Схема производства эноксапарина натрия.
10. Каким образом влияют примеси низкомолекулярных гепаринов на их фармакологическую активность?
11. Описать сырьевые источники для получения различных видов гепаринов.
12. С какой целью при получении низкомолекулярных гепаринов используется ультрафильтрация?
13. Привести основные фармакопейные требования к низкомолекулярным гепаринам.
14. Физико-химические и фармакологические свойства гепаринов.
15. Какие основные лекарственные формы гепаринов?
16. Какие методы применяют для характеристики гепаринов?
17. Какова роль гепаринов в системе свертывания крови?
18. Чем объясняется необходимость в препаратах гепарина?
19. При каких патологических состояниях применяют гепарин?

## ГЛАВА 4. BIOTEХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ВИТАМИНОВ

*Витамины* – низкомолекулярные органические вещества разнообразной химической структуры, которые являются биологическими катализаторами химических реакций проходящих в живой клетке, необходимы для нормального обмена веществ и жизнедеятельности организма. Термин витамины предложил в 1911–1912 году польский ученый К. Функ. Многие витамины – это предшественники коферментов, берущих участие в ферментативных реакциях. Сегодня известно около 30 витаминов и витаминоподобных соединений. По физико-химическим свойствам витамины разделяют на *водорастворимые* (В<sub>1</sub> – тиамин, В<sub>2</sub> – рибофлавин, В<sub>5</sub> – пантотеновая кислота, В<sub>6</sub> – пиридоксин, В<sub>12</sub> – кобаламин, РР – никотиновая кислота, Н – биотин, фолиевая кислота, С – аскорбиновая кислота, Р – рутин) и *жирорастворимые* (А – ретинол, D – кальциферол, Е – токоферол, витамин К).

Человек и животные получают большинство витаминов с пищей. В ряде случаев с продуктами питания в организм попадают не витамины, а вещества близкие к ним по строению, так называемые, провитамины (предшественники витаминов), которые в организме превращаются в витамины. Кроме того, ряд витаминов синтезируется микрофлорой кишечника человека и животных.

Недостача или отсутствие витаминов приводит к тяжелым заболеваниям (цинга, рахит, куриная слепота, полиневрит и др.). Витаминная недостаточность (гиповитаминоз) – патологическое состояние, обусловленное недостатком в организме отдельного витамина или комплекса витаминов, что сопровождается нарушениями биохимических и физиологических процессов и возникновением специфической патологии. Основными причинами гиповитаминоза является: уменьшение поступления определенного витамина в организм в составе продуктов питания (экзогенные гиповитаминозы); нарушения при усвоении определенных витаминов клетками организма, вследствие снижения их всасывания в пищеварительном тракте

или неспособности биохимических систем организма включать витамины в обменные процессы (эндогенные гиповитаминозы); увеличение выведения витамина из организма или повышенная его утилизация в биохимических или физиологических процессах (в период кормления грудью, беременности, тяжелых инфекционных болезнях, при экстремальных температурах и тяжелой физической работе).

Избыток витаминов (гипервитаминоз) наблюдается при чрезмерном поступлении витаминов в организм. Наблюдается, например, при приеме высоких доз жирорастворимых витаминов, которые характеризуются выраженной липофильностью и способны задерживаться в организме. Так, гипервитаминоз витамина D может развиваться при увеличенном потреблении печени и жира некоторых морских рыб, а также у детей при передозировке витамина D в процессе лечения рахита. При гипервитаминозе витамина D возникает гиперкальциемия и гиперфосфатемия вследствие деминерализации костной ткани, активации процессов всасывания Ca<sup>2+</sup> в кишечнике и реабсорбции в почках.

Наука о витаминах развивается более 130 лет с конца XIX века:

- 1881 г. – русский ученый Лунин Н. И. провел эксперименты с пищевыми веществами: извлекал белки, жиры, углеводы и минеральные соли из молока и кормил этой смесью лабораторных мышей. Животные болели и умирали. Луниным Н. И. был сделан вывод о том, что для удовлетворения потребностей организма животных, кроме указанных веществ, необходимы и другие вещества;

- 1911 г. – английский ученый Хопкинс Ф. Г. расширив эксперименты Лунина Н. И. и проведя анализ проведенных результатов, выступил с теорией о «дополнительных» питательных веществах, необходимых организму для нормального развития;

- 1911 г. – польский ученый К. Функ, работающий в Лондоне, опубликовал результат своих исследований экстрактов из семян риса. Выделил вещество в кристаллическом состоянии, он назвал его «витамином» (vita (жизнь) + aminus – т.е. азотосодержащие вещества, необходимые для жизни). К. Функ ввел новое понятие – авитаминоз;

▪ 1920 г. – ученые К. Матилл и А. Конклин показали, что в смешанной пище содержится вещество, которое абсолютно необходимо для нормального размножения животных. Активное вещество, предохраняющее от бесплодия, было выделено из масла пшеничных зародышей и из хлопкового масла и названо витамином Е;

▪ 1924 г. – американские ученые А. Гесс, Г. Стинбок и М. Вайншток из растительных масел и продуктов питания после облучения их УФ-лучами с длиной волны 280–310 нм получили активный препарат, предотвращающий развитие рахита у детей. Вещество было идентифицировано с эргостерином и названо витамином D<sub>1</sub>. В 1936 году ученый А. Виндаус выделил эргостерол из дрожжей и показал, что истинным витамином D является не эргостерин, а продукт его превращения, образующийся при УФ облучении, который был назван витамином D<sub>2</sub>.

▪ 1927–1929 г.г. – американский ученый Сент-Джерди А. установил структуру витамина С – аскорбиновой кислоты;

▪ 1929 г. – установлено, что витамины связаны с ферментами, являясь для них кофакторами. Хопкинс Ф. Г. и Эйкман Х. были удостоены Нобелевской премии за открытие антиневрического витамина (В<sub>1</sub> – тиамин) и открытие витамина роста;

▪ 1930–1931 г.г. – швейцарский ученый Каррер П. установил, что из β-каротина образуется витамин А;

▪ 1933 г. – Каррер П. установил, что вещество рибофлавин идентично витамину В<sub>2</sub>;

▪ 1933 г. – американский ученый, биохимик Р. Вильямс открыл пантотеновую кислоту – витамин В<sub>5</sub>;

▪ 1929–1939 г.г. – датский ученый Дам Х. и американский ученый Дойзи Э. А. открыли витамин К;

▪ 1936 г. – американский ученый Сент-Джерди А. из кожуры лимона выделил рутин, названный витамином Р;

▪ 1937 г. – американский ученый Эльвегейм К. А. из экстракта печени выделил чистую никотиновую кислоту – витамин РР;

▪ 1934 г. – Сент-Джерди А. получил Нобелевскую премию за открытие витамина В<sub>6</sub> – пиридоксина;

▪ 1948 г. – американским ученым Дороти Кроуфут-Ходжкин открыт витамин В<sub>12</sub>.

Исследования, направленные на изучение структуры витаминов и их биологического значения продолжают и сегодня.

Таким образом, витамины представляют собой группу незаменимых органических соединений различной химической природы, необходимых любому организму в ничтожных концентрациях и выполняющих в нем каталитические и регуляторные функции. Недостаток того или иного витамина нарушает обмен веществ и нормальные процессы жизнедеятельности организма, приводя к развитию патологических состояний. Витамины не образуются у гетеротрофов. Способностью к синтезу витаминов обладают лишь автотрофы, в частности растения. Многие микроорганизмы также образуют целый ряд витаминов. В связи с этим синтез витаминов с помощью микроорганизмов стал основой для разработки технологий промышленного производства этих биологически активных соединений.

Благодаря изучению физиологии и генетики микроорганизмов (продуцентов витаминов) и выяснению путей биосинтеза каждого из них создана теоретическая основа для получения микробиологическим способом практически всех известных в настоящее время витаминов. Однако с помощью энзимов целесообразнее производить лишь особо сложные по строению витамины: В<sub>2</sub>, В<sub>12</sub>, β-каротин (провитамин А) и предшественники витамина D. Остальные витамины либо выделяют из природных источников, либо синтезируют химическим путем. Витамины используются в качестве лечебных препаратов, для создания сбалансированных пищевых и кормовых рационов и для интенсификации биотехнологических процессов.

Необходимо отметить, что в организме человека и животных источником синтеза витаминов являются микроорганизмы кишечника. Так, микроорганизмы синтезируют фолиевую кислоту в количествах, достаточных для удовлетворения потребностей организма в этом витамине. Витамин В<sub>12</sub> (кобаламин) также может синтезироваться микрофлорой кишечника при условии доставки с пищей кобальта. Микрофлорой кишечника также синтезируется витамин В<sub>3</sub> (пантотеновая кислота) и фолиевая кислота в количествах, достаточных для удовлетворения потребностей организма в этом витамине. Микрофлора кишечника является важным источником

биотина (витамин Н), пиридоксина (витамин В<sub>6</sub>), тиамина (витамин В<sub>1</sub>), частично обеспечивающая потребность организма человека и животных.

**Производство витаминов** осуществляется следующими **основными путями**:

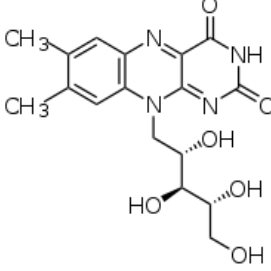
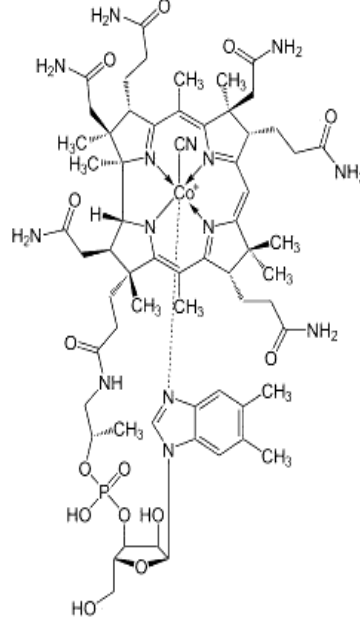
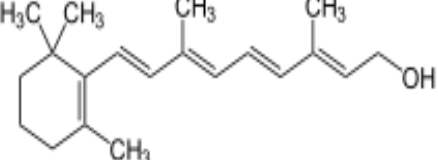
1. **Экстракция витаминных препаратов из растительного или животного сырья.** С этого направления начиналась витаминная промышленность, поскольку первые витаминные препараты были получены именно таким путем. Например, витамин В<sub>12</sub> получали из сырой печени крупного рогатого скота, каротин – из моркови. Но в настоящее время доля витаминов, получаемых этим методом, незначительна ввиду очень низкого содержания их в природном сырье и ограниченности сырьевых ресурсов.

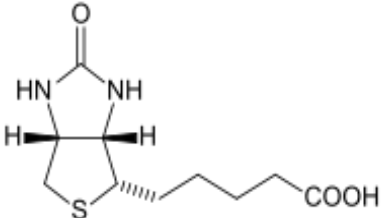
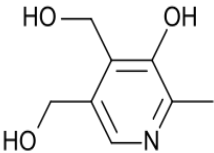
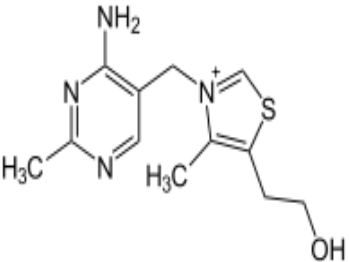
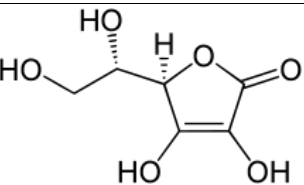
2. **Химический синтез витаминов.** Производство синтетических витаминов занимает, пожалуй, ведущее место в современной витаминной промышленности. Основная номенклатура витаминов представлена веществами, полученными химическим синтезом из химических видов сырья или сочетанием химического синтеза с биосинтезом. Однако такой способ производства витаминов представляет собой сложный, многоступенчатый процесс, сопряженный с большими производственными затратами, что повышает себестоимость продукции и делает конечные продукты слишком дорогими.

3. **Биосинтез витаминов.** Получение витаминов осуществляют микробиологическим способом с использованием штаммов-продуцентов. Сегодня, основные витамины, используемые в фармации, получены при помощи биосинтеза: рибофлавин, цианокобаламин, аскорбиновая кислота, эргокальциферол, никотиновая кислота и др.

В табл. 10 представлены химические структуры витаминов, используемых в составе лекарственных препаратов.

Таблица 10 – Химические структуры витаминов

Витамины	Химическая структура
1	2
Витамин В <sub>2</sub> (рибофлавин)	
Витамин В <sub>12</sub> (цианокобаламин)	
Витамин А (ретинол)	

1	2
Витамин Н (биотин)	
Витамин В <sub>6</sub> (пиридоксин)	
Витамин В <sub>1</sub> (тиамин)	
Витамин С (L-аскорбиновая кислота)	

#### 4.1. Производство витамина В<sub>2</sub> (рибофлавин)

Витамин В<sub>2</sub> (рибофлавин C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>) входит в состав флавиновых ферментов, участвующих в транспорте водорода (тканевом дыхании) и образовании АТФ в митохондриях. Рибофлавин используют для лечения людей с гиповитаминозом, конъюнктивитом, кератитом, вирусным гепатитом А, заболеваниями печени, железодефицитной анемии, лучевой болезни и др.

Вплоть до 30-х годов прошлого столетия рибофлавин выделяли из природного сырья. В наибольшей концентрации он присутствует в моркови и печени трески. Из 1 тонны моркови можно выделить только 1 грамм рибофлавина, а из 1 тонны печени – 6 грамм витамина. В 1935 году обнаружен активный продуцент рибофлавина – гриб *Eremothecium ashbyii*, способный при выращивании на 1 тонне питательной смеси синтезировать 25 кг витамина В<sub>2</sub>. Сверхсинтез рибофлавина добиваются действием на дикие штаммы мутагенов, нарушающих механизм ретроингибирования синтеза витамина В<sub>2</sub>, флавиновыми нуклеотидами, а также изменением состава культуральной среды. Отбор мутантов ведут по устойчивости к аналогу витамина В<sub>2</sub> – розеофлавиону.

В состав среды для роста продуцентов витамина В<sub>2</sub> входят комплексные компоненты – соевая мука, кукурузный экстракт, меласса, сахароза, карбонат кальция, натрия хлорид, гидрофосфат калия, витамины, минеральные вещества. Продуценты витамина В<sub>2</sub> выращивают на средах, где в качестве источника углерода используют глюкозу, сахарозу, крахмал, пшеничную муку, а в качестве источника азота используют молочную сыворотку, рыбную и кукурузную муку, казеин и др. Для культивирования продуцента используют биотин, тиамин, инозит, ростовые вещества, содержащиеся в зародыше пшеницы, картофельном соке и автолизате дрожжей. Установлено, что биосинтез рибофлавина продуцентом *Eremothecium ashbyii* стимулируется липидами. Так, при добавлении в питательную среду кукурузного или соевого масла (0,5–1,0 % отходов масложировых комбинатов) выход рибофлавина увеличивается вдвое. Грибы весьма чувствительны к изменению состава среды и подвержены инфицированию. Перед подачей в ферментер, среду подвергают стерилизации, добавляя к ней ан-

тибиотики и антисептики. Готовят жидкую питательную среду и посевной материал культуры дрожжей в разных емкостях – ферментере и посевном аппарате. Культивирование продуцента проводят поверхностным или глубинным способом. Витамин накапливается в клетках гриба-продуцента, либо в виде предшественника – флавина денинуклеотида, либо в свободном состоянии.

Среда проходит стерилизацию при 120–122 °С в течение 1 часа. Культивирование ведут при оптимальной температуре 28–30 °С и давлении 10<sup>4</sup> Па при расходе воздуха 1,5–2,0 литра в минуту до начала лизиса клеток и появления спор, которые определяют микроскопически. При биосинтезе рибофлавина начальное значение рН 6,0–7,0; в процессе роста грибов (*Eremothecium ashbyii*, *Ashbyii gossipii*) рН снижается до 4,5. Поэтому для эффективного синтеза рибофлавина величину рН постоянно поддерживают на уровне 9,5. После окончания процесса ферментации культуральную жидкость вместе с мицелием передают в вакуум-выпарные аппараты, где её нагревают до 80 °С с целью разрушения (термолиза) клеточных структур с одновременным концентрированием.

В качестве посевного материала используют споры *Eremothecium ashbyii*, выращенные на пшенице (7–8 дней при 29–30 °С). После стерилизации, жидкий посевной материал подается в ферментер. При процессе ферментации грибов для получения кормового рибофлавина концентрация витамина в культуральной жидкости может достигать 1,4 мг/мл. По завершении процесса ферментации культуральную жидкость концентрируют в вакууме, высушивают на распылительной сушке (до влажности 5–10 %) и смешивают с наполнителями.

В 1983 году во ВНИИ генетики микроорганизмов был сконструирован рекомбинантный штамм продуцента *Bacillus subtilis*, характеризующийся увеличенной дозой оперонов, которые контролируют синтез рибофлавина. Клонированием генов рибофлавинового оперона в одной из созданных плазмид был получен производственный штамм-продуцент витамина В<sub>2</sub>, способный синтезировать втрое больше по сравнению с *Eremothecium ashbyii* количество рибофлавина всего за 42 часа ферментации. Работа по получению продуцента проходила в несколько этапов:

I этап – конструирование с применением генетико-селекционных методов реципиентного штамма *B. subtilis* Y6 с нарушенной системой рекомбинации;

II этап – конструирование с применением генетико-селекционных методов рекомбинантной плазмиды, несущей рибофлавиновый оперон штамма *B. subtilis* 53А с нарушенной негативной регуляцией;

III этап – конструирование рекомбинантного штамма продуцента рибофлавина *B. subtilis* 62/pMX30ribO 186.

*Известно, что биосинтез рибофлавина B. subtilis подвержен негативному контролю. Имеется два вида мутаций, снимающих этот контроль: мутации в операционной области рибофлавинового оперона ribO и мутации по репрессору биосинтеза рибофлавина ribC. На первом этапе получения резистентного штамма в штамм B. subtilis RK6121 методом генетической трансформации вводят мутации ribC 862 и ribO 186. Затем для увеличения пула предшественника рибофлавина (гуанозин-5-трифосфата) методом мутагенеза in vivo под действием N-метил-N-нитрозонитрогуаницина и ультрафиолета последовательно вводят мутации, определяющие устойчивость к 0,5 мг/мл 8-азагуанина и к 10 мг/мл метионин-сульфоксида. Этот штамм синтезируют до 4 г/л рибофлавина за 48 часов.*

*Конструирование рекомбинантной плазмиды: к бациллярному вектору pMX30 определяющему устойчивость бацилл к эритромицину и имеющему размер 18,3 т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов) присоединяют фрагмент ДНК с рибофлавиновым опероном B. subtilis 53А, содержащим мутацию ribO 186 в операторной области. В результате была получена плазида, которой присвоено название pMX30ribO 186, обуславливающая устойчивость к 10 мкг/мл эритромицина и имеющая размер 28,6 т.п.н.*

*Конструирование рекомбинантного штамма B. subtilis 62/pMX30ribO 186: в штамм B. subtilis Y6 методом генной трансформации вводят плазмиду pMX30ribO 186. Полученный продуцент позволяет получить высокий выход рибофлавина: 12,4 г/л за 42 часа аэрации (культивирование при температуре 37–43 °С, аэрация 15 г O<sub>2</sub>/ч).*

Для получения рибофлавина с повышенным выходом, постоянно проводится изучение продуцентов витамина и создание новых рекомби-

нантных штаммов, разработка оптимального состава питательных сред и определение условий культивирования.

Так, например, морские дрожжи *Candida membranifaciens subsp. Flavinogenie* W14-3, выделенные из вод Восточно-Китайского моря секретируют рибофлавин в среду при росте на ксилозе в течение 24 часов и температуре около 25 °С. Культивирование оптимизировали с использованием 4-х переменных: содержания ксилозы, величины рН, температуры выращивания, а также скорости перемешивания дрожжевых клеток при инкубации. Исследователи добились выхода рибофлавина не менее 22 мг/мл при 54 часах инкубации. Максимальное количество витамина наблюдалось во время нахождения клеток в поздней стационарной фазе.

Рядом исследователей были отобраны мутанты *Ashbya gossypii*, продуцирующие повышенное количество рибофлавина и способные к эффективному синтезу витамина на среде с апельсиновой кожурой. Такая среда богата маслами, утилизируемыми микроорганизмами, продукты которого активизируют образование рибофлавина. Когда в ферментационной среде отобранных мутантов, солодовый экстракт был замещен апельсиновой кожурой (0,3 %) максимальная продукция витамина была на 180 % выше контроля, выращенного в культуральной среде, содержащей солод.

Проведено изучение метаболических изменений при биосинтезе рибофлавина на примере периодического культивирования сверхпродуцента витамина *Bacillus subtilis PK*. При разрушении гена оксидазы *bd Bacillus subtilis PK* обнаружено повышение удельной скорости развития культуры и увеличение выхода биомассы. У мутанта *cyd* синтез побочного продукта снижался, и образовывалось больше ацетона. Метаболические потоки были сокращены и источники углерода расходовались на синтез биомассы и рибофлавина (повышение на 30 %). Корреляция между выходом биомассы и продуктивностью *Bacillus subtilis PK cyd* указывает на возможность эффективной генерации энергии для экспоненциального роста сверхпродуцента рибофлавина при периодическом культивировании. Оптимизирован состав питательной среды, а именно источники азота для продукции рибофлавина *срА* мутантом *Bacillus subtilis 24A1/pMx45*. **Оптимальный состав среды:** 8 % глюкозы (источник углерода), 2 % дрожжевого порошка, 0,05 % MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O и 3 источника азота (0,1 % дрожжевого экстракта,

2 % соевой муки, 0,2 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). В оптимальных условиях выход рибофлавина достигал 5,0 г/л. Установлено, что 8 % глюкозы может быть полностью израсходовано за 60 часов культивирования.

В заключение хотелось бы отметить, что для выделения рибофлавина в лабораторных и производственных условиях используют культуры различных микроорганизмов (см. табл. 11).

Таблица 11 – Микроорганизмы, являющиеся продуцентами рибофлавина

Микроорганизмы – продуценты	Выход витамина (мг, %)
<i>Clostridium acetobytylicum</i>	97
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	58
<i>Mycocandida riboflavina</i>	200
<i>Bacillus subtilis</i> 24A1/pMx45	500
<i>Candida flaveri</i>	567
<i>Bacillus subtilis</i> 62/pMX30ribO186	1240
<i>Candida membranifaciens subsp. Flavinogenie</i> W14-3	2200
<i>Eremothecium ashbyii</i>	2480–6000
<i>Ashbyii gossypii</i>	6420

Для получения рибофлавина можно использовать химический синтез, в котором в качестве исходных компонентов применяют 3,4-диметиланалин и D-рибозу, полученную микробиологическим путем. Для биосинтеза рибозы используют транскетолазные мутанты: *Bacillus Subtilis*, *Penicillium brevi-compactum* и *Pseudomonas reptilivora*. В питательных средах для культивирования продуцентов в качестве источника углерода используются глюкоза и крахмал. В среду вносят соли аммония, фосфаты калия, соли магния. В ряде случаев в состав среды вводят дрожжевой и кукурузный экстракт. Например, в случае *Bacillus Subtilis* D-рибоза начинает накапливаться пропорционально потреблению глюкозы на 1–2 день и заканчивается на 4-й день. Максимальный выход D-рибозы наблюдается при температуре культивирования 36,5–36,6 °С. Выделение и очистку

D-рибозы осуществляют из культуральной жидкости после отделения микробных клеток центрифугированием и путем колоночной хроматографии с использованием сильноосновного анионита в боратной форме. Полученный раствор витамина В<sub>2</sub> подвергают кристаллизации. Необходимо отметить, что *производство рибофлавина микробиологическим методом по сравнению с химическим синтезом имеет существенные преимущества*, а именно:

- ✓ использование доступного сырья;
- ✓ осуществление процесса получения витамина в одну технологическую стадию;
- ✓ отсутствие токсических выбросов в атмосферу.

#### 4.2. Получение витамина В<sub>12</sub> (цианокобаламин)

Витамин В<sub>12</sub> (Со $\alpha$ [ $\alpha$ -(5,6-диметилбензимидазол)]-Со $\beta$ -цианокобамид – С<sub>63</sub>Н<sub>88</sub>СоN<sub>14</sub>O<sub>14</sub>P – цианокобаламин) активизирует обмен углеводов, белков и липидов, участвует в синтезе лабильных метильных групп, в образовании холина, метионина, нуклеиновых кислот, способствует накоплению в эритроцитах соединений с сульфгидрильными группами. Являясь фактором роста, стимулирует функцию костного мозга, что необходимо для нормобластного эритропоэза. Цианокобаламин способствует нормализации нарушенных функций печени и нервной системы, активизирует свертывающую систему крови, в высоких дозах вызывает повышение тромбопластической активности и активности протромбина.

В организме человека и животных определенное количество цианокобаламина синтезируется микрофлорой кишечника, что не удовлетворяет потребность организма в витамине, и дополнительное количество его организм получает с продуктами питания.

Витамин В<sub>12</sub> открыт в 1948 году одновременно в США и Англии. В 1972 году в Гарвардском университете был осуществлен химический синтез корриноидного предшественника витамина В<sub>12</sub>. Химический синтез корнестерона (структурного элемента корринового кольца витамина), включающий 37 стадий, в крупных масштабах не воспроизведен из-за сложности процесса.

Витамин В<sub>12</sub> регулирует углеводный и липидный обмен, участвует в метаболизме незаменимых аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований, стимулирует образование предшественников гемоглобина в костном мозге; применяется в медицине для лечения злокачественной анемии, лучевой болезни, заболеваний печени, полиневрита и т.п. Добавление витамина к кормам способствует более полноценному усвоению растительных белков и повышает продуктивность сельскохозяйственных животных на 10–15 %.

Первоначально витамин В<sub>12</sub> получали исключительно из природного сырья, однако из 1 тонны печени можно было выделить всего лишь 15 мг витамина. *Единственный способ его получения в настоящее время – микробиологический синтез*. Обнаружение витамина в качестве побочного продукта при производстве антибиотиков в значительной степени стимулировало поиск организмов-продуцентов витамина и изучение путей его образования. Однако механизмы регуляции биосинтеза витамина В<sub>12</sub> до настоящего времени полностью не расшифрованы. Известно, что при высоких концентрациях витамин полностью репрессирует синтез ключевых ферментов своего новообразования.

Продуцентами витамина В<sub>12</sub> при его промышленном получении служат актиномицеты, метанобразующие и фотосинтезирующие бактерии, одноклеточные водоросли. В 70-х годах XX века интерес ученых привлекли пропионовокислые бактерии, известные еще с 1906 года и широко используемые для приготовления препаратов в животноводстве. Выделено 14 видов пропионовокислых бактерий, продуцирующих витамин В<sub>12</sub>. Для получения высокоочищенных препаратов витамина В<sub>12</sub> пропионовокислые бактерии культивируют периодическим способом на средах, содержащих глюкозу, казеиновый гидролизат, витамины, неорганические соли, хлорид кобальта. Добавление в среду предшественника 5,6-диметилбензимидазола (способствует переводу неактивных форм в природный продукт) по окончании первой ростовой фазы (5–6 суток) стимулирует быстрый (18–24 ч) синтез витамина с выходом последнего 5,6–8,7 мг/л. Путем селекции, оптимизации состава среды и условий культивирования выход витамина В<sub>12</sub> в промышленных условиях был значительно повышен. Так, выход витамина на среде с кукурузным экстрактом и глюкозой при поддержании ста-



бильного значения рН около нейтрального достигает 21–23 мг/мл. Мутант пропионовокислых бактерий продуцирует до 30 мг/мл витамина. Бактерии плохо переносят перемешивание. Применение уплотняющих агентов (агар-агар, крахмал) предотвращающих оседание бактерий, а также использование высоко анаэробных условий и автоматического поддержания рН позволяет получить наиболее высокий выход витамина – 58 мг/л.

Из культуральной жидкости витамин В<sub>12</sub> выделяют экстракцией, органическими растворителями, ионообменной хроматографией с последующим осаждением витамина из фракций в виде труднорастворимых соединений. В процессе получения витамина В<sub>12</sub> с помощью пропионовокислых бактерий применяют дорогостоящую антикоррозийную аппаратуру, сложные и дорогостоящие питательные среды. Усовершенствование технологического процесса идет в направлении удешевления компонентов питательных сред и перехода с периодического культивирования на непрерывный процесс. В последние годы исследуется возможность получения витамина с использованием иммобилизованных клеток пропионовокислых бактерий. Учитывая высокую светочувствительность витамина В<sub>12</sub> при проведении биотехнологического процесса необходимо все операции осуществлять в затемненных условиях или используя красный свет.

Для нужд животноводства сотрудниками института им. А. Н. Баха предложена простая и дешевая технология получения витамина В<sub>12</sub>. По указанной технологии ферментацию осуществляет сложный биоценоз термофильных микроорганизмов, производящих метановое брожение. Комплекс микроорганизмов включает целлюлозоразлагающие, углеводсбраживающие, аммонифицирующие, сульфитвосстанавливающие и метанобразующие бактерии. На первой фазе процесса (10–12 дней) развиваются термофильные углеводсбраживающие и аммонифицирующие бактерии. При этом в слабокислой среде (рН 5,0–7,0) органические соединения превращаются в жирные кислоты и аммиак. На второй фазе, когда среду подщелачивают до рН 8,5; в биоценозе преобладают метанобразующие бактерии, которые сбраживают возникающие на первой фазе продукты до метана и диоксида углерода. Именно *метанобразующие бактерии* – *главные продуценты витамина*. Обогащение сред очищенными культурами метанобразующих бактерий увеличивает выход активных форм витамина В<sub>12</sub>.

Источником углерода в питательной среде служит ацетонобутиловая и спиртовая барда, которую поставляют заводы, перерабатывающие зерно и мелассу. Для оптимизации питательной среды в неё добавляют соединения кобальта (хлорид кобальта – 4 г/м<sup>3</sup>), который входит в состав молекулы витамина В<sub>12</sub> и субстраты для роста метанобразующих бактерий – низшие жирные кислоты и низшие спирты, что позволяет значительно повысить выход витамина В<sub>12</sub>.

Подготовленное сырье освобождают в декантаторе от взвешенных частиц и непрерывно подают в нижнюю часть ферментера – емкость. Одновременно в ферментер поступает посевной материал культуры микроорганизмов, предварительно выращенной в специальных аппаратах. Для выращивания продуцента требуются облигатно анаэробные условия, так как даже следовые количества кислорода подавляют рост бактерий. При создании анаэробных условий в среду подают диоксид углерода или газы, выделяющиеся в процессе ферментации. Ежедневно из ферментера отбирают 20–30 % объема среды. Продукт ферментации стабилизируют, подкисляя соляной или фосфорной кислотой до рН 6,3–6,5, а также добавляют 0,2–0,25 % сульфита натрия, что предотвращает разрушение витамина при тепловой обработке (особенно существенное в щелочной среде). В дальнейшем отобранная часть культуральной жидкости дегазируется, упаривается в вакууме; концентрат высушивается в распылительной сушке до влажности 10–15 % и смешивается с наполнителями.

Для медицинских целей субстанцию витамина В<sub>12</sub> получают в виде кристаллического темно-красного порошка, содержащего не менее 99 % основного вещества. Из субстанции готовят различные лекарственные формы: растворы для инъекций и таблетки.

Активно продуцируют витамин В<sub>12</sub> представители рода *Propionibacterium*, природные штаммы которых образуют от 1,0 до 8,5 мг/л витамина, а полученный искусственный мутант *P. Shermanii* М-82 способен накапливать витамин В<sub>12</sub> до 58 мг/л.

Практический интерес для микробиологического синтеза В<sub>12</sub> имеют представители актиномицетов и родственных микроорганизмов. Витамин В<sub>12</sub> в значительных количествах синтезируют *Nocardia rugosa* (до 18 мг/л), а также представители рода *Micromonospora*. Высокой кобаломинсинтези-

рующей активностью обладают метагенные бактерии, например, *Methanosarcina barkeri*, *M. Vacuolita* и отдельные штаммы галофильного вида *Methanococcus halophilus* (до 16 мг/л).

Витамин В<sub>12</sub> синтезируют строго анаэробные бактерии из рода клостридий. В значительных количествах образуют витамин В<sub>12</sub> ацетогенные клостридии *C. Thermoaceticum*, *C. Formicoaceticum* и *Acetobacter woodi*, синтезирующие ацетат из СО<sub>2</sub>.

Известны активные продуценты витамина В<sub>12</sub> среди псевдомонад. Некоторые штаммы *Pseudomonas denitrificans* нашли применение для промышленного получения цианокобаламина. Интерес представляют также термофильные бациллы, а именно, *Bacillus eirculans*, *Bacillus stearothermophilus*, которые растут при температурах, соответственно, 60 °С и 75 °С и за 18–24 часа культивирования без соблюдения стерильных условий дают высокий выход витамина.

Например, в России в качестве основного продуцента витамина В<sub>12</sub>, получаемого для медицинских целей, используют культуру *Propionibacterium shermanii*. Для получения витамина В<sub>12</sub> *P. shermanii* культивируют периодическим методом в анаэробных стерильных условиях в питательной среде, содержащей кукурузный экстракт, глюкозу, соли кобальта и сульфат аммония.

Образующиеся в процессе брожения органические кислоты нейтрализуют раствором щелочи, добавление которой регулируются автоматически. Через 72 часа культивирования в среду вносят предшественник биосинтеза – 5,6-диметилбензимидазол. Без введения предшественника бактерии синтезируют не имеющий клинического значения псевдовитамин В<sub>12</sub>, в котором азотистым основанием служит аденин. После введения предшественника ферментацию продолжают ещё 72 часа до содержания витамина в биомассе не менее 250 мкг/г.

Установлено, что основное накопление содержания витамина В<sub>12</sub>, синтезируемое пропионовыми бактериями, выращенными на сывороточной среде, наблюдается на ранней фазе логарифмического роста (до 72 часов инкубации).

Количественное содержание витамина В<sub>12</sub>, продуцируемое *Propionibacterium shermanii*, устанавливают микробиологическим методом по зонам роста витаминзависимого штамма *E. Coli* 133-3.

Витамин В<sub>12</sub> накапливается в клетках бактерий, поэтому по окончании процесса культивирования биомассу отфильтровывают или сепарируют и экстрагируют из нее витамин при температуре 85 ± 5 °С водой, подкисленный до рН 4,5–5,0.

Затем водный экстракт витамина охлаждают, доводят раствором щелочи рН до 6,8–7,2; к раствору добавляют сульфат аммония и раствор хлорного железа для коагуляции белков. Коагулят белков, отделяют на фильтр-прессе, и водный экстракт витамина В<sub>12</sub> поступает на стадию выделения и очистки кристаллического продукта.

Витамин В<sub>12</sub> из водного экстракта, освобожденного от белков, сорбируют на ионообменной смоле СГ-1 и элюируют водным раствором аммиака. Далее элюат пропускают через колонки с окисью алюминия, при этом витамин сорбируется на окиси алюминия, а примеси удаляются с маточным раствором.

С окиси алюминия В<sub>12</sub> элюируют водным ацетоном, к водно-ацетоновому элюату добавляют безводный ацетон до помутнения раствора и смесь выдерживают при температуре 3 ± 1 °С в течение 24–48 ч, при этом происходит кристаллизация витамина В<sub>12</sub>. Выделившиеся кристаллы технического витамина отфильтровывают, промывают безводным ацетоном, эфиром и сушат в вакууме.

Для химической очистки витамина В<sub>12</sub> используют его способность образовывать аддукты (комплексы) с фенолом, резорцином или крезолами. Для этого водный концентрат витамина обрабатывают водным раствором фенола, отделяют фильтрованием выделившийся комплекс, затем его разлагают путем обработки водным ацетоном. Витамин при этом выделяется в виде осадка, а фенол и примеси уходят с водно-ацетоновыми маточными растворами. Для окончательной очистки осуществляют одно- или двукратное переосаждение цианокобаламина из водного раствора ацетоном.

Необходимо отметить, что штаммы пробиотиков кишечника человека и животных способны продуцировать цианокобаламин. Поддержание микрофлоры кишечника является гарантией обеспечения нашего организ-

ма витамином В<sub>12</sub>. Так, например, *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 предотвращает побочные эффекты, вызванные дефицитом при питании витамина В<sub>12</sub>. Кроме того, обнаружено влияние содержания и типа аминокислот на продукцию витамина В<sub>12</sub> при культивировании *Lactobacillus reuteri*.

### 4.3. Получение витамина D<sub>2</sub>

В группу витаминов D объединены близкие по своей структуре и функции соединения – витамины D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub>. Они оба обладают антирахитическим действием. Недостаток витамина D в рационе детей приводит к возникновению широко известного заболевания – рахита, в основе развития которого лежат изменения фосфорно-кальциевого обмена и нарушения отложения в костной ткани фосфата кальция. Поэтому основные симптомы рахита связаны с нарушением нормального процесса костеобразования. Развивается остеомалация – размягчение костей. Кости становятся мягкими и под тяжестью тела принимают уродливые формы.

Витамин D<sub>2</sub> (эргокальциферол) получают путем микробиологического синтеза, при производстве которого применяют дешевое сырье (углеводороды) и установлен стимулирующий эффект ультрафиолетовых лучей на синтез эргостерина культурой дрожжей. Эргостерин и является предшественником жирорастворимого витамина D<sub>2</sub>. Установлено, что под действием ультрафиолета в дрожжевых клетках происходит фотохимическое превращение эргостерина в эргокальциферол. С химической точки зрения эргостерин представляет собой одноатомный ненасыщенный циклический спирт, в основе структуры которого лежит кольцо циклопентанопергидрофенантрена. Под действием УФ-лучей эргостерин через ряд промежуточных продуктов (люмистерин, тахистерин) превращается в витамин D<sub>2</sub>. В 1936 году Брокман выделил активный в отношении рахита препарат из рыбьего жира и назвал его витамином D<sub>3</sub>. Установлено, что предшественником витамина D<sub>3</sub> является не эргостерин, а холестерин. На рис. 14 показано получение витамина D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub>.

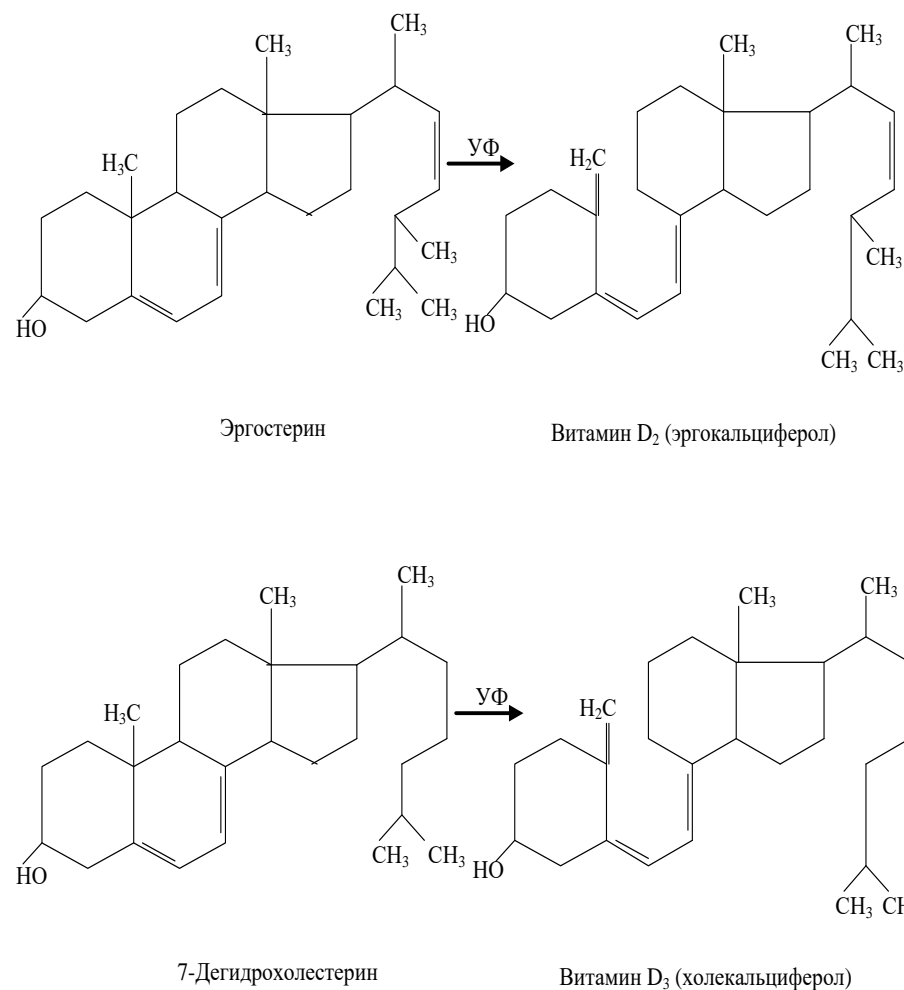


Рисунок 14 – Получение витамина D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub>

Продуценты эргостерина представлены в табл. 12.

Таблица 12 – Содержание эргостерина у микроорганизмов

Микроорганизмы	Количество эргостерина, % (на сухое вещество)
Saccharomyces ellipsoids	1,2–1,5
Rhodotorula glutinis	0,7–0,9
Candida utilis	0,4–0,6
Candida tropicalis	0,2–0,3
Aspergillus	1,2–1,4
Penicillium Westlingii	2,2

Для получения витамина D<sub>2</sub> из дрожжей или мицелия их биомассу гидролизуют в автоклаве, используя на 100 кг дрожжей или грибного мицелия 20 л воды и 10 мл концентрированной соляной кислоты. Гидролиз проводят при температуре 10 °С в течение 20–30 минут. Затем гидролизованную массу обрабатывают спиртом (40–50 мин) при 75–78 °С в специальном коагуляторе. Массу охлаждают до 10–15 °С и фильтруют. Фильтрат концентрируют, отделяя спирт и часть воды, получают концентрат витаминов группы В. Массу, оставшуюся после фильтрации, промывают водой, отгоняют спирт и воду. Полученную массу сушат до влажности 2 % и размельчают. Порошок дрожжей при 78 °С в экстракторе обрабатывают трехкратным объемом спирта-ректификата. После отделения раствора осадок повторно экстрагируют спиртом, который удаляют из экстракта, а осадок стущают до 70 % содержания сухих веществ. Из 100 кг дрожжей получают 20–25 кг липидного концентрата. Концентрат омыляют щелочью, после чего раствор кристаллизуют при 0 °С и облучают УФ-лучами при 280–230 нм. На выход витамина D<sub>2</sub> оказывает влияние длительность облучения УФ-лучами, температура и наличие сопутствующих примесей.

#### 4.4. Получение β-каротина

Важное место в обмене веществ у животных занимает β-каротин, который в печени превращается в витамин А (ретинол). Ретинол (витамин А – (C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O)) необходим для нормального течения метаболических процессов, в том числе для регуляции роста и развития организма. Обеспечивает нормальную функцию зрения, структурную целостность тканей, повышает резистентность организма к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды. При неполноценном питании и некоторых заболеваниях пищеварительного тракта и печени наблюдается дефицит витамина А (авитаминоз). Ранним признаком последнего является ухудшение сумеречного зрения, снижение аппетита, уменьшение массы тела, снижение неспецифической резистентности организма к инфекциям, нарушения со стороны кожи и др. Кроме того, в последнее время появились сообщения о том, что ретинол связан с регулированием сигнальных путей ядерных рецепторов, что активирует гены в организме человека и животных. Установлено, что витамин А отвечает за активацию ядерного рецептора TR4. Известно, что TR4 влияет на производство сперматозоидов, липидов и липопротеидов, развитие клеток центральной нервной системы и регулирование синтеза гемоглобина в зародыше. Ядерные рецепторы отвечают за активирование генов, обеспечивающих важные биологические процессы в организме. Одновременно, исследователям удалось выделить молекулы веществ, участвующих в транскрипции TR4, а именно, синтезе РНК на матрице ДНК. Полученные данные могут быть использованы для создания нового поколения лекарственных препаратов, полученных биотехнологическим путем.

В организме человека и животных каротины не образуются. Основные источники β-каротина для животных – растительные корма; человек получает β-каротин также из продуктов животного происхождения. Из ряда растительных объектов (морковь, тыква, облепиха, люцерна) можно выделить β-каротин. В начале 60-х годов XX века была разработана схема микробиологического синтеза β-каротина, которая стала основой промышленного способа его получения. Установлено, что многие микроорганизмы (фототрофные бактерии, актиномицеты, плесневые грибы, дрожжи) синтезируют β-каротин. Характерно, что содержание β-каротина у микроорга-

низмов во много раз превышает содержание этого провитамина у растений. Так, в 1 г моркови присутствует всего 60 мкг β-каротина, в то время как в 1 г биомассы гриба *Blaneslea trispora* – 3–8 тыс. мкг. Разработаны опытные установки как периодического, так и непрерывного действия для синтеза β-каротина, основным недостатком которых – высокая стоимость сырья и большая длительность процесса.

*Основными продуцентами β-каротина* являются гетероталлические микроскопические грибы (дрожжи), из них наиболее широкое применение нашли различные штаммы культуры *Blakeslea trispora*. При гетероталлизме особи различного пола внешне неразличимы, но отличаются по физиологическим и генетическим характеристикам. Гетероталлизм грибов выражен в образовании разнополого женского (+) и мужского (-) мицелия, при слиянии клеток которых образуются зиготы. Мицелий (+)-формы содержит больше β-каротина и поэтому окрашен в более яркую желтую окраску, чем мицелий (-)-формы. Но максимальное количество β-каротина синтезируется при совместном культивировании (+) и (-) форм, а именно, в 5–17 раз больше, чем при раздельном культивировании этих форм микроорганизмов.

Созданы высокопродуктивные штаммы, способные синтезировать и накапливать до 3000–4000 мг β-каротина на 1 л среды (для сравнения: в 1 кг моркови содержится в среднем 60–70 мг β-каротина).

В Российской Федерации при производстве β-каротина, в основном, используется культуры гриба *Blakeslea trispora* штаммы (+)МБ и (-)МБ, а также (+)С и (-)С, (+)8А и (-)8А. Эти штаммы способны синтезировать от 2000 до 3200 мг β-каротина на 1 л культуральной жидкости. Продуценты могут размножаться половым, бесполом и вегетативными путями. Половое размножение осуществляется при совместном выращивании, бесполое – спорами, вегетативное – отростками (обрывками) мицелия. Активность культур максимальная при совместном выращивании (+) и (-) форм и зависит от их соотношения, которое подбирается экспериментально в микробиологической лаборатории. В среднем соотношение (+) и (-) форм составляет 1 : 15, т.е. мужская (-)-форма используется с пятнадцатикратным избытком.

Установлено, что интенсивный биосинтез и накопление β-каротина происходит, в основном, во второй фазе развития, которая характеризуется прекращением роста мицелия, снижением рН среды и уменьшением содержания липидов в культуральной жидкости, вследствие их активной переработки в β-каротин.

*Технологический процесс производства β-каротина*, принятый промышленностью, включает следующие основные стадии:

1. Подготовка посевного материала.
2. Приготовление питательной среды.
3. Культивирование.
4. Термолиз и фильтрование мицелия.
5. Сушка и размол биомассы.
6. Приготовление готовой лекарственной формы препарата или получение кормового препарата микробиологического β-каротина.

*Подготовка посевного материал.* Главная особенность подготовки посевного материала в производстве β-каротина – раздельное выращивание (+) и (-) форм микроорганизмов продуцентов, начиная с выращивания на скошенных средах в пробирках и заканчивая посевными аппаратами. Их слияние происходит лишь в реакторе при совместном культивировании.

Исходные музейные культуры представляют собой споровый или вегетативный материал, хранящий раздельно (+) и (-) формы соответствующих штаммов.

В лаборатории их высевают на твердые среды в пробирках. Затем выращивание ведут на жидких питательных средах в колбах (объемом 0,75 л) в стерильных боксах на встряхивающих устройствах. На этой стадии подготовки посевного материала увеличивают примерно в 1,5 раза количество (-)-форм по отношению к (+)-формам. В посевных аппаратах соотношение (+) и (-)-форм достигает уже 1 : 10 т.е. объем аппарата с (-)-формой должен в 10 раз превышать объем аппарата с (+)-формой. При этом состав питательной среды для разных форм одинаковый, режим выращивания обеих форм в посевных аппаратах тоже практически не отличается (температура  $28 \pm 2$  °С, время культивирования от 36 до 72 часов).

*Приготовление питательной среды.* Основу питательной среды составляют пшеничная или рисовая мука и растительные масла (хлопковое,

кукурузное или подсолнечное). Кроме того, в питательную среду добавляют пеногасители (керосин, ПАВы), антиокислители (бутилоксианизол, лимонную или аскорбиновую кислоты), витамины (тиамин) и стимуляторы синтеза  $\beta$ -каротина. В качестве стимулятора наиболее эффективным является  $\beta$ -ионон, который можно заменить на более дешевую цитрусовую мелассу. Как заменители  $\beta$ -иона используют изопреновые димеры и тримеры, производные циклогексана, среди которых наибольшую активность проявляет 2,6,6-триметил-1-ацетилгексан.

В составе питательной среды для первой генерации находится: подсолнечный шрот – 8–12 %, меласса 1–2 %,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,05 %, баковый отстой – 4,2–5,0 %, тиамин хлорид – 0,0002 %. До стерилизации вводят биостимуляторы каратиноидообразования – 0,05–0,15 %; антиоксидант 0,03–0,05 %, pH среды составляет 6,0–6,5.

В составе питательной среды для второй генерации: мука соевая – 2,3 %, мука кукурузная 4,7 %,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,05 %, pH среды 6,1–6,5. Проводят контроль питательных сред: количество редуцирующих веществ 0,8–3,0 %; азота аминного 70–150 мг, %.

Культивирование проводят 40–48 часов при 26–28 °С и постоянном перемешивании в колбах при 220–240 об/мин. Периодически отбирают пробы для контроля стерильности, pH, количества биомассы.

Стерилизацию питательных сред проводят при 120 °С 30 минут в установках непрерывной стерилизации или непосредственно в аппаратах (инокуляторах, в посевных аппаратах). Учитывая особую чувствительность штаммов *Blakeslea trispora* к посторонним микроорганизмам, в некоторых случаях после стерилизации в питательную среду добавляют антибиотики для создания гарантированных стерильных условий в процессе культивирования.

Стерильный воздух получают по типовой схеме, характерной для микробиологических аэробных процессов. Как правило, стерилизацию осуществляют в две ступени:

1. Термическая стерилизация за счет подъема температуры воздуха до 200–250 °С при его сжатии в компрессоре;

2. Стерилизация в индивидуальных бактериальных фильтрах, установленных на линии подачи стерильного воздуха в барботер каждого биореактора и посевного аппарата.

*Культивирование* осуществляется в типовых биореакторах вместимостью от 10 до 32 м<sup>3</sup>, снабженных барботажным устройством, трехъярусной турбинной мешалкой, рубашкой для охлаждения и внутренними теплообменниками для отвода избыточного тепла, выделяемого грибами в процессе своего роста.

В биореактор загружают расчетное количество стерильной питательной среды, далее в стерильных условиях из посевных аппаратов подают сначала (-)-форму, а затем (+)-форму в соотношении, указанном инженером-биотехнологом (обычно 15 : 1). Выращивание культуры ведут при интенсивной аэрации и перемешивании. Температуру культуральной жидкости (процесс экзотермический) поддерживают в пределах 28 ± 2 °С путем подачи холодной воды в рубашку и теплообменники.

Гашение пены осуществляется обычно механическим пеногасящим устройством, установленным в верхней части вала мешалки. Если уровень пены превышает определенный предел, автоматически включается система подачи стерильного пеногасителя.

В процессе культивирования ведут постоянный контроль за ростом гриба и содержанием  $\beta$ -каротина в культуральной жидкости путем отбора проб не реже, чем два раза в сутки.

Содержание биомассы в культуральной жидкости должно находиться в пределах 28–40 г/л, а содержание  $\beta$ -каротина – не менее 2000 мг/л. Если эти показатели не достигнуты, в культуральную жидкость добавляют  $\beta$ -ионон или другой стимулятор, тиамин, антиокислители и продолжают культивирование до получения положительных результатов.

*Термолиз и фильтрация мицелия.* По окончании процесса культивирования осуществляют тепловую обработку культуральной жидкости (термолиз) с целью инактивации продуцента и дезактивации ферментов. Для этого нагревают культуральную жидкость острым паром до температуры 85 ± 5 °С и выдерживают при этой температуре не менее 15 минут. Поскольку культуральная жидкость лучше фильтруется в горячем виде, её без охлаждения направляют на пресс-фильтры, где происходит отделение мицелия от нативного раствора. Мицелий представляет собой трудно

фильтруемый слизистый осадок, поэтому для его фильтрации применяют сжатый до 3–6 МПа азот.

Мицелий промывают водой и тщательно отжимают сжатым азотом до минимального содержания влаги. Применение сжатого азота или другого инертного газа предотвращает процессы окисления  $\beta$ -каротина кислородом воздуха.

*Сушка и размол биомассы.* Сушку биомассы осуществляют в вакуум-барабанной сушке с ворошителем при температуре  $85 \pm 5$  °С и давлении 0,02–0,01 МПа до содержания остаточной влаги не более 7 %.

Для получения однородного порошка высушенную биомассу перемалывают в мельницах растирающего типа и просеивают через стандартное сито. Дальнейшая переработка сухой биомассы зависит от вида выпускаемой каротинсодержащей продукции.

Кормовой препарат микробиологического каротина представляет собой мелкопластинчатую массу или сыпучий порошок, от оранжево-красного до красно-коричневого цвета, содержащий не менее 1 %  $\beta$ -каротина и не более 7 % влаги. Высушенную, растертую и просеянную биомассу без дополнительной обработки фасуют в полиэтиленовые мешки или барабаны и отправляют потребителю.

*Каротин в масле.* В эмалированный аппарат-экстрактор помещают сухую тонко измельченную биомассу и  $\beta$ -каротина экстрагируют подсолнечным маслом или слабой мисцеллой, образующейся после промывки биомассы на фильтр-прессе. Для интенсификации процесса экстракции применяют роторно-пульсационный генератор.

После экстракции суспензию сжатым азотом подают на фильтр-пресс, где отделяют масляный экстракт от шрота, при этом получают концентрированную мисцеллу, содержащую до 1 %  $\beta$ -каротина. Шрот на фильтре промывают подсолнечным маслом, тщательно отжимают сжатым азотом и полученную при этом слабую мисцеллу используют для экстракции свежих порций  $\beta$ -каротина.

Масляный экстракт (концентрированную мисцеллу) промывают этиловым спиртом, при этом извлекаются органические примеси, придающие экстракту горький привкус. Спирт отделяется от экстракта в делительной воронке и направляется на регенерацию, а экстракт для удаления остатков спирта и летучих примесей выдерживается в вакууме при температуре  $35 \pm 5$  °С и фильтруется для отделения возможного хлопьевидного осадка.

Готовый продукт (каротин в масле) представляет собой пищевое подсолнечное масло, содержащее 2–2,2 г/кг  $\beta$ -каротина. Его фасуют в жестяные банки по 7 кг или в алюминиевые фляги по 50 кг и направляют на предприятия пищевой промышленности для целевого назначения в качестве пищевой добавки в различные продукты питания (маргарин, сливочные масла различных сортов, хлебопекарская и кондитерская продукция и т.п.).

*Кристаллический  $\beta$ -каротин.* В основе получения кристаллического продукта также используются процессы экстракции  $\beta$ -каротина из биомассы продуцента. Раньше экстракцию осуществляли подсолнечным или другими растительными маслами и, после соответствующей обработки экстракта, кристаллический  $\beta$ -каротин выделяли путем длительного процесса кристаллизации. При этом выход целевого продукта был невысок и, хотя маточные растворы использовались для получения другого продукта (каротина в масле), потери этого ценного витамина были велики.

Современная технология производства кристаллического  $\beta$ -каротина основана на использовании в качестве экстрагента фреона. Этот растворитель весьма избирательно и полно экстрагирует  $\beta$ -каротин из сухой биомассы, а затем легко удаляется из экстракта, образуя пересыщенные растворы  $\beta$ -каротина в смеси липидов, из которых он кристаллизуется с минимальными потерями. Для удаления органических примесей используется обработка спиртом кубового остатка после отгонки хладона и, чтобы избежать выделение примесей, кристаллизацию ведут при температуре  $15 \pm 5$  °С.

Кристаллический  $\beta$ -каротин представляет собой довольно крупные оранжево-красные с фиолетовым отливом кристаллы, температура плавления которых составляет 181–182 °С.

Готовый продукт фасуют в плотно закрытые стеклянные банки темного цвета, обернутые черной бумагой для защиты светочувствительного  $\beta$ -каротина.

Потребителями кристаллического  $\beta$ -каротина является пищевая промышленность, где он применяется в тех же целях, что и каротин в масле. Кроме того, этот продукт находит применение в медицине и ветеринарии для производства некоторых лечебно-профилактических и витаминных препаратов.

#### 4.5. Производство L-аскорбиновой кислоты (витамин С)

Витамин С относится к широко распространенным в природе витаминам. Наиболее важными его источниками для человека служат продукты растительного происхождения: овощи и фрукты. Много витамина С находится в перце, салате, капусте, хрене, рябине, черной смородине и особенно в цитрусовых. Из непищевых источников богаты витамином С шиповник, хвоя и др. Витамин С предохраняет человека от развития цинги. У человека при недостатке витамина С отмечается похудание, общая слабость, одышка, боли в сердце, сердцебиение.

Синтез аскорбиновой кислоты (витамина С) является многоступенчатым процессом, в котором только одна стадия представлена биотрансформацией. Эта стадия трансформации D-сорбита в L-сорбозу при участии ацетатных бактерий. Для получения L-сорбозы используют глубинную ферментацию, когда культуру продуцента *Gluconobacter oxydans* выращивают в ферментерах периодического режима с мешалкой и барботером (для усиления аэрации) и культивировании продуцента в течение 20–40 часов с результатом по выходу L-сорбозы до 98 % исходного количества сорбита в среде. Обычно для достижения такого высокого выхода целевого продукта в питательную среду вносят кукурузный или дрожжевой экстракт в количестве около 20 %. По окончании ферментации L-сорбозу выделяют из культуральной жидкости. Переход от периодического культивирования продуцента *Gluconobacter oxydans* к непрерывному в аппарате колонночного типа увеличивает скорость образования L-сорбозы в 1,7 раза. Ферментацию *Gluconobacter oxydans* проводят на средах содержащих D-сорбит в количестве 20 % при интенсивной аэрации 8–10 литров кислорода в час. Выход L-сорбозы может достичь 98 % за 1–2 суток. При достижении культурой log-фазы можно дополнительно внести в среду D-сорбит до концентрации 25 %.

В настоящее время широкое использование биотехнологических процессов позволяет совершенствовать синтез витамина С, путем сокращения многоэтапных и дорогостоящих химических стадий. Например,

синтез аскорбиновой кислоты осуществляется енолизацией его *важнейшего промежуточного продукта* – 2-кетогулоновой кислоты (2-KLG), которая в кислых условиях превращается в L-аскорбиновую кислоту. Ее, 2-KLG, получают методом двухстадийного микробиологического синтеза, состоящего из окисления D-глюкозы в 2,5-дикетоглюконовую кислоту (2,5-DKG – редуктаза) под действием *Acetobacter*, *Gluconobacter* или мутантного штамма *Erwinia punctata* и биотрансформации последней под действием *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, синтезирующих фермент 2,5-DKG в 2-кетогулоновую кислоту. При использовании этих микроорганизмов выход целевого продукта составляет около 90 % от исходного количества глюкозы. Предлагаемый метод постоянно совершенствуется за счет совместного культивирования указанных микроорганизмов. Так, например, предложен способ, в котором первоначально штаммы культивировали отдельно на среде следующего состава: D-сорбита – 2,0 %, дрожжевой экстракт – 0,3 %, говяжий экстракт – 0,3 %, кукурузный экстракт – 0,3 %, пептон – 1,0 %, мочевины – 0,1 %,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,1 %,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,02 %,  $\text{CaCO}_3$  – 0,1 %; pH среды до стерилизации 7,0–7,2. Питательную среду стерилизуют при 121 °C в течение 20 минут. Культивирование проводят в течение 24 часов при постоянном перемешивании при 220 об/мин и температуре 30 °C. Полученные культуры вносили в ферментер в количестве 10 % (равные объемы). Состав среды для основного процесса ферментации: D-сорбита – 8,0 %, кукурузный экстракт – 1,0 %, мочевины – 1,5 %,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,1 %,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,01 %,  $\text{CaCO}_3$  – 0,6 %, пеногаситель – 0,1 %; pH среды до стерилизации 7,0. Питательную среду стерилизовали при 121 °C в течение 20 минут, культивирование проводили при 30 °C и постоянном перемешивании при 180–700 об/мин в течение 96 часов (аэрация до 1 л/мин). В процессе культивирования значение pH поддерживается на постоянном уровне (6,5–7,0) с помощью  $4\text{HNa}_2\text{CO}_3$ . Культивирование проводят под контролем накопления 2-кетогулоновой кислоты, которую определяли методом ВЭЖХ. Выход 2-KLG составлял 76,8 % от используемого количества D-сорбита.



Одним из перспективных направлений может являться создание одного микроорганизма, синтезирующего все ферменты необходимые для превращения D-глюкозы в 2,5-DKG. *Erwinia herbicola* осуществляет превращение D-глюкозы в 2,5-DKG в несколько стадий, катализируемых разными ферментами. Для превращения 2,5-DKG в 2-KLG необходима только одна стадия. Следовательно, наиболее простой способ создания одного микроорганизма, способного превращать D-глюкозу в 2-KLG, состоит в выделении гена 2,5-DKG-редуктазы *Corynebacterium sp.* и введении его в *Erwinia herbicola*. При помощи генетических манипуляций метаболические реакции, протекающие в столь разных микроорганизмах, удалось осуществить в одном из них. Этот гибрид приобрел способность синтезировать конечный продукт комбинированного метаболического пути. Такой организм можно использовать как фабрику для производства 2-KLG, заменяющую первые три стадии в процессе получения L-аскорбиновой кислоты, который используется в настоящее время.

На рис. 15 представлен промышленный синтез L-аскорбиновой кислоты. Одна из стадий процесса, а именно превращение D-сорбитола в L-сорбозу, осуществляется при участии бактерии *Acetobacter suboxydans*, которая синтезирует фермент сорбитолдегидрогеназу. Остальные стадии представляют собой чисто химические реакции.

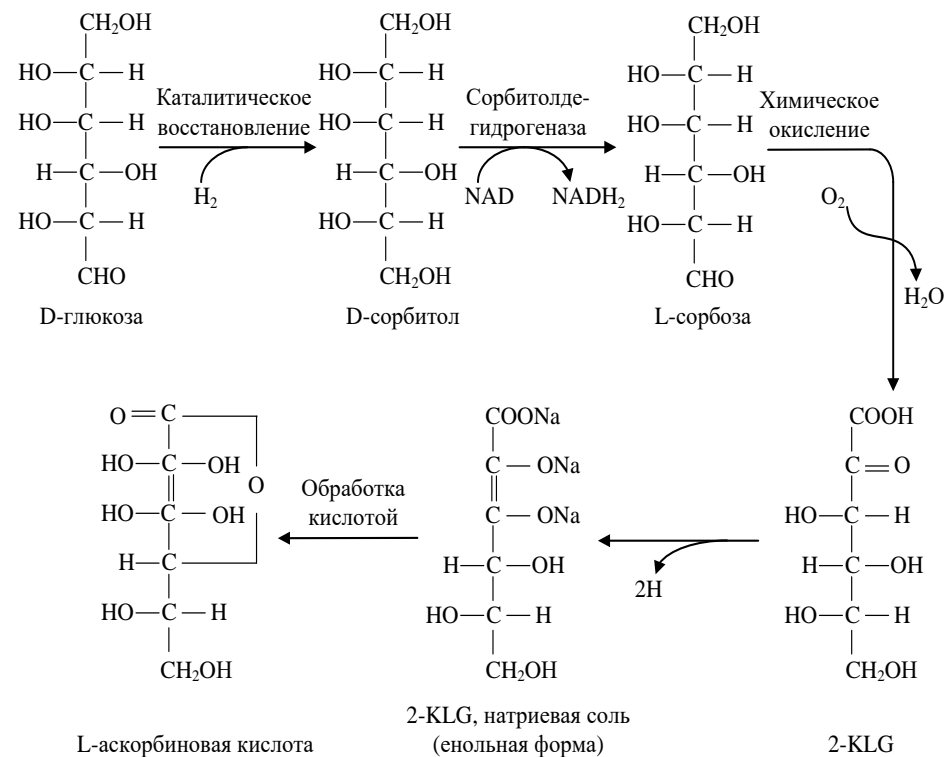


Рисунок 15 – Промышленный синтез L-аскорбиновой кислоты

#### 4.6. Получение никотиновой кислоты (витамин PP)

Одним из наиболее распространенных биотехнологических способов получения коферментной формы никотиновой кислоты – никотинамидаденинуклеотида (НАД) является экстракция его из микроорганизмов, как правило, пекарских дрожжей. Для повышения НАД в дрожжевых клетках культивирование проводят на средах с предшественником синтеза никотиновой кислоты. Так, при добавлении в культуральную среду аденина или самой никотиновой кислоты получают до 12 мг НАД на 1 грамм клеток. Использование мутантных штаммов *Brevibacterium ammoniagenes* с одно-

временным изменением проницаемости мембран клеток микроорганизмов (коферменты через мембраны не проникают) с помощью поверхностно-активных соединений (цетилсульфата натрия) позволяет получать НАД до 6 г/л.

#### 4.7. Витамины в составе лекарственных препаратов

Субстанции витаминов широко используются в составе многих лекарственных препаратов. В качестве примера можно привести данные о том, что в Украине зарегистрировано более 200 лекарственных препаратов, в состав которых входят витамины. Препараты выпускают в нескольких формах: для инъекций, таблетки, капсулы, кремы, аэрозоли и др. Кроме лекарственных препаратов, на рынке представлены средства для косметики и биологически активные добавки, содержащие широкий спектр витаминов. Ряд фармацевтических предприятий специализируются на выпуске данных видов продукции, например, фирма «Unipharm» выпускает серию препаратов «Витрум», содержащих различные витамины. В Украине зарегистрировано более 20 препаратов данной серии. Препараты, содержащие витамины выпускают в виде: монопрепаратов (содержат один витамин, например, инъекционные формы аскорбиновой кислоты в виде 5 % или 10 % растворов; рибофлавин в виде 1 % раствора; пиридоксина в виде 1 %, 2,5 %, 5 % растворов и др.), комплексных препаратов, содержащих 2 и более витаминов.

Приводим *состав некоторых комплексных препаратов витаминов:*

🌈 «Витрум» – состав на одну мягкую желатиновую капсулу: β-каротин (1700 МЕ), α-токоферол (10 МЕ), колекальциферол (67 МЕ), аскорбиновая кислота (40 мг), тиамин (2 мг), рибофлавин (2 мг), пантотеновая кислота (10 мг), пиридоксин (5 мг), фолиевая кислота (133 мкг), цианокобаламин (4 мкг), никотинамид (10 мг), биотин (133 мкг), холин (50 мг).

🌈 «Витакап» – состав на одну мягкую желатиновую капсулу: α-токоферол (15 МЕ), колекальциферол (400 МЕ), аскорбиновая кислота (75 мг), тиамин (5 мг), рибофлавин (5 мг), пиридоксин (2 мг), фолиевая кислота (1000 мкг), цианокобаламин (5 мкг), никотинамид (45 мг), ретинол (5000 МЕ).

✓ *Рибофлавин* (витамин В<sub>2</sub>) – катализатор процессов клеточного дыхания и зрительной рецепции, играет важную роль в образовании ДНК, стимулирует процессы регенерации тканей;

✓ *Пиридоксин* (витамин В<sub>6</sub>) – в качестве кофермента принимает участие в метаболизме аминокислот и белков в синтезе нейропептидов;

✓ *Цианокобаламин* (витамин В<sub>12</sub>) и *фолиевая кислота* принимают участие в синтезе нуклеотидов, в процессе эритропоэза необходимы для функционирования нервной ткани и для роста организма;

✓ *Никотинамид* принимает участие в процессах тканевого дыхания, липидного и углеводного обмена;

✓ *Аскорбиновая кислота* (витамин С) – играет важную роль в регуляции окислительно-восстановительных процессов, обеспечивает синтез коллагена, принимает участие в синтезе стероидных гормонов и катехоламинов, нормализует проницаемость капилляров, принимает участие в синтезе гемоглобина, повышает неспецифическую резистентность, обладает антидотными свойствами, оказывает влияние на обмен аминокислот ароматического ряда, метаболизм тироксина, биосинтез инсулина;

✓ *Альфа-токоферол* (витамин Е) – обладает антиоксидантными свойствами, обеспечивает защиту ненасыщенных жирных кислот в мембранах клеток, снижает агрегацию тромбоцитов, угнетает синтез простагландина Е<sub>2</sub>, усиливает иммунные реакции, в том числе у пожилых людей;

✓ *Ретинол* (витамин А) – незаменим для роста и репродукции, регенерации, для процессов роста и формирования костей (профилактика рахита), нормального функционирования органов зрения. В сетчатке ретинол подвергается трансформации в цис-ретинол альдегид, который в реакции с опсином формирует фотопигмент родопсин – жизненно важное соединение для адаптации глаза в сумеречном зрении, повышает резистентность организма к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды.

✓ *Колекальциферол* (витамин D<sub>3</sub>) – регулирует обмен кальция и фосфора в организме;

✓ *Пантотенат кальция* (витамин В<sub>5</sub>) – стимулирует образование кортикостероидов. Как составная часть кофермента А, обеспечивающего процессы ацетилирования, участвует в углеводном и жировом обмене,

синтезе ацетилхолина. Оптимизирует энергетическое обеспечение сократительной функции миокарда, улучшает процессы регенерации.

Требования к качеству препаратов витаминов изложены в Государственной Фармакопее Украины и Европейской фармакопеи.

Для количественного определения ряда витаминов:  $\alpha$ -токоферол (витамин E), ретинол (витамин A), колекальциферол (витамин D<sub>3</sub>) и др. введено понятие международной единицы (МЕ). При определении количества выделенного витамина обычно в качестве эталона используют химически чистый препарат с заранее известной величиной концентрации. МЕ – это активность определенного весового количества витамина, принятого за эталон. Ряд витаминов в препарате указывают в весовом количестве (мг): аскорбиновая кислота – витамин С, рибофлавин – витамин В<sub>2</sub>, тиамин – витамин В<sub>1</sub> и др.

Для определения содержания витаминов в лекарственных формах используют методы:

- ретинол (витамин А) – спектрофотометрически при длине волны 325 нм или при длине волны 620 нм (цветная реакция с хлоридом сурьмы);
- тиамин (витамин В<sub>1</sub>) – флуориметрически при длине волны 436 нм;
- рибофлавин (витамин В<sub>2</sub>) – флуориметрически при длине волны 440 нм;
- пиридоксин гидрохлорида (витамин В<sub>6</sub>) – спектрофотометрически при длине волны 600 нм (цветная реакция);
- цианокобаламин (витамин В<sub>12</sub>) – используют микробиологический метод, например, с *E. coli* 113-3 в качестве тест-микроорганизма (определяют диаметры зон стимуляции роста тест-микроорганизма исследуемым препаратом и стандартным образцом);
- кислота никотиновая (витамин РР) – спектрофотометрически при длине волны 440 нм (по цветной реакции);
- кислота аскорбиновая (витамин С) – титрометрически;
- $\alpha$ -токоферол ацетат (витамин Е) – спектрофотометрически при длине волны 520 нм (цветная реакция).

## Заключение

В последние годы современная биотехнология развивалась необычно динамично, особенно в области создания биотехнологических процессов. Развитие биотехнологического производства витаминов определяется рядом причин.

Важнейшим вопросом является создание и селекция новых высокоэффективных штаммов-продуцентов витаминов. Выделенные штаммы-продуценты витаминов часто переменчивы и нестабильны. Поэтому методом селекции отбирают наиболее перспективные штаммы, а затем проводят отбор индуцированных мутантов. Мутантное действие на микроорганизмы достигается применением различных источников (УФ-лучи, рентгеновские лучи, химические вещества и др.). Весьма перспективным является получение новых витаминов путем создания генно-инженерных продуктов, в частности, рекомбинантных штаммов-продуцентов. Большой эффект может дать технология рекомбинантных ДНК. При помощи генетических манипуляций метаболические реакции, протекающие в разных микроорганизмах можно осуществить в одном из них. Примером такого генно-инженерного штамма может быть полученный штамм-продуцент, синтезируемый L-аскорбиновую кислоту. Этот гибрид приобрел способность синтезировать конечный продукт комбинированного метаболического пути.

Усиление продукции пантотената (витамин В<sub>5</sub>) основано на использовании рекомбинантных микроорганизмов характеризующихся высокой ферментативной активностью и обеспечивающих получение пантотената с высоким выходом.

Постоянно проводятся исследования по поиску альтернативных источников биотехнологического получения витаминов. Так, например, установлено, что микроводоросли *Chlamydomonas* способны синтезировать тиамин (витамин В<sub>1</sub>) в количестве 71–90 мг/кг биомассы водорослей по сухому весу, что позволяет считать водоросли альтернативным источником получения тиамина. Установлено, что штамм *Saccharomyces oviformis* Y-2635, выращенный на среде с использованием геотермальной воды от-

личается повышенной внутриклеточной концентрацией водорастворимых витаминов группы В. В ряде случаев для получения витаминов проводят обработку культуры микроорганизмов определенными агентами. Так, например, культура *Bacillus natto* была обработана расчетным количеством хитозана, отфильтрована, сконцентрирована и высушена. Культивирование проводится в аэробных условиях при 32–34 °С в течение 72–96 часов. Получен витамин К<sub>2</sub> в количестве 2 мкг/г сухой массы продуцента.

Необходимо остановиться на трансгенных растениях, продуцирующих в качестве вторичных метаболитов витамины. Растения, трансформированные химерным геном, кодирующим фермент биосинтеза витамина Е также является перспективным альтернативным источником получения  $\alpha$ -токоферола.

Развитию производства витаминов также способствуют достижения в создании оригинальных технологических схем с использованием высокотехнологического оборудования. За последние годы предложены биотехнологические установки для производства субстанций витаминов. Так, например, в Европе на разработке таких установках специализируется фирма «Uhde» (Германия). Первоначальное компьютерное моделирование планируемой установки позволяет определить узкие места технологии и упростить расчет реакторов и емкостей. Имитационная модель описывает культивирование клеток с их последующим сбором и переработкой, а также отображают такие функциональные шаги, как подготовка систем CIP/SIP, приготовление вспомогательных и питательных сред, промежуточных продуктов, деактивирования и утилизации. Предложены оптимальные схемы концентрации и очистки полупродуктов, позволяющие получать витамины высокой степени чистоты.

Необходимо становиться еще на одном направлении: создании оригинальных лекарственных препаратов, содержащих витамины, что подразумевает создание как продуктов с новым составом, так и препаратов на основе различных форм, например, наночастиц. Весьма перспективной является липосомальная форма витаминов, открывающая значительные возможности для более эффективного воздействия витаминов на организм че-

ловека. Сегодня известные липосомы, содержащие как водорастворимые (витамин С и группа витаминов В), так и жирорастворимые (витамины А и Е) витамины. Преимуществом липосомальной формы является их легкое проникновение в кожу. Липосомы быстро усваиваются, взаимодействуя с фосфолипидами клеточных мембран, обогащая кожу липидами и высвобождая витамины, например, ретинол,  $\alpha$ -токоферол, коэнзим Q<sub>10</sub>. Указанные вещества в липосомах проникают в кожу на такую глубину, на которую они сами продиффундировать не способны. Например, витамин А способствует обновлению рогового слоя, тем самым активируя регенеративные процессы в клетках. Витамин С в липосомах полностью сохраняет свою активность и хорошо проникает в кожу, стимулирует синтез коллагена, восстанавливает липидный барьер кожи, предотвращает старение кожи. Кроме того, при попадании в организм липосомальные лекарственные формы витаминов обладают выраженным пролонгированным действием по сравнению со свободными формами витаминов. Липосомы, содержащие витамины сливаются с наружной мембраной клеточной стенки и проникают во внутрь. По нашему мнению, в ряде случаев, липосомальная форма витаминов позволит расширить их применение в клинике.

Таким образом, развитие биотехнологических исследований, создание новых штаммов продуцентов витаминов, включая рекомбинантные, разработка технологических схем и производство высокоэффективного оборудования, расширяет номенклатуру лекарственных форм и состав препаратов и даёт возможность увеличения выпуска субстанций витаминов и их готовых лекарственных форм.

### **Контрольные вопросы**

1. По каким критериям классифицируют витамины?
2. Какие методы получения витаминов Вам известны?
3. Почему получение витаминов биотехнологическими методами экономически целесообразно?
4. Назовите штаммы бактерий продуцентов витаминов: аскорбиновой кислоты, рибофлавина, цианокобаламина и охарактеризуйте их.
5. Укажите роль штаммов пробиотиков в синтезе витаминов.
6. Проведите анализ технологии получения витамина В<sub>2</sub> и укажите методы межоперационного контроля.
7. Какие питательные среды используют для культивирования штаммов-продуцентов витаминов (цианокобаламина, рибофлавина, аскорбиновой кислоты и др.)?
8. Какими фармакопейными методами проводят определение витаминов в лекарственных препаратах?
9. Какова роль витаминов в жизнедеятельности организма?
10. В каких лекарственных формах производят витаминные препараты для медицины и ветеринарии?
11. Проанализируйте технологическую схему получения витамина D<sub>2</sub> – эргокальциферола.
12. Что означает гетероталлизм и какую роль он играет в получении β-каротина?
13. Опишите технологическую схему получения витамина С – аскорбиновой кислоты.
14. Какими методами проводят очистку и концентрацию витаминов?
15. Укажите основные методы идентификации и контроля препаратов, содержащих витамины.

## **ГЛАВА 5. БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГОРМОНАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

### **5.1. Производство препаратов инсулина**

*Инсулин* – гормон белковой природы, вырабатываемый β-клетками островков Лангерганса поджелудочной железы для поддержания гомеостаза глюкозы в крови. Кодируют этот белок 70 % мРНК, выделенных из этих клеток. Недостаток инсулина в крови вследствие приобретенных или наследуемых факторов приводит к заболеванию сахарным диабетом. Это системное заболевание, неизбежно ведет к ухудшению качества жизни, а без лечения – к смерти.

Известно, что человеческий инсулин представляет собой полипептид с молекулярной массой 5808, состоящий из 51-й аминокислоты, которые образуют две полипептидные цепи, соединенные дисульфидными мостиками. Одна цепь, называемая А содержит 21 аминокислоту, вторая цепь – В содержит 30 аминокислотных остатков. Аминокислотный состав цепей видоспецифичен. Пептидные цепи А и В соединены посредством двух дисульфидных мостиков (-S-S-), которые необходимы для проявления гормональной активности инсулином (их разрушение приводит к потере активности). Предшественник инсулина продуцируется внутри β-клеток посредством ДНК и РНК-управляемого синтеза. Синтезируется инсулин в виде одноцепочечного предшественника – препроинсулина (107 аминокислотных остатков), содержащего концевой сигнальный пептид (23 аминокислотных остатка) и 35-звенный соединительный пептид (С-пептид). При удалении сигнального пептида в клетке образуется проинсулин из 86 аминокислотных остатков, в котором цепи инсулина (А и В) соединены С-пептидом, обеспечивающим им необходимую ориентацию при замыкании дисульфидных связей. Длинная цепь проинсулина в аппарате Гольджи упаковывается в гранулы, где в результате гидролиза удаляются четыре аминокислоты с образованием инсулина и связывающего С-пептида. Инсулин и С-пептид в эквивалентных концентрациях секретируются в ответ на все стимуляторы секреции инсулина (глюкоза, манноза). После протео-

литического отщепления С-пептида образуется инсулин. В гранулах  $\beta$ -клеток инсулин депонируется в виде кристаллов, состоящих из двух атомов цинка и шести молекул инсулина. Цинк, концентрация которого в  $\beta$ -клетках островков Лангерганса достигает высоких значений, формирует комплексы с инсулином. Инсулин всех позвоночных образует димеры с помощью водородных связей между пептидными группами остатков В24 и В26 двух мономеров, которые при высоких концентрациях гормона, в свою очередь, реорганизуются в гексамеры, содержащие по два атома цинка в каждом. Наличие таких высокоупорядоченных комплексов существенно облегчило изучение кристаллической структуры инсулина. При физиологических концентрациях инсулин находится в мономерной форме.

Сахарный диабет по распространенности и тяжести занимает третье место после сердечнососудистых и онкологических заболеваний.

Учитывая тяжесть заболевания диабетом, становится понятным, почему уже более 100 лет проводятся разноплановые исследования по созданию и изучению препаратов инсулина. В связи с этим представляет интерес *история создания лекарственных препаратов инсулина*:

- 1902 г. – русский врач И. М. Соболев установил, что уровень сахара в крови человека регулируется специальным гормоном поджелудочной железы;

- 1921 г. – впервые инсулин был выделен из поджелудочной железы в чистом виде канадскими учеными Бантингом Ф. и Бестом Ч., и применен в Торонто с высоким эффектом для лечения 10-летнего мальчика, больного диабетом;

- 1923 г. – фирмой «Eli Lilly» (США) промышленно получен инсулин из поджелудочных желез крупного рогатого скота и свиней. Инсулин из крупного рогатого скота обладает несколько большей антигенностью для человека по сравнению со свиным инсулином (из 1200 кг поджелудочной железы возможно получить около 100 г кристаллического инсулина). Инсулин из поджелудочной железы крупного рогатого скота отличается тремя аминокислотами от инсулина человека, свиной – одной аминокислотой. Инсулин, выделенный из поджелудочной железы животных, использовали до начала 80-х годов XX века;

- 1935 г. – Хагедорн Г. Х. в Дании оптимизировал действие инсулина в организме, предложив пролонгированный препарат – протамин-цинк-инсулин (вводили один раз в сутки);

- 1952 г. – получен гомогенный кристаллический инсулин, называемый однокомпонентным;

- 1954 г. – английский биохимик Сенджер Г. получил Нобелевскую премию за установление структуры инсулина;

- 1963–1965 г.г. – тремя коллективами исследователей в США, Китае и ФРГ, а в начале 70-х годов советскими учеными осуществлен синтез обеих цепей и их соединение дисульфидными связями для получения инсулина. Данный метод синтеза не нашел промышленной реализации в связи с низким выходом, высокой ценой и сложностью проведения синтеза полипептидного гормона, состоящего из десятков аминокислотных остатков;

- 1980 г – датская компания «Novo» разработала метод превращения инсулина свиньи в инсулин человека путем ферментативного замещения 30-го остатка аланина в цепи В на остаток треонина. В дальнейшем проводили хроматографическую очистку продукта, чистота которого была не ниже 99 %. Оба инсулина не отличались по активности и времени действия.

Только в конце 50-х, начале 60-х годов XX века были выяснены отличия структуры человеческого инсулина от инсулинов животного происхождения, которые вызывали аллергические реакции. Результаты данных исследований легли в основу разработок промышленного получения инсулина человека. В настоящее время *основными способами получения инсулина человека, идентичного человеку, являются полусинтетический и генно-инженерный.*

Возможность создания человеческого инсулина стала реальной только после установления факта, что *биосинтез инсулина в  $\beta$ -клетках островковой ткани* происходит по следующим основным этапам:

- закодированная информация о структуре инсулина содержится в гене инсулина (участок ДНК) 11-й хромосомы;

➤ в результате стимулирующего действия, прежде всего глюкозы и некоторых других веществ, эта информация списывается РНК-полимеразой с инсулинового гена в виде мРНК на рибосомах, в которых осуществляется соединение аминокислот с образованием белков. На рибосомах происходит сборка полипептидной цепи из 109 аминокислот с образованием препроинсулина под влиянием рестриктаз, в результате образуются фрагменты от нескольких сотен до нескольких тысяч нуклеотидов;

➤ при синтезе препроинсулина в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы первые 23 аминокислоты «проводят» молекулу через мембрану клетки. Эти аминокислоты отщепляются рестриктазами и образуется пептид проинсулин, состоящий из 86 аминокислот. Молекула проинсулина сворачивается таким образом, что начальный и конечный её сегменты сближаются, а центральная часть молекулы удаляется под влиянием фермента рестрикции.

Работы по генно-инженерному получению инсулина начались с 1978 года, когда появилось сообщение (США) о получении штамма кишечной палочки, продуцирующего крысиный проинсулин.

В 1978 году были синтезированы отдельные цепи человеческого инсулина посредством экспрессии их синтетических генов в клетках *E. Coli*. Каждый из полученных синтетических генов подстраивался к 3'-концу гена фермента  $\beta$ -галактозидазы и вводился в векторную плазмиду (pBR322). Клетки *E. Coli*, трансформированные такими рекомбинантными плазмидами, производили гибридные (химерные) белки, состоящие из фрагмента  $\beta$ -галактозидазы и А или В пептида инсулина, присоединенного к ней через остаток метионина. При обработке химерного белка бромцианом пептид освобождается. Однако замыкание дисульфидных мостиков между образованными цепями инсулина происходило с трудом.

В 1981 году синтезирован ген-аналог проинсулина – мини С-проинсулин, в котором 35-звенный С-пептид был заменен на сегмент из шести аминокислот: Арг-Арг-Гли-Сер-Лиз-Арг и показана его экспрессия в *E. Coli*.

В 1980 году У. Гилберт с сотрудниками выделили мРНК инсулина из опухоли  $\beta$ -клеток поджелудочной железы крысы и с помощью обратной транскриптазы получили с неё кДНК. Полученную кДНК встроили в плазмиду pBR322 *E. Coli*, в среднюю часть гена пенициллиназы. Рекомбинантная плазида содержала информацию о структуре проинсулина. В результате трансляции мРНК в клетках синтезировался гибридный белок, содержащий последовательности пенициллиназы и проинсулина, который выщепляли из такого белка трипсином.

В 1980 году американскими учеными Миллером и Бакстером был впервые описан процесс клонирования человеческого гена в *E. Coli* с последующей индукцией и получением белка инсулина, идентичного человеческому.

В промышленных условиях рекомбинантный инсулин впервые был получен американской фармацевтической компанией «Eli Lilly» совместно с биотехнологической компанией «Genentech» (США) и продукт был выпущен на рынок в 1982 г. При производстве человеческого инсулина использована технология рекомбинантных ДНК: помещают кДНК гена человеческого проинсулина в *E. Coli* или *S. cerevisiae* и гидролизуют полученный проинсулин до молекулы инсулина.

В это же время компания «Novo-Nordisk» (Дания) разработала технологию получения генно-инженерного инсулина человека, основанную на использовании генетически модифицированных дрожжевых культур в роли суперпродуцентов инсулина человека. Использование эукариот, имеющих сходную с человеческой систему процессинга белков в роли продуцентов инсулина, позволило получить гормон или его предшественник в нативной форме. Значительным преимуществом данной технологии является полное отсутствие в препаратах бактериальных токсинов и пирогенов клеточной стенки. Несмотря на все эти преимущества, получение инсулина с использованием бактериальных штаммов суперпродуцентов остается более предпочтительным благодаря более высокому уровню экспрессии инсулина в составе гибридного белка.

В настоящее время генно-инженерный инсулин производят путем ферментации генетически измененных микроорганизмов: кишечной палочки или дрожжей, которые способны синтезировать предшественник инсулина (проинсулин) в составе химерного протеина. Из полученного биосинтетическим путем промежуточного продукта реконструируют инсулин человека (энзиматическим путем) по следующей схеме: культивирование штамма со встроенным геном гибридного белка, включающим полную последовательность инсулина человека; очистка и ренатурация гибридного белка; протеолитическое расщепление гибридного белка с получением инсулина; очистка инсулина. Данная схема во многом напоминает процесс биосинтеза инсулина в островках Лангерганса, где гормон сначала появляется в виде белка-предшественника (проинсулина), а потом протеолитическими ферментами от проинсулина отщепляется соединительный С-пептид. В производстве для расщепления гибридного белка используют сходные по специфичности ферменты: трипсин и карбоксипептидазу В. Гидролиз производят путем обработки ферментами последовательно или одновременно.

Примером получения рекомбинантного инсулина является технология, предложенная российскими учеными из ОАО «Национальные биотехнологии», Института биоорганической химии РАН и Государственного института кровезаменителей и медицинских препаратов. Ими был создан штамм-продуцент гибридного белка *E. Coli* JM109/pPINS07.

На рис. 16 представлена биотехнологическая схема получения рекомбинантного инсулина.



Рисунок 16 – Биотехнологическая схема получения рекомбинантного инсулина



Как видно из приведенной схемы из выращенной биомассы выделяется предшественник инсулина, гибридный белок, экспрессируемый в количестве 40 % от всего клеточного белка, содержащий препроинсулин. Превращение его в инсулин *in vitro* осуществляется в той же последовательности, что и *in vivo* – отщепляется липидирующий полипептид, препроинсулин превращается в инсулин через стадии окислительного сульфитолиза с последующим восстановительным замыканием трёх дисульфидных связей и ферментативным вычленением связывающего С-пептида. Как видно из схемы, для очистки инсулина используют различные виды хроматографических очисток: ионообменные, гельфильтрационные и ВЭЖХ, что позволяет получить инсулин высокой степенью чистоты. Использование аффинной хроматографии значительно снизило содержание в препарате балластных белков с молекулярной массой большей, чем у инсулина. К этим белкам относится проинсулин и частично расщепленные проинсулины, которые способны индуцировать выработку антиинсулиновых антител. Особую роль играет обращено-фазовая ВЭЖХ. Использование ВЭЖХ является предпочтительным в крупномасштабном производстве, поскольку метод лишен ряда недостатков, присущим другим видам хроматографии (например, ионно-обменную хроматографию отличает длительность очистки за счет низких значений давления; высокая себестоимость метода за счет низкой емкости сорбентов и их высокой стоимости). Определяющими факторами при проведении обращено-фазовой ВЭЖХ являются: рН подвижной фазы, температура, добавки для введения в подвижную фазу, максимальная нагрузка на хроматографическую колонку и др. *Одной из основных проблем в производстве генно-инженерного инсулина человека является очистка инсулина от родственных пептидов*, в частности от А21-дезамидоинсулина, отличающегося от инсулина дезамидированным аспарагином в 21-ом положении А цепи. Содержание инсулиноподобных примесей и А21-дезамидоинсулина в фармакопейных субстанциях инсулина человека жестко регламентируется.

В Российской Федерации вопросами получения генно-инженерного инсулина занимается ряд ученых, в том числе, и специалисты ОАО «Национальные биотехнологии». Ими предложена промышленная схема получения препарата инсулина человека на основе штамма *E. Coli*

JM109/pHINS11. По мнению авторов, использование предложенного ими штамма имеет ряд преимуществ перед штаммом *E. Coli* JM109/pPINS07, который рассматривался нами ранее. Так, согласно рис. 16 видно, что при использовании штамма *E. Coli* JM109/pPINS07 получение рекомбинантного инсулина сводится к следующему: культивирование штамма-продуцента *E. Coli* JM109/pPINS07, разрушение бактериальных клеток дезинтеграцией, отделение телец включения, содержащих гибридный белок, их растворение в буфере, содержащем мочевины и дитиотреитол, кислотное осаждение примесных соединений, очистку гибридного белка хроматографией на КМ-сефарозе, расщепление гибридного белка трипсином и карбоксипептидазой В осуществляют последовательно, при этом продукты трипсинолиза хроматографируют на СП-сефарозе, а полученную после расщепления карбоксипептидазой В фракцию инсулина очищают методом обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) с последующей гель-фильтрацией. В данном методе, по мнению авторов, присутствует многостадийная технологическая цепочка. Кроме того, последовательное расщепление гибридного белка трипсином и карбоксипептидазой В требует и последовательных хроматографических очисток диаргинин-инсулина после триптического гидролиза гибридного белка и инсулина после расщепления карбоксипептидазой В, которые приводят к значительным потерям конечного продукта. Необходимо также отметить, что использован штамм-продуцент *E. Coli* JM109/pPINS07, несущий рекомбинантную плазмиду pPINS07, которая кодирует гибридный белок с высокой долей лидерного пептида, составляющего около 50 %. Поэтому использование данного штамма при получении инсулина удорожает процесс производства из-за повышения затрат на биосинтез и снижает выход целевого продукта.

*Преимуществом созданной плазмиды pHINS11* является то, что она обеспечивает более высокий выход конечного продукта инсулина за счет повышения выхода правильно свернутого гибридного белка после его ренатурации.

Полученный *штамм-продуцент E. Coli JM109/pHINS11* характеризуется *следующими признаками*:

1. *Морфологические признаки*: клетки мелкие, палочковидной формы, грамтрицательные, неспороносные, размером 1 x 3,5 мкм, подвижные с хорошо различимыми тельцами включения после индукции синтеза гибридного белка;

2. *Культуральные признаки*: при росте на агаризованной среде LB колонии круглые, гладкие, полупрозрачные, блестящие серые. Край ровный, диаметр колоний 1–3 мм, консистенция пастообразная. Рост в жидких средах характеризуется ровным помутнением.

3. *Физиолого-биохимические признаки*: клетки растут при температуре 4–42 °С, оптимум pH 6,8–7,6. В качестве источника азота используют как минеральные соли аммония, так и органические соединения: аминокислоты, пептон, триптон, дрожжевой экстракт. В качестве источника углерода при росте на минимальной среде используют глицерин, углеводы, аминокислоты;

4. *Устойчивость к антибиотикам*: клетки штамма продуцента проявляют устойчивость к ампициллину (до 500 мкг/мл), обусловленную наличием в плазмиде гена β-лактамазы (bla);

5. *Стабильность плазмиды в штамме*: при поддержании клеток в течение нескольких месяцев на агаризованной среде LB, содержащей ампициллин, не наблюдается потери или перестройки плазмиды, влияющей на экспрессию гибридного белка;

В конструированном штамме гибридный белок после индуцированной экспрессии накапливается в виде телец включения и его содержание составляет не менее 30 % от общего белка клетки.

Рассмотрим *технологическую схему получения генно-инженерного инсулина при использовании штамма-продуцента E. Coli JM109/pHINS11*.

#### 1. *Конструирование плазмиды pHINS11*.

а) Плазмиду pHINS11 конструируют на основе известной плазмиды pHINS05. Плазмидную ДНК pHINS05 подвергают исчерпывающему гидролизу рестриктазами *BeII* и *BamHI*. Для этого 5 мкг плазмидной ДНК pHINS05 в 20 мкл буфера, содержащего 33мМ трис-ацетата, pH = 7,9; 66 мМ К-ацетата, 10 мМ Mg-ацетата, 0,1 мг/мл БСА и 10 ед. рестриктазы *BeII* и *BamHI* инкубируют 1 час при температуре 37 °С. Из полученного гидролизата выделяют *BeII-BamHI* фрагмент ДНК размером около

4,2 т.п.о. при помощи электрофореза в 0,8 % геле легкоплавкой агарозы. Далее ДНК депротейнизируют фенолом, смесью фенола с хлороформом (1 : 1), хлороформом, и осаждают этиловым спиртом, растворяют в 20 мкл воды. Полученный *BeII-BamHI* фрагмент, содержащий ген гибридного белка и векторную плазмиду pYINS05, лигируют с 20-кратным молярным избытком олигонуклеотидного дуплекса, полученного в результате отжига синтетических нуклеотидов oligo-link24A (SEQ ID NO:4) и oligo-link24B (SEQ ID NO:5).

б) Компетентные клетки штамма *E. Coli JM109* трансформируют лигированной смесью (10 мкл) и высевают на LB-агар, содержащий 100 мкг/мл ампициллина. Из выросших колоний выделяют плазмидную ДНК и секвенируют между сайтами рестриктаз *EcoRI* и *BamHI* для подтверждения вставки в линкерную часть гена гибридного белка. В результате получают плазмиду pHINS09.

с) Для получения плазмиды с делецией по *hor*-гену (негативного регулятора копийности) к 5 мкг плазмидной ДНК pHINS09 в 20 мкл буфера добавляют 10 ед. рестриктазы *Eco47III* и *SnaI*, генерирующие «тупые» концы, и смесь инкубируют в течение 1 часа при 37 °С. Далее ДНК депротейнизируют фенолом, смесью фенола с хлороформом (1 : 1), хлороформом, осаждают этиловым спиртом, растворяют в 20 мкл воды. Полученную таким образом ДНК лигируют в 30 мкл буфера для лигирования в присутствии 5 ед. ДНК лигазы фага T4 в течение 16 часов при 8 °С. Лигированной смесью (10 мкл) трансформируют компетентные клетки штамма *E. Coli JM109* и высевают на LB-агар, содержащий 100 мкг/мл ампициллина. Отбирают бактериальные клоны, несущие плазмидную ДНК размером 3,6 т.п.о. Выделенные плазмиды подвергают рестрикционному анализу и секвенируют по методу Сенгера. В результате получают плазмиду pHINS11.

д) Плазмидой pHINS11 трансформируют компетентные клетки штамма *E. Coli JM109* и высевают на LB-агар, содержащий 100 мкг/мл ампициллина. Отдельно локализованную колонию трижды пересевают на чашки с LB-агаром, содержащим 100 мкг/мл ампициллина. Полученной моноклоновой культурой инокулируют 5 мл жидкой среды LB с ампицил-

лином и инкубируют в течение ночи при интенсивном встряхивании при 37 °С.

Полученный штамм-продуцент *E. Coli* JM109/pHINS11 хранят в 20 % глицерине при минус 40 °С.

## 2. Выращивание биомассы штамма-продуцента *E. Coli* JM109/pHINS11.

Культивирование клеток штамма *E. Coli* JM109/pHINS11 для получения инокулята и основного выращивания проводят на питательной среде следующего состава (г/л): гидролизат казеина соляно-кислотный – 30; экстракт пекарских дрожжей – 14; двузамещенный фосфат калия трехводный – 6; однозамещенный фосфат калия – 3; сульфат магния – 0,5; глюкоза – до 50; ампициллина натриевая соль – 0,05; вода очищенная до 1 л. Посевные культуры готовят в количестве 1/10 от объема засеваемой питательной среды и выращивают до оптической плотности 7–8 единиц при длине волны 540 нм, длина оптического пути 10 мм, рН культивирования 6,9 ± 0,2 (корректировку проводят добавлением глюкозы и щелочи), длительность 4–6 часов; рО<sub>2</sub> – 40 ± 15 %.

Выращивание основной культуры проводят в ферментере емкостью 150 л с 90 литрами питательной среды. Объем инокулята – 10 л. Культивирование проводят при следующим параметрах: температура 36,5 ± 0,5 °С; рН 6,7–7,1; рО<sub>2</sub> – 40 ± 15 %. Для индукции биосинтеза гибридного белка в середине логарифмической фазы роста культуры при оптической плотности 7–9 единиц вносят индуктор – 1-изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид. Культивирование продолжают до образования внутриклеточных включений гибридного белка («телец включения» – ТВ) у 90–95 % клеток. Экспресс-контроль процесса накопления ТВ осуществляют с помощью фазово-контрастной микроскопии препаратов.

## 3. Выделение телец включения.

Рост культуры в ферментере останавливают путем резкого сокращения интенсивности перемешивания, культуру охлаждают до 10–14 °С и концентрируют на сепараторе в 8–10 раз. В полученную суспензию добавляют трис-основной до концентрации 0,1 М, мочевины – до 1,5 М, ЭДТА – до 1 мМ. Забуференную до рН 6,8–7,0 суспензию трижды пропускают через гомогенизатор при давлении 700–800 атм и температуре 15–20 °С. Го-

могенат клеток пропускают через проточную центрифугу (g = 18000). Основная масса телец включения (не менее 90 %) осаждается в роторе центрифуги. Влажный осадок телец включения (2,6 кг) выгружают из ротора центрифуги, замораживают и хранят при минус 40 °С. Потери гибридного белка при выделении телец включения не превышают 15 %.

## 4. Растворение телец включения, содержащих гибридный белок, и ренатурация гибридного белка.

В реактор объемом 30 л, заполненный 18 л буферного раствора, содержащего 0,1 М трис-НСl, рН 8,0 и 8 М мочевины, загружают 1,8 кг пасты телец включения и включают перемешивающее устройство. После растворения телец включения в реактор добавляют дитиотреитол до конечной концентрации 10 мМ и продолжают перемешивание в течение 10–12 ч при 15 °С. Количество гибридного белка в растворе составляло 174 г.

В реактор с охлаждением объемом 250 л заливают 160 л глицин-NaOH буфера, рН 9–11 и охлаждают его до температуры 10–14 °С. После охлаждения буферного раствора в реактор подают раствор гибридного белка с восстановленными дисульфидными связями. В течение 20–24 ч инкубируют раствор гибридного белка, перемешивая и поддерживая температуру в реакторе 10–14 °С. После ренатурации гибридного белка с образованием правильно замкнутых S-S связей (контроль ОФ ВЭЖХ) проводят кислотное осаждение примесных белков путем подкисления реакционной среды в реакторе до рН 4,0–4,5 раствором соляной кислоты. Останавливают перемешивание и через 4–5 ч супернатант осветляют на микрофльтрационной установке. Содержание ренатурированного гибридного белка в осветленном супернатанте составляет 85 г.

## 5. Очистка ренатурированного гибридного белка на КМ-сефарозе.

Правильно свернутый гибридный белок сорбируют из фильтрата на ионно-обменную колонку объемом 5 л, заполненную КМ-сефарозой, предварительно уравновешенную 0,05 М Na-ацетатным буфером, рН 4,0–5,5. Сорбированный белок элюируют с колонки градиентом 0,1–0,6 М хлоридом натрия в 0,05 М Na-ацетатном буфере, рН 4,0–5,5, содержащем 1,5 М мочевины. Фракции, содержащие гибридный белок с чистотой не менее 95 % (контроль методом ОФ ВЭЖХ), объединяют и используют для даль-

нейшей работы. В результате получают 63 г ренатурированного гибридного белка с чистотой не ниже 90 %.

6. *Совместный гидролиз гибридного белка трипсином и карбоксипептидазой В и очистка инсулина на СП-сефарозе.*

Расщепление гибридного белка трипсином и карбоксипептидазой В проводят в реакторе из нержавеющей стали с охлаждением объемом 30 л, снабженным перемешивающим устройством. В реактор вносят 13 л раствора гибридного белка, раствор охлаждают до 4–8 °С и доводят значение рН раствора до 7,2–7,3 добавлением 1 М раствора трис-основного. Затем в реактор вносят раствор трипсина и карбоксипептидазы В в массовом соотношении: гибридный белок : трипсин : карбоксипептидаза В – 2000 : 1 : 1,25. Реакцию гидролиза проводят в течение 10–12 часов, контролируя методом ОФ ВЭЖХ накопление инсулина в гидролизате. Реакцию расщепления останавливают, подкисляя гидролизат до рН 3,2–3,6 10 % -ным раствором соляной кислоты. В реактор добавляют хлористый калий до концентрации 40 мМ. Полученный раствор наносят на хроматографическую колонку объемом 5 л, заполненную СП-сефарозой, предварительно уравновешенную буфером: 2 М мочевины, 0,1 М аммоний ацетат, рН – 3,6. Промывку колонки проводят тем же буфером. Элюцию сорбированного инсулина проводят линейным градиентом хлористого калия от 0 до 0,5 М в уравновешивающем буфере. Объединяют фракции, содержащие 13,2 г инсулина с чистотой не менее 95 % (контроль методом ОФ ВЭЖХ).

7. *Получение высокоочищенного инсулина методом препаративной обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией.*

В подготовленную колонку при помощи насоса для подачи пробы из емкости подают раствор инсулина с предыдущей стадии очистки в количестве 13,2 г белка. Регистрацию процесса разделения ведут при 220 нм на проточном спектрофотометре. Собранные фракции основного пика инсулина анализируются на содержание примесей методом ОФ ВЭЖХ.

После очистки получают 11,4 г высокоочищенного инсулина человека с содержанием основного вещества 98 %.

За последнее время рядом исследователей установлено, что *молекулы инсулина, хроматографическая очистка которых проходит при низких*

*значениях рН, подвергаются агрегации*, что ухудшает качество продукта. Инсулин образует фибриллы при концентрации свыше 5 г/л в водных растворах, причем показано, что средняя молекулярная агрегатов может варьировать от 10 до 200 кДа. Вид агрегации зависит от рН, температуры ионной силы и природы органического растворителя. Так, при 25 °С в 3,5 М растворе уксусной кислоты (рН 2,6) инсулин существует преимущественно в виде мономеров, что подтверждено при турбидиметрическом методе (длина волны 400 и 350 нм). Однако при снижении рН раствора до 2,0 или при повышении температуры до 60 °С инсулин быстро образует волокнистые структуры, которые со временем превращаются в нерастворимые агрегаты. Предполагается, что кислая реакция среды ускоряет агрегацию путем образования заряженного окружения белковых молекул, в котором увеличиваются силы притяжения между молекулами инсулина. В результате проведенных исследований установлено, что инсулин склонен к образованию нерастворимых агрегатов, фибрилл, в растворах с рН 2,5–3,5. Наиболее интенсивно образование фибрилл протекает в растворах, содержащих такие неорганические кислоты, как азотная, ортофосфорная, серная или соляная. Подобная агрегация инсулина значительно снижает как качество очистки, так и срок эксплуатации сорбентов для хроматографии. Оптимальной подвижной фазой, обеспечивающей минимальную способность инсулина к агрегации, является подвижная фаза, включающая уксусную кислоту. При этом увеличивается срок эксплуатации сорбентов.

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

Контроль качества генно-инженерного инсулина предполагает контроль дополнительных показателей, характеризующих стабильность рекомбинантного штамма и плазмиды, отсутствие постороннего генетического материала в препарате, идентичность экспрессируемого гена и др.

Использование человеческого инсулина с самого начала терапии сводит к минимуму возникновение аллергических реакций. Наиболее частые осложнения инсулиновой терапии – гипогликемические состояния, что, прежде всего, проявляется в нарушении функций центральной нервной системы (спутанность сознания, кома и др.).

*В настоящее время в медицинской практике используют инсулины трех типов:*

- короткодействующие с быстрым началом эффекта – регулярный инсулин – представляет собой короткодействующий растворимый при нейтральном значении pH кристаллический цинк-инсулин, эффект которого развивается в течение 15 минут после подкожного введения и продолжается 5–7 часов. С целью увеличения длительности действия все другие препараты инсулина модифицированы и при растворении в нейтральной среде образуют суспензию. Они содержат протамин в фосфатном буфере – протамин-цинк-инсулин и НПХ (нейтральный протамин Хагедорна) – НПХ-инсулин или различные концентрации цинка в ацетатном буфере – инсулины ультраленте, ленте, семиленте;

- средней продолжительности действия – препараты содержат протамин, представляющий белок средней молекулярной массы 4400, богатый аргинином и получаемый из молок радужной форели. Для образования комплекса требуется соотношение протамина и инсулина 1 : 10. После подкожного введения протеолитические ферменты разрушают протамин, позволяя инсулину всасываться;

- длительного действия с медленным проявлением эффекта.

Лечение больных сахарным диабетом I типа включает использование комбинации препаратов инсулина человека быстрого (короткого) и длительного (продолжительного) действия. Короткодействующий инсулин должен быстро достигать пика активности в соответствии с подъемом уровня глюкозы, связанным с приемом пищи, и прекращать свое действие после его падения. Инсулин пролонгированного действия, напротив, должен в течение длительного времени обеспечивать определенный базовый уровень глюкозы в промежутках между приемами пищи. Инсулиновая терапия с использованием инсулина имеет ряд недостатков, которые удалось преодолеть только после получения его генно-инженерных аналогов.

В настоящее время объем ежегодного потребления в мире субстанции генно-инженерного инсулина человека составляет приблизительно около 30000 кг, а с учетом постоянного роста заболевания диабетом в мире выпуск рекомбинантного инсулина будет увеличиваться ежегодно.

## **5.2. Производство гормона роста человека (соматотропный гормон)**

*Гормон роста человека (ГРЧ)* – белок вырабатываемый передней долей гипофиза, который секретируется в кровь под воздействием гипоталамического соматостатина и ГРЧ-рилизинг-фактора соматолиберина. Высвобождение гормона регулируется соматостатином, а количество выделяемого ГРЧ определяется соматолиберином. Гормон роста человека относится к группе анаболических гормонов.

Молекула ГРЧ представляет собой одну полипептидную цепь, состоящую из 191 аминокислотного остатка, с молекулярной массой 22,125 кДа. По химической структуре, физическим, химическим и биологическим свойствам ГРЧ сходен с пролактином и плацентарным лактогеном. Молекула ГРЧ содержит 2 остатка триптофана, 2 тирозина и 4 цистеина. Последние образуют в молекуле два дисульфидных мостика, которые формируют две петли – большую, включающую центральный участок аминокислотной последовательности между цистеином-54 и цистеином-165, и малую, находящуюся на С-концевом участке между цистеином-182 и цистеином-189. Пространственную структуру молекулы соматотропина отличает высокая степень упорядоченности. В полипептидной цепи ГРЧ выявлено 4 альфа-спиральных и 3 нерегулярных участка. Высокое содержание в молекуле гормона остатков неполярных аминокислот обуславливает образование в водном растворе димеров и более крупных агрегатов.

Впервые гормон был выделен и очищен в 1963 году из гипофиза, полученного из трупного материала. Дефицит этого гормона приводит к гипофизарной карликовости, частота встречаемости которой оценивается как 10 случаев на 1 млн. человек (среди детей западных стран она составляет 1 на 5000 человек). Гормон видоспецифичен и является единственным

средством лечения детей, страдающих от его недостатка. Внутримышечное введение гормона роста человека (10 мг/кг в течение года по три инъекции в неделю) увеличивает рост в течение первого года лечения более чем на 6 см. Для достижения более ощутимых результатов введение гормона необходимо продолжать от возраста 4–5 лет до половой зрелости и далее.

Общего количества фармацевтического препарата, выпускаемого компаниями крупных производителей соматотропного гормона, хватало для лечения лишь одной трети случаев гипофизарной карликовости в развитых странах; Недостаток соматотропина оказался еще более острым с учетом других случаев его применения: незаживающие переломы, ожоги, язвы, нарушение гемопоэза.

Кроме того гормон, выделяемый из трупного материала отличался гетерогенностью. Несмотря на совершенствование выделения и очистки гормона, у 5 % больных, получавших препарат, вырабатывались антитела, которые полностью инактивировали его биологическую активность. Необходимо также отметить, что гипофизарный материал заражен нейротоксическим вирусом с необычайно длительным инкубационным периодом. В связи с этим дети, получавшие соматотропный гормон, нуждались в многолетнем медицинском наблюдении. Вирус, содержащийся в препаратах гормона, нередко приводил к летальному исходу. С 1985 г. ВОЗ запрещено применение гормона, выделяемого из человеческих гипофизов.

*Рекомбинантный соматотропин*, получивший название «Соматрем», стал вторым, (после человеческого инсулина) фармацевтическим препаратом, полученным биотехнологическим путем. Гормон роста человека, биологически чистый и свободный от вирусных загрязнений, впервые был получен в 1980 году фирмой «Genentech». Гормон, синтезированный в генетически сконструированных клетках *E. Coli*, отличается от гормона, выделенного из гипофиза, дополнительным остатком метионина на NH<sub>2</sub>-конце молекулы. Гормон обладает биологической активностью нативного гормона и даже большим эффектом, чем гормон роста, выделенный из гипофиза, по-видимому, по причине большей чистоты. У детей, страдающих гипофизарной карликовостью, зарегистрирован прирост 8–18 см в год, что несколько больше эффекта гормона, полученного из гипофиза.

На первом этапе клонировали двунитевую ДНК-копию мРНК и расщеплением рестрикционными эндонуклеазами получили последовательность, которая кодирует всю аминокислотную последовательность гормона, за исключением первых 23 аминокислот. Затем клонировали синтетический полипептид, соответствующий аминокислотам от 1-й до 23-й. Далее два фрагмента объединяли, затем «подстроили» к паре промоторов и участку связывания рибосом. Конечный выход гормона составил 2,4 мкг на 1 мл культуры *E. Coli* (100000 молекул гормона на клетку). Гормон роста человека, синтезированный в бактериях, обладал нужной молекулярной массой и не связан с каким-либо бактериальным белком, от которого его необходимо было бы отщеплять.

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

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

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

Стратегию конструирования новых белков путем замены функциональных доменов или с помощью направленного мутагенеза можно использовать для усиления или ослабления биологического действия белка. Например, нативный гормон роста человека связывается в разных типах

клеток, как с рецептором гормона роста, так и с пролактиновым рецептором.

Чтобы избежать нежелательных побочных эффектов в процессе лечения, нужно исключить присоединение гормона роста человека к пролактиновому рецептору. Поскольку участок молекулы гормона роста, связывающийся с этим рецептором, по своей аминокислотной последовательности лишь частично совпадает с участком молекулы, который взаимодействует с пролактиновым рецептором, удалось избирательно снизить связывание гормона с последним. Для этого использовали сайт-специфический мутагенез, в результате которого произошли определенные изменения в боковых группах некоторых аминокислот (His-18, His-21, Glu-174) – лигандов для ионов  $Zn^{2+}$ , необходимых для высокоэффективного связывания гормона роста человека с пролактиновым рецептором. Полученный модифицированный гормон роста человека связывается только со «своим» рецептором. Однако, модифицированные гормоны роста человека пока не нашли применения в клинике.

Представляем технологию получения рекомбинантного гормона роста человека (соматотропного гормона) предложенного российскими учеными института биоорганической химии РАН. Предлагаемый метод получения включает шесть основных стадий: ферментацию, выделение телец включения, ренатурацию, ионообменную хроматографию на носителе Q-Sepharose FF, гидрофобную хроматографию на сорбенте Butyl Sepharose 4 FF и гель-фильтрацию с использованием Sephacryl S-100 HR.

Для создания штамма-продуцента был синтезирован искусственный ген [Met-1]pГРЧ, структура которого была оптимизирована для эффективной транскрипции и трансляции в *E. Coli* BL21(DE3). Был получен соответствующий штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)pES1-6, обладающий продуктивностью 300 мг целевого белка в 1 литре культуры при выращивании в лабораторных условиях.

### ***Биотехнология получения рекомбинантного гормона роста человека (соматотропного гормона).***

#### ***1. Ферментация.***

Культуру *E. Coli* BL21(DE3), трансформированную плазмидой pES1-6/[Met-1]pГРЧ, выращивали в ферментере 1000 л, заполненную питательной средой (панкреатический гидролизат казеина, дрожжевой экстракт,  $K_2HPO_4$ , NaCl,  $MgSO_4$ ) при температуре 37 °С и pH 7,0. Количество посевного материала составляло 2 % от объема питательной среды.

В течение процесса культивирования в ферментер подавали стерильный воздух, водный раствор аммиака и раствор глюкозы. Удельный расход воздуха поддерживали на уровне 0,5 л в минуту. Повышения концентрации кислорода в среде достигали за счет увеличения скорости перемешивания культуральной жидкости. Через 3 часа культивирования добавляли изопрропил-тио-β-D-галактозид до концентрации 52 мг/л и продолжали процесс еще 3 часа. При индукции с помощью изопрропил-тио-β-D-галактозида происходил эффективный биосинтез рекомбинантного белка, который накапливался в клетках в виде телец включения. С помощью электрофореза в SDS-ПААГ показано, что через 3 часа после внесения индуктора содержание целевого продукта в клетках продуцента достигало 30 % от суммарного клеточного белка. На процесс ферментации оказывает влияние температура, давление, pH, содержание растворенного кислорода в культуральной жидкости и скорость подачи глюкозы. *Одним из важнейших параметров процесса ферментации является содержание в среде растворенного кислорода, который позволяет регулировать режимы перемешивания культуральной жидкости, подачи воздуха и глюкозы. Содержание растворенного кислорода в культуральной жидкости определяли с помощью датчиков парциального давления в процентах от максимального насыщения. После чего, клетки, содержащие тельца включения, осаждали сепарированием на сепараторе «Westfalia CSA-19». Сырую биомассу суспендировали в буферном растворе А (50 мМ трис-основание с ЭДТА, pH 7,0) в соотношении 1 : 5 (масса : объем) и разрушали в проточном дезинтеграторе «Gaulin». Для этого суспензию пропускали через дезинтегратор 3–4 раза при давлении 600 атм. После дезинтеграции клеточную суспензию сепарировали на сепараторе «Cera Z81» при 16000 об/мин. Осадок*

супендировали в буферном растворе Б (50 мМ трис-НСl, рН 8,0) и вновь центрифугировали в тех же условиях. Содержание рекомбинантного белка в суммарном клеточном лизате и чистоту телец включения анализировали при помощи электрофореза в ПААГ.

### 2. Выделение телец включения.

Процесс выделения телец включения из клеток сопровождается формированием димеров и олигомеров целевого белка с образованием ковалентных связей между молекулами. Для получения мономерной формы не всегда достаточно применять только восстанавливающие агенты, такие как дитиотреитол,  $\beta$ -меркаптоэтанол и др. Для достижения оптимального результата, как правило необходимо использовать буферные растворы, содержащие детергенты и хаотропные агенты.

*Восстановление дисульфидных связей в рекомбинантном белке.* Влажные тельца включения (60 г) супендировали в 1 л буфера, содержащего 7 М гуанидин-НСl, 20 мМ трис-НСl, рН = 8,0; прогревали в течение 60 минут при 37 °С и затем добавляли 30 мМ дитиотреитола. Продолжали инкубацию в течение 60 минут при 37 °С. Раствор восстановленного белка Met-pГРЧ центрифугировали 60 минут при 10000 g для получения солюбилизата.

Солюбилизацию Met-pГРЧ и телец включения проводят по стандартной методике с применением высоких концентраций хаотропных агентов (7 М гуанидин-НСl, 8 М мочевины) в присутствии дитиотреитола при 37 °С. Максимальная растворимость белка в 8 М мочевины составляла 4–5 мг/мл. В то же время использование 7 М гуанидин-НСl позволило обеспечить наиболее полное растворение телец включения, восстановление дисульфидных связей в молекуле и увеличить концентрацию солюбилизированного Met-pГРЧ до 9–10 мг/мл.

*Гель-фильтрация на носителе Sephadex G-25.* Раствор восстановленного Met-pГРЧ (1 л) наносили на колонку ВРG (140 x 500 см), заполненную носителем G-25 Fine. Колонку предварительно уравнивали буферным раствором, содержащим 20 мМ трис-НСl, и 8 М мочевины, рН = 8,0. Этот же буферный раствор использовали для проведения разделения при скорости потока 120 мл/мин. Содержание белка в элюате измеряли с помощью проточного фотометра при длине волны 280 нм.

### 3. Ренатурация.

Ключевой стадией в процессе получения рекомбинантных белков является стадия ренатурации, в процессе которой денатурированный белок приобретает нативную пространственную структуру, обеспечивающую его биологическую активность.

Раствор белка (Met-pГРЧ, 2 л), полученный после гель-фильтрации, при постоянном перемешивании со скоростью 100–120 мл/мин добавляли к 80 л буферного раствора, содержащего 40 мМ трис-НСl, 10 мМ NaCl, 3 мМ цистеина, 0,3 мМ цистамин, 0,05 мМ ЭДТА и 0,01 % детергента Brij 35P (Serva), рН = 8,5. Полученный раствор оставляют при 4 °С на 4–6 часов.

В условиях промышленного производства процесс ренатурации необходимо проводить при оптимальном объеме раствора, полученного в результате ренатурации; концентрация белка при этом должна быть максимально возможной. Однако повышение концентрации белка влечет за собой увеличение содержания в реакционной смеси нерастворимых белковых агрегатов. Наиболее интенсивная агрегация Met-pГРЧ происходит в процессе ренатурации при переходе от сильноденатурирующих к слабоденатурирующим условиям. Применение неионных детергентов стабилизирует белок в водном растворе и препятствует образованию агрегатов не ковалентной природы. Известно, что детергент Brij 35P блокирует образование агрегатов ГРЧ в растворе в концентрации, равной критической концентрации мицеллообразования. Твин-80 обладает тем же свойством, но в концентрации превышающей концентрацию мицеллообразования. Поэтому в качестве стабилизатора Met-pГРЧ в процессе ренатурации был выбран Brij 35P.

Для образования нативных дисульфидных связей была использована система буферных растворов, содержащих окислительно-восстановительную пару цистеин / цистамин в соотношении 1 : 0,1. Оптимизацию условий проводили по нескольким параметрам: степень и скорость разбавления солюбилизата, состав буферного раствора для ренатурации. Процесс вели методом разбавления белка буферным раствором с низкой ионной силой. Процедура ренатурации состояла из нескольких этапов. Сначала растворенный в 7 М гуанидин-хлориде белок с помощью гель-фильтрации пере-



водили в буферный раствор, содержащий 8 М мочевины и 10 мМ цистеина. Условия процедуры были подобраны таким образом, чтобы конечная концентрация белка составляла 4–5 мг/мл. Затем полученный раствор белка разбавляли при комнатной температуре буферным раствором для ренатурации и инкубировали в течение 8 часов.

#### 4. Ионообменная хроматография.

Хроматографическую очистку рекомбинантного соматотропина проводили при температуре 4 °С на радиальной и аксиальной колонках объемом 0,5 и 1 л, соответственно. В качестве сорбента использовали *Q-Sepharose FF*. Раствор белка после ренатурации (82 литра) с помощью перистальтического насоса («Masterflex») со скоростью 300 мл/мин наносили на радиальную колонку («Sepragen 500»), уравновешенную 20 мМ трис-НСl буферным раствором, рН = 8 (стартовый буфер). После нанесения всего объема белка сорбент промывали тремя объемами стартового буфера. Затем к выходу радиальной колонки присоединяли аксиальную колонку («Pharmacia XK50»), также предварительно уравновешенную стартовым буферным раствором. Белок элюировали в соответствии с фотометрическим профилем при длине волны 280 нм. Фракции, содержащие Met-pГРЧ, объединяли (1,0–1,2 л).

*Отщепление N-концевого метионина.* К раствору белка, полученного после очистки на Q-Sepharose FF, добавляли лейциновую аминопептидазу (*Aeromonas proteolitica*) в расчете 7,5 ед. на 1 г белка. Реакцию отщепления проводили в течение 16 ч при комнатной температуре, полноту гидролиза контролировали с помощью изократической ОФ ВЭЖХ на колонке Symmetry 300 C<sub>18</sub> (4,6 x 250 мм). После окончания гидролиза пик, соответствующий Met-pГРЧ, на хроматограмме не выявляется. В результате экспериментов обнаружено, что более высокие значения степени гидролиза достигнуты при температуре 20–22 °С и 37 °С. Однако при и 37 °С происходило образование побочных продуктов гидролиза. Проведение реакции при температуре 20–22 °С обеспечивало, с одной стороны, высокую степень отщепления N-концевого метионина, а с другой – низкий выход нежелательных примесей. Поэтому для проведения гидролиза была выбрана комнатная температура. Однако при 20–22 °С количество внесенного в реакционную смесь фермента должно поддерживаться на уровне 7,5 ед/г

белка; уменьшение концентрации аминопептидазы сопровождается снижением степени гидролиза Met-pГРЧ.

#### 5. Гидрофобная хроматография.

К раствору pГРЧ после отщепления N-концевого остатка метионина добавляли NaCl до конечной концентрации 2 М. Затем полученный раствор наносили на аксиальную колонку ВРГ (140 x 500 мм) («Amersham-Bioscience»), заполненную гелем *Butyl Sepharose 4 FF* и предварительно уравновешенную буферным раствором, содержащим 20 мМ трис-НСl, 2 М NaCl, рН = 8,0. После нанесения колонку промывали тем же буферным раствором. Элюцию проводили при скорости потока 80 мл/мин с помощью обратного градиента NaCl (контролировали с помощью кондуктометра производства «Amersham-Bioscience») от 2 до 0 М в том же буферном растворе при температуре 4 °С. Детекцию осуществляли с помощью проточного УФ-детектора с фильтром 280 нм. Фракции, содержащие не менее 95 % мономерной формы рекомбинантного белка, объединяли.

#### 6. Гель-проникающая хроматография.

Окончательную очистку pГРЧ проводили на колонке ВРГ (140 x 950 мм) геля *Sephacryl S-100 HR*, предварительно уравновешенной буферным раствором, содержащим 20 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2% глицина и 4 % маннита, рН = 6,8. Этот же буферный раствор использовали для фракционирования при скорости потока 35 мл/мин. Белок в элюате детектировали с помощью проточного фотометра при длине волны 280 нм. Фракции, содержащие pГРЧ в мономерной форме, объединяли. Полученный белок разводили до концентрации 1,3 мг/мл, замораживали и хранили до использования при минус 20 °С.

*В заключение* хотелось бы отметить, что в настоящее время в клинике используется субстанция соматотропина, представляющая собой рекомбинантный гормон роста человека – пептид, содержащий 191 аминокислоту, идентичный человеческому гипофизарному гормону роста по аминокислотной последовательности и составу, а также по пептидной карте, изоэлектрической точке, молекулярной массе, изомерной структуре и биологической активности. Соматотропин применяется при задержке роста у детей, обусловленной снижением или отсутствием секреции эндогенного гормона роста; задержке роста у девочек с дисгенезией гонад (синдром

Шерешевского – Тернера). Как у взрослых, так и детей соматотропин поддерживает нормальную структуру тела, стимулируя рост мышц и способствуя метаболизму жира.

На фармацевтическом рынке Украины присутствуют препараты рекомбинантного гормона роста человека: «Биосома» (Teva, Израиль), «Генотропин» (Pfizer Inc., Швеция), «Нордитропин» (Novo Nordisk, Дания), «Нутропин Аq» (Beaufour Ipsen International, США), «Растан» (Россия), «Сайзен» (Industria Farmaceutica Serono s.p.a., Италия) и др. Необходимо отметить, что препарат «Сайзен» получен методом генной инженерии с использованием линии клеток млекопитающих, а именно с помощью клеток молочной железы. Другие перечисленные препараты получены с использованием бактерий *E. Coli*.

### 5.3. Производство эритропоэтина человека

*Эритропоэтин* – гликопротеиновый гормон, образуемый клетками почек и печени в ответ на снижение парциального давления кислорода в крови (гипоксия) и обуславливающий начало эритропоэза. Это полипептид, состоящий из 165 аминокислот с молекулярной массой 30400 Da. Эритропоэтин широко применяют в клинической практике при заболеваниях сопровождающихся анемией. При анемии индукция эритропоэтина повышена, что стимулирует образование эритроцитов в костном мозге и приводит к коррекции анемии. Эритропоэтин показан больным с почечной недостаточностью и выраженной анемией. В настоящее время препараты эритропоэтина входят в число необходимых и часто используемых фармацевтических средств. Получение эритропоэтина из физиологического материала – процесс трудоемкий и затратный, что делает невозможным применение природного гормона в клинической практике. Альтернативным вариантом является получение белка методами генной и клеточной инженерии с помощью штамма-продуцента на основе перевиваемой культуры клеток, что позволяет получать более дешевый и доступный белок.

Культура клеток яичника китайского хомячка (штамм CHO) и её производные используются в качестве продуцентов различных рекомбинантных белков.

В Российском научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» была получена линия клеток штамма продуцента эритропоэтина человека (CHO<sub>E</sub>) путем трансфекции клеток CHO ТК (дефектных по тимидинкиназе) рекомбинантной плазмидой, содержащей ген эритропоэтина человека, с последующей селекцией. Клетки CHO<sub>E</sub> обеспечивают синтез и секрецию в культуральной жидкости белка рекомбинантного человеческого эритропоэтина (рчЭПО). Культура клеток состояла из эпителиоподобных и веретеновидных клеток с крупными ядрами неправильной формы, содержащими от одного до трех ядрышек; цитоплазма зернистая, вакуолизирующаяся. Клетки субстратзависимы, склонны к неравномерному росту, образуют многослойные островки. При длительном культивировании в течение 23 последовательных пассажей морфология клеток не изменялась; индекс пролиферации культуры составлял 3–4; монослой формировался на 3-и сутки роста при кратности посева 1 : 3–1 : 4. Хранение в жидком азоте не приводило к изменению свойств культуры клеток.

Клетки культивировали в питательной среде Игла MEM с добавлением 10 % сыворотки крови крупного рогатого скота и смеси ГАТ (13,61 мкг/мл гипоксантина, 0,191 мкг/мл аминоптерина, 3,88 мкг/мл тимидина). Культивирование проводили при температуре 37 °С. Культуру криоконсервировали и хранили при температуре минус 196 °С в жидком азоте.

Исследование специфической активности эритропоэтина *in vitro* показало, что штамм-продуцент обладает способностью выделять в культуральную среду целевой белок с активностью в среднем 247,6 МЕ/мл в сутки. Активность рчЭПО в течение времени культивирования увеличивалась с 102,2 МЕ/мл (первые сутки) до 332,1 МЕ/мл (четвертые сутки) и затем постепенно снижалась. Снижение активности, вероятно, связано с необратимыми процессами в клетках, недостатком питательных веществ и накоплением вредных метаболитов в среде. Очистка препарата основана на комбинации аффинной и ионообменной хроматографии. Получение сорбента для аффинной хроматографии – путем иммобилизации моноклональных антител к эритропоэтину человека, на CNBr (активированной Sepharose FF). Источником моноклональных антител является асцитическая жидкость мышей или культуральная жидкость. Сорбент уравнивали фосфатным буфером, содержащим 0,02 % Твин-20. Культуральную

жидкость, содержащую эритропоэтин концентрировали на ультрафильтрационных волокнах с порогом отсечения 10 кДа при температуре 4–10 °С. Культуральную жидкость концентрировали в 10–20 раз (исходный объем – 28 л). Культуральную жидкость, содержащую 300 мг рекомбинантного эритропоэтина, наносили на колонку с аффинным сорбентом (высота столба сорбента 12,7 см). Сорбент промывали последовательно 4 объемами фосфатного буфера с 0,02 % Твина-20; 3-мя объемами фосфатного буфера, содержащего 1 М NaCl и 0,02 % Твина-20; 2-мя объемами фосфатного буфера с 0,02 % Твина-20. Элюирование проводили 0,1 М раствором лимонной кислоты. В 160 мл элюата – 285 мг белка эритропоэтина. Выход на этой стадии составляет 95 %. Чистота эритропоэтина более 95 %. Полученный раствор эритропоэтина подвергали диализу против 0,01 М трис-буфера с 0,02 % Твина-20, pH = 6,8. Затем эритропоэтин подвергают градиентной ионообменной хроматографии на Q-Sepharosa. Элюирование проводят линейным градиентом NaCl от 0 до 0,3 М раствором. Выход на этой стадии составляет не менее 75 %. Контроль препарата проводили методом ВЭЖХ и электрофореза в ПААГ. Чистота эритропоэтина не менее 98 %. Препарат гомогенен и представлен мономером.

Рассматривая технологии *получения рекомбинантных белков* нельзя не остановиться на получении данных продуктов *с помощью трансгенных сельскохозяйственных животных*. Использование сельскохозяйственных животных в качестве биореакторов рассматривается как альтернатива традиционным методам получения белков для фармацевтической промышленности. В результате генно-инженерных манипуляций домашние животные становятся живыми системами, продуцирующими рекомбинантные белки человека в кровь или молоко. Выбор трансгенных животных в качестве источника фармацевтических белков обусловлен тем, что в их организме могут осуществляться посттрансляционные модификации, делающие продуцируемые рекомбинантные белки биологически активными. Экспрессия рекомбинантных белков в молочной железе трансгенных животных может достигать 40 г/л, при этом выделение белков из молока возможно уже при их концентрации 25 нг/мл. С помощью трансгенных животных в лабораторных условиях получен широкий спектр рекомбинантных белков: антитромбин III,  $\alpha_1$ -антитрипсин,  $\alpha$ -глюкозидаза, эритропоэтин,  $\beta$ -интерферон,  $\beta$ -лактоглобулин, С-протеин, сывороточный альбумин,  $\gamma$ -интерферон, факторы свертываемости крови VIII и IX. Для получе-

ния фармацевтических белков используют в основном 6 видов животных: мышей, кроликов, свиней, коз, овец и коров.

Основным методом получения таких трансгенных животных является *метод микроинъекции ДНК в пронуклеус зиготы*. Отрицательным моментом является низкая эффективность трансгенеза (около 1 % от числа пересаженных эмбрионов), причем экспрессия трансгенов наблюдается только у 60 % полученных трансгенных животных. Существует подход, который позволяет устранить указанные недостатки – использование ретровирусных векторов, которые позволяют с высокой эффективностью осуществлять трансформацию клеток мишеней как *in vitro*, так *in vivo*. Преимуществом ретровирусных систем переноса генов является возможность получения так называемых *соматических трансгенных животных*, т.е. животных с трансформацией клеток отдельных органов и тканей. В основе получения таких животных лежит принцип, используемый в генной терапии. Векторные конструкции, содержащие интересующий ген, вводят непосредственно в органы и ткани взрослых животных. Наличие в генных конструкциях тканеспецифических промоторов обеспечивает экспрессию целевого гена только в определенных тканях.

В качестве примера рассмотрим получение эритропоэтина человека на трансгенных животных.

Для получения эритропоэтина человека были использованы два ретровирусных вектора pLN- $\alpha$  и pLN-G-CSF, полученные на основе вируса лейкемии мышей Молони. Обе конструкции были созданы на основе вектора pLNS путем встраивания в прямой ориентации в сайт XhoI геномных последовательностей эритропоэтина человека (pLN- $\alpha$ ) под контролем промотора  $\alpha_{S1}$ -казеина крупного рогатого скота.

Для упаковки генных конструкций в вирусные частицы были использованы два типа пакующих клеток – Grevp-AM12 и pg13. Обе линии получены на основании эмбриональных фибробластов мыши, в которые последовательно были встроены вирускодирующие последовательности.

Технология получения соматических трансгенных животных включала следующие этапы: выращивание пакующих линий клеток в культуре и их оценку на наличие рекомбинантной ДНК методом ПЦР; введение вирусного препарата (клеток-упаковщиц) в молочную железу взрослых животных; анализ молока подопытных животных на наличие рекомбинантной ДНК и определение в нем уровня экспрессии рекомбинантного про-

дукта. Эксперименты по трансформации клеток молочной железы проводили на трех видах животных: коровах, козах, свиноматках.

Введение генных конструкций в клетки молочной железы осуществляли как *in vitro*, так и *in vivo*. Трансформацию клеток-мишеней *in vitro* проводили путем совместного культивирования с клетками-упаковщицами. Для трансформации клеток молочной железы *in vivo* использовали суспензию клеток-упаковщиц, которые вводились непосредственно в паренхиму вымени взрослых животных. Учитывая, что ретровирусы способны инфицировать только делящиеся клетки, введение клеток-упаковщиц осуществляли в период беременности, когда наблюдается наиболее активная пролиферация клеток молочной железы. Экспрессия рекомбинантного эритропоэтина человека наблюдалась практически у всех видов подопытных животных. Концентрация рекомбинантного эритропоэтина человека в молоке животных составляла до 600–1000 нг/мл. Необходимо отметить, что при введении генной конструкции в кровь среднее содержание рекомбинантного продукта в молоке составляло лишь 5–11 нг/мл.

Аналогично был получен гранулоцит-колониестимулирующий фактор (pLN-G-CSF), количество которого в молоке до 200 нг/мл.

Таким образом, создание трансгенных животных может позволить расширить номенклатуру генно-инженерных биотехнологий, позволяющих получать промышленные количества фармацевтических субстанций.

Хорошо известны готовые инъекционные формы рекомбинантного эритропоэтина человека на основе субстанции под названием Эпоэтин-альфа и Эпоэтин-бета, представляющие собой лиофилизированные лекарственные формы для инъекций. Эпоэтин-альфа по биологическим свойствам не отличается от человеческого эритропоэтина, применяется при анемиях, связанных с хронической почечной недостаточностью. Эпоэтин-бета применяется при анемиях различного генеза (при хронической почечной недостаточности, у недоношенных новорожденных, химиотерапии злокачественных новообразований) и при подготовке к аутогемотрансфузии.

На фармацевтическом рынке Украины присутствуют препараты рекомбинантного эритропоэтина: «Вепокс» – Эпоэтин-альфа (Wockhardt), «Гемакс» – Эпоэтин-альфа (Sidus-Bio-Sidus), «Рекормон» – Эпоэтин-бета (Roche), «Эпрекс» – Эпоэтин-альфа (Cilag) и др.

### **Контрольные вопросы**

1. Какова роль гормона инсулина в организме человека? Опишите структуру гормона.
2. Какие этапы синтеза инсулина в  $\beta$ -клетках островковой ткани Вам известны?
3. Опишите историю создания производства природного и рекомбинантного инсулинов.
4. Проведите анализ технологии получения рекомбинантного инсулина и укажите методы межоперационного контроля.
5. Каким образом проводят конструирование плазмиды несущей ген инсулина человека?
6. Что представляют собой тельца включения? Каким образом проводится процесс ренатурации?
7. Какова роль гормона роста (соматотропина) в организме человека? Опишите структуру гормона.
8. Проведите анализ технологии получения рекомбинантного гормона роста и укажите методы межоперационного контроля.
9. Какова роль эритропоэтина в организме человека? Опишите структуру гормона.
10. Опишите линии клеток, используемых для получения эритропоэтина.
11. Какие этапы включают получение трансгенных животных?
12. Проведите анализ технологии получения эритропоэтина и укажите методы межоперационного контроля.
13. По каким параметрам проводят контроль качества гормональных препаратов?
14. Аппаратурно-технологическая схема производства гормонов.

## ГЛАВА 6. НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ИЗГОТОВЛЕНИИ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

### 6.1. Биотехнология вакцин

Ни одной медицинской науке человечество не обязано спасением стольких жизней, как вакцинологии. Вакцинопрофилактика доказала свою эффективность как наиболее экономичное средство предупреждения инфекционных болезней. Созданы вакцины против 34-х социально значимых инфекций, что привело к значительному снижению заболеваемости дифтерией, столбняком, корью, туляремией, полиомиелитом и исчезновению оспы.

Основной задачей исследования в области вакцинологии является разработка безопасных и высокоэффективных вакцинных препаратов. Весь путь создания вакцин был возможен только при использовании основных достижений биотехнологической науки – открытие анатоксинов и возможность их получения, создание клеточных культур, аттенуация вирусов и бактерий, выделение и очистка полисахаридов, создание рекомбинантных технологий. Каждое открытие биотехнологии и иммунологии это очередной шаг к созданию новых вакцин, причем, не только для профилактики инфекционных заболеваний. Сегодня вакцины активно используются для лечения ряда заболеваний: аллергических, аутоиммунных, онкологических и др. Так, например, в Украине зарегистрированы две вакцины для лечения и профилактики онкологических заболеваний: вакцина URO-BCG, применяемая для лечения поверхностного рака мочевого пузыря (производства NVI, Нидерланды) и вакцина Гардасил против вируса папилломы человека, рекомбинантная (производство «Merck Sharp & Dohme B.V.», Нидерланды). Многообещающими являются комбинированные вакцины, обеспечивающие иммунизацию против нескольких инфекционных заболеваний. Совершенствование и развитие производства традиционных вакцин идет параллельно с развитием технологий принципиально новых вакцинных препаратов: ДНК-вакцин; вакцин на основе пептидов; мукозальных и рибосомальных вакцин; создание препаратов, с помощью которых появится возможность влиять на иммунную систему при использовании новых им-

муномодуляторов, повышающих иммунный ответ; создание новых систем переносчиков, например, липосом для доставки антигенов или иммуномодуляторов; рекомбинантных вакцин и ряда других.

Интенсивное развитие биотехнологии, биохимии, иммунологии определило прогресс в развитии мировой фармации и создания высокоэффективных вакцин, как традиционных, так и вакцин нового поколения; препаратов крови, интерферонов, цитокинов и рекомбинантных продуктов различной направленности. С развитием технологии рекомбинантных ДНК стало возможным создание вакцин следующего поколения, лишенных недостатков традиционных вакцин.

В данной публикации невозможно осветить вопросы, касающиеся разработки и производства всех существующих сегодня в мировой практике вакцин. В связи с этим мы остановились только на принципиальных подходах к созданию новых высокоэффективных вакцинных препаратов. В этой главе суммированы основные технологии, ключевые проблемы и иммунологические цели создания различных видов активных вакцин. В наших предыдущих работах были подробно освещены технологии получения основных вакцин действующего в Украине Календаря прививок.

Технологии и примеры, представленные здесь, должны предоставить читателю четкую структуру, которая дала бы ему возможность оценить различные подходы к исследованиям и разработке новых вакцин. Данный раздел настоящего учебного пособия должен рассматриваться совместно с материалами, изложенными в учебном пособии: Краснопольский Ю.М., Борщевская М.И. «Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов». – Харьков, НТУ «ХПИ», 2009.

В табл. 13 представлен перечень вакцин, полученных с использованием различных технологий.

Таблица 13 – Перечень вакцин, полученных с использованием различных технологий

Технологии вакцины	Вид микроорганизма
1	2
<i>Классическая стратегия для вирусов:</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Аттenuация в клеточной культуре</li> </ul>	Вирус полиомиелита, вирус кори, вирус эпидемического паротита, вирус краснухи, вирус ветряной оспы
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Мутанты отобранные путем температурного воздействия</li> </ul>	Ротавирус, вирус гриппа
<i>Рекомбинантные вирусы</i>	Вирус простого герпеса (HSV)
<i>Рекомбинантные вирусные векторы</i>	Вирус коровьей оспы, аденовирус
<i>Классические стратегии для бактерий:</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Бактериальные</li> </ul>	Туберкулез (бацилла Кальметта – Герена) (БЦЖ), брюшной тиф ( <i>Salmonella typhi</i> )
<i>Рекомбинантные бактерии</i>	Холера ( <i>Vibrio cholerae</i> )
<i>Рекомбинантные бактериальные векторы</i>	Холера ( <i>Vibrio cholerae</i> ), брюшной тиф ( <i>Salmonella typhi</i> ), <i>Shigella flexneri</i>
<i>Субъединичные / инактивированные вакцины (целый патогенный организм):</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Инактивированные бактерии</li> </ul>	Коклюш ( <i>Bordetella pertussis</i> ), холера
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Инактивированные вирусы</li> </ul>	Вирус полиомиелита, вирус гриппа, вирус бешенства, вирус японского энцефалита, вирус гепатита А

Продолжение таблицы 13

1	2
<i>Вакцины на основе белков:</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Природные</li> </ul>	Вирус гепатита В (HBV), коклюш
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Химически инактивированные</li> </ul>	Столбняк ( <i>Clostridium tetani</i> ), дифтерия ( <i>Corynebacterium diphtheriae</i> ), коклюш
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Генетически инактивированные</li> </ul>	Коклюш, дифтерия
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Рекомбинантный полипептид</li> </ul>	Болезнь Лайма ( <i>Borrelia burgdorferi</i> ), HBV
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Гибридный белок</li> </ul>	Малярия
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Конъюгат</li> </ul>	Малярия
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Клеточный эпитоп</li> </ul>	Рак, HBV
<i>Вакцины на основе полисахаридов:</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Простой полисахарид</li> </ul>	Haemophilus influenza тип b (Hib), менингококковый ( <i>Neisseria meningitides</i> ), пневмококковый ( <i>Streptococcus pneumoniae</i> )
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Конъюгат</li> </ul>	Hib
<i>Вакцины на основе ДНК</i>	Грипп, гепатит В

Стратегическое решение по поводу разработки живой, субъединичной / инактивированной вакцины или вакцины на основе нуклеиновой кислоты необходимо принимать, взвесив эпидемиологические, патогенетические и иммунобиологические аспекты рассматриваемых инфекций или за-

болевания, а также техническую выполнимость различных подходов. Эпидемиология диктует целевую популяцию вакцины. Возраст и состояние здоровья этой популяции обычно определяют конкретные стратегии в качестве более предпочтительных для стимуляции защитного иммунитета. Например, для вакцины, предназначенной для здоровых младенцев, очень важна минимальная реактогенность, а некоторые типы вакцин бесполезны для младенцев, поскольку они не стимулируют защитный иммунитет. Однако, уровень реактогенности менее важен в таких случаях, как терапевтическая противораковая вакцина. Знание иммунобиологии может помочь выявить природу защитного иммунитета, который должен стимулироваться вакциной; определенные иммунные реакции могут быть защитными, а другие – бесполезными для предотвращения или лечения конкретной инфекции. Например, выведение природной инфекции может коррелировать с появлением антител против определенного микробного антигена. Это определяет, что данный антиген является вероятным вакцинным иммуногеном. С другой стороны, исследование иммунобиологии значительным образом облегчается или становится возможным при разработке экспериментальной животной модели, наличие которой позволяет тестировать и оптимизировать возможные вакцины для достижения эффективной защиты, до того, как выводить лучшие из них в фазу клинических испытаний. Для конкретной вакцины имеется только ограниченный ряд технических подходов. Тем не менее, учитывая возрастающее количество технических подходов, в будущем, вероятно, будет возможно создавать многие вакцины «по заказу» для достижения оптимальной эффективности и переносимости.

### **6.1.1. Живые вакцины**

Некоторые живые вакцины значительно приближаются к «идеальной вакцине», будучи способными стимулировать защиту на всю жизнь с минимальной реактогенностью при использовании одной или двух доз. Такие вакцины могут быть доступны в случаях, когда природная инфекция дает хозяину защиту на всю жизнь. Такие вакцины состоят из микроорганизмов (обычно вирусов), которые реплицируются в организме хозяина таким же образом, как и природный микроорганизм, то есть вакцина может стиму-

лировать иммунную реакцию, аналогичную вызываемой природной инфекцией. Живая вакцина аттенуируется, что означает, что ее способность вызывать заболевание исключается. Необходимо обеспечить, чтобы живая вакцина не оставалась ни недостаточно аттенуированной (не сохраняла патогенность даже в минимальной степени), ни чрезмерно аттенуированной (не была недостаточно инфекционной для функционирования в качестве вакцины). Живые вакцины обычно вызывают как гуморальный иммунитет (антитела), так и клеточный (например, цитотоксические Т-лимфоциты).

Хотя эти свойства сами по себе делают живые вакцины весьма желаемыми, это является технически недостижимым для большинства вакцин, разрабатываемых в настоящий момент. Живая вакцина может быть недостаточно аттенуирована, и впоследствии вызывать свое природное заболевание с низкой частотой, или быть полностью аттенуированной, что в значительной степени снижает иммуногенность. Благодаря тому, что живая вакцина может реплицироваться, существует потенциальная возможность ее превращения в более свойственную ей патогенную форму. Живые вакцинные штаммы могут передаваться из вакцины не вакцинированному человеку, что может быть достаточно серьезным в случае, если реципиент обладает иммунодефицитом или подвергается химиотерапевтическому лечению рака.

### **Классические стратегии**

Термин «классические стратегии» касается технических стратегий, в которых не используется технология рекомбинантных ДНК. Производство живых вирусных вакцин основано на эффективном размножении вируса в клеточной культуре.

**Аттенуация *in vitro*.** Разработка живых аттенуированных бактериальных вакцин классическими методами путем культивирования бактерий *in vitro* для их аттенуации при сохранении иммуногенности является не всегда успешным. Конкуренционное или селективное давление на бактерии, делающее их менее вирулентными при пассировании *in vitro* может быть небольшим; бактерии могут прекратить экспрессировать факторы вирулентности *in vitro*, но вернуться к их экспрессии *in vivo* (реверсия).

Одна из широко распространенных живых бактериальных вакцин, основанная на серийных пассажах *in vitro* – это вакцина против туберкуле-

за. В первые десятилетия XX века важнейшей попыткой создания живых вакцин была разработка вакцины против туберкулеза. Она известна как БЦЖ – бацилла Кальметта – Герена (BCG), по имени двух французских ученых, получивших ослабленный штамм туберкулезных бактерий. Вакцина была получена в течение 13 лет путем многократных серийных пассажей (231 последовательный пересев – *in vitro*) штамма *Micobacterium bovis*. Вакцина состоит из живого аттенуированного штамма *Mycobacterium bovis*. БЦЖ фактически была первой живой бактериальной вакциной, в широких масштабах примененной на человеке (её повсеместное внедрение было отсрочено трагическим событием в Германии, где партия вакцины оказалась зараженной). Опыт показал, что вакцины, приготовленные из этих ослабленных туберкулезных бацилл, совершенно безопасны и с 1950 года в Великобритании и большинстве других стран начались широкие кампании по иммунизации школьников. Сегодня, иммунизация вакциной БЦЖ проводится у новорожденных на 3–7 день жизни внутривенно. Ревакцинацию проводят детям в возрасте 7 и 14 лет. Ежегодно вакциной БЦЖ прививаются около 100 млн. человек.

Вакцина БЦЖ представляет собой лиофилизированные живые микобактерии вакцинных штаммов, высушенные в стабилизаторе глутаминате натрия. В одной дозе 0,05 мг вакцины содержится  $1,5 \times 10^5$ – $6,0 \times 10^5$  живых микробных клеток. Всего зарегистрировано 16 субштаммов БЦЖ (известно более 30). Субштаммы различаются по морфологии клеток и колоний (от длинных палочек до кокковидных форм), остаточной вирулентности, иммуногенности, антигенному составу. Так, например, субштамм Токио-172, полученный в Японии характеризуется очень мелкими клетками, низкой остаточной вирулентностью, сниженной иммуногенностью и незначительной реактогенностью. Такие субштаммы принято называть «слабыми». «Сильные» субштаммы отличаются большей остаточной вирулентностью и высокой защитной способностью. В то же время эти штаммы более реактогенны (штаммы, используемые во Франции – Pasteur 1173 P2, Дании – Copenhagen 1331, Болгарии – Sofia SL 222 и др.). Вакцины, изготовленные из «сильных» субштаммов вызывают большой процент гнойных лимфаденитов при вакцинации. Ранее, в Украине использовали только вакцину, произведенную в России, в которой применен субштамм БЦЖ

(BCG – 1 Russia), содержащий 4 антигена, которые отсутствуют у большинства других субштаммов, занимающий при высокой иммуногенности среднее положение по остаточной вирулентности среди других субштаммов, т.е. при высоких защитных свойствах вакцина обладает невысокой реактогенностью. В настоящее время для вакцинации детей в Украине используют вакцину БЦЖ SSI производства Дании (Государственный серологический институт, штамм Copenhagen 1331, относящийся к более сильным штаммам).

Имеющиеся вакцины БЦЖ отличаются переносимостью, иммуногенностью и степенью эффективности защиты в клинических испытаниях. Вакцины БЦЖ обычно обладают приемлемыми профилями переносимости. Следует ожидать, что для аттенуации нового бактериального штамма будут применяться методики рДНК-технологии. Поэтому, учитывая имеющиеся технические и регуляторные стандарты, весьма маловероятно, что будет разработана новая живая бактериальная вакцина, аттенуированная с применением исключительно классической стратегии.

Применение первой классической стратегии для вирусов стало возможным в 1950-х гг., вместе с возможностью выращивания вирусов в культурах клеток. Этот подход является эмпирическим, т.е. вирус дикого типа, изолированный из человеческой инфекции, проходит пассажи *in vitro* через один или более тип клеток, с целью ослабления его патогенности. В таком случае может иметь место селективное давление в сторону меньшего повреждения клеток. Механизм, благодаря которому в ходе аттенуации вводятся мутации, ясен не до конца. В некоторых случаях (например, вирус полиомиелита) было возможно продемонстрировать аттенуацию на приматах, хотя в большинстве случаев аттенуация подтверждается лишь в ходе интенсивных клинических испытаний. Успех данного эмпирического подхода, который применялся как для вакцин для перорального введения (вакцина вируса полиомиелита (OPV) для перорального введения), так и для вакцин, вводимых инъекционным (парентеральным) путем (корь, эпидемический паротит, краснуха, ветряная оспа) подтверждается количеством имеющихся лицензированных вакцин. Реактогенность таких вакцин достаточно низка для того, чтобы некоторые из них (полиомиелит, корь) были широко приняты во всем мире в обычной педиатрической практике.



Благодаря интенсивным программам иммунизации OPV полиомиелит движется в сторону искоренения во всем мире.

**Реассортантные геномы.** Вирус-реассортант, полученный после совместного инфицирования культуры двумя разными вирусами с сегментированными геномами, содержит гены обоих родительских вирусов. Для повышения эффективности ротавирусов животных были изолированы ротавирусы-реассортанты, содержащие в основном гены ротавирусов животных, несущие фенотип аттенуации для человека, а также ген(ы) поверхностного белка ротавирусов человека, стимулирующие выработку серотип-специфических нейтрализующих антител ротавируса человека. Эти ротавирусы-реассортанты обладали большей эффективностью в качестве возможной вакцины, чем родительские вирусы животных. Квадривалентная реассортантная ротавирусная вакцина (на основе ротавируса резуса) была лицензирована в 1998 г. Однако, вследствие повышенного уровня проникновения в ткани (1 : 10000), наблюдавшегося сразу после иммунизации, применение вакцины было прекращено. Этот отзыв показывает, что безопасность является ключевой проблемой при разработке новых живых вакцин. Аналогичный подход был применен к вакцинам против гриппа, в которых новый отобранный вирус гриппа предоставлял гены, кодирующие иммуногенные поверхностные гликопротеины (гемагглютинин и нейраминидазу), а аттенуированный вирус обеспечивал все остальные гены, а также фенотип аттенуации. Такие вирусы гриппа – реассортанты могут быть адаптированы к росту в клеточных линиях млекопитающих, таких как MDCK12, в качестве клеточного субстрата вместо куриных яиц. Подавляющее большинство сезонных и пандемических вирусов имеют реассортантное происхождение. Это в первую очередь относится и к современному вирусу гриппа H1N1v-2009, вызвавшему пандемию гриппа. Поэтому применение живых гриппозных вакцин с целью предупреждения появления реассортантов с новыми свойствами ограничено на подъеме заболеваемости гриппом и тем более в условиях пандемии гриппа.

**Термочувствительные мутанты.** Вирусные мутанты могут отбираться по их способности к росту при различных температурах. Эти вирусы называются термочувствительными (ts), неспособными к росту при повышенных температурах, или адаптированными к холоду (ca), отобранными

ми по способности к росту *in vitro* при температурах ниже физиологических (37 °C), т.е. до 25 °C. Идея, воплощенная в этом подходе, заключается в том, что вирусы будут менее активными при росте *in vivo*, чем их родительские вирусы дикого типа, а следовательно, менее вирулентными и фенотипически аттенуированными. Живые гриппозные вакцины, впервые предложенные А.А. Смородинцевым в 1938 году, успешно применяются в России на протяжении многих лет. В США живая интраназальная вакцина была одобрена FDA в июне 2003 г. и разрешена для использования в возрастной категории от 5 до 49 лет. Благодаря многократным пассажам на куриных эмбрионах в условиях снижения температуры стало возможным получение ослабленного вируса, который не реплицируется при высоких температурах, характерных для легких человека, но способен размножаться в носоглотке при температуре 34 °C, вызывая локальную инфекцию, приводящую к выработке секреторного и генерализованного иммунного ответа. В связи с тем, что вакцинация живой гриппозной вакциной напоминает природную транзитную инфекцию, она обладает достаточно высокой эффективностью и по различным данным характеризуется 94 %-ной сероконверсией у детей, а в комбинации с инактивированной вакциной вызывает положительный иммунный ответ у 68 % пожилых людей.

**Химический мутагенез.** Еще одной методикой создания аттенуированного штамма является химический мутагенез с последующей селекцией. Таким образом, был получен штамм Ty21a *Salmonella typhi*, предназначенный для предотвращения брюшного тифа. Разрешение на использование аттенуированного штамма получено на основе данных о его безопасности и эффективности.

#### **Рекомбинантные вирусы**

Повышенная стабильность фенотипа аттенуации достигается вследствие создания модификаций или делеций в вирусных генах, достаточно обширных для того, чтобы возвращение к исходному состоянию путем обратных мутаций было невозможным или крайне маловероятным. В отличие от этого, аттенуированные вирусы, полученные с применением классических стратегий, могут иметь только точечные мутации, а следовательно, и способность к возврату в исходное состояние.

В гене вируса простого герпеса (HSV), кодирующем гликопротеин, необходимый для проявления инфекционности, была создана мутация. Данный гликопротеин вводится в вирус из клеточной линии в ходе культивирования *in vitro*, и благодаря этому полученный вирус может инициировать инфекцию *in vivo*, но не способен распространяться, что обеспечивает его молекулярную аттенуацию.

### **Рекомбинантные бактерии**

Конструировать аттенуированные бактерии сложнее, чем конструировать вирусы, учитывая значительно больший размер бактериальных геномов. Стратегия состоит в выявлении гена(-ов), ответственных за бактериальную вирулентность или колонизацию и выживание, а затем либо удаление гена (предпочтительный вариант), либо исключение или модулирование его экспрессии *in vivo*. Как и для вирусов, может существовать баланс между вирулентностью и активностью в качестве вакцины, что означает возможность чрезмерной аттенуации бактериального штамма до такой степени, когда он более не способен реплицироваться в достаточной мере для стимуляции эффективного иммунного ответа.

Аттенуация штаммов *V. cholerae* была проделана путем рДНК-направленной делеции генов, кодирующих факторы (такие как холерный токсин (СТ)). Живые аттенуированные возможные вакцины холеры, изготовленные таким способом, прошли клиническую оценку, и одна из них была лицензирована. Чтобы закрепить аттенуацию, снизив вероятность возврата в исходное состояние, желательнее делетировать два или более независимых гена или генетических локуса, участвующих в обеспечении вирулентности.

#### **6.1.2. Рекомбинантные векторы**

Другим применением технологии рДНК к разработке новых живых вакцин является конструирование вирусов в качестве векторов для «чужеродных» полипептидов других патогенных микроорганизмов. *Целью создания таких векторов* является презентация чужеродного антигена иммунной системе в контексте живой инфекции, чтобы иммунная система реагировала на антиген как на **живой** иммуноген, и таким образом вырабатывала более широкий иммунитет (гуморальный и клеточный) на соот-

ветствующий патогенный микроорганизм человека. Рекомбинантный полипептид экспрессируется в инфицированной клетке и либо транспортируется к клеточной поверхности с целью стимулирования выработки антител, либо распадается на пептидные фрагменты, которые транспортируются к клеточной поверхности. Данная стратегия также имеет потенциальное преимущество амплификации иммуногенного сигнала при репликации живого вектора.

**Вирусные векторы.** Прототипом вирусного вектора является вирус коровьей оспы. В вирусе коровьей оспы экспрессировали десятки различных рекомбинантных полипептидов. По меньшей мере, на 25 моделях для различных инфекций было показано, что вакцинация животных может защитить их от патогенного микроорганизма, кодирующего рекомбинантный полипептид. Рекомбинантные вирусы коровьей оспы, экспрессирующие опухолевые антигены, также обладали защитными функциями в исследованиях с введением антигенного стимула на модели рака грызунов. Учитывая известные осложнения иммунизации против оспы, более тяжелые у людей с ослабленным иммунитетом, вирус коровьей оспы был сам по себе сконструирован таким образом, чтобы снизить его вирулентность без уменьшения его эффективности как живого вирусного вектора. Цитокины могут оказывать влияние на природу или величину иммунной реакции. С целью селективного манипулирования типом иммунного ответа на вакцинный антиген в контексте вакцинации живым вектором, был сконструирован рекомбинантный вектор, экспрессирующий как цитокин, так и рекомбинантный вакцинный антиген. Вирусы оспы домашней птицы и канарейки разрабатываются в качестве живых векторов, способных инфицировать клетки человека, но не давать инфекционного вирусного потомства. Эта неспособность к распространению позволяет классифицировать данные вирусные векторы также как вакцины на основе ДНК.

Другие вирусы млекопитающих также послужили основой для конструирования живых векторов. Штаммы аденовирусов, которые широко используются в качестве вакцин среди военнослужащих с целью предотвращения острых респираторных заболеваний, были сконструированы таким образом, чтобы экспрессировать чужеродные полипептиды, и стимулировали защитный иммунитет на нескольких вирусных моделях антиген-

ного стимула у животных. Оптимизация экспрессии рекомбинантных полипептидов остается важной технической задачей для всех этих живых вирусных векторов.

РНК-вирусы могут быть сконструированы аналогичным образом. *Sindbis* и другие  $\alpha$ -вирусы пользовались повышенным вниманием благодаря их широкому спектру, способности инфицировать неделящиеся клетки, а также потенциально высокому уровню экспрессии в пересчете на клетку. Учитывая эти свойства, из *Sindbis* была разработана вакцина на основе нуклеиновой кислоты.

**Бактериальные векторы.** На основе патогенных бактерий можно сконструировать живые рекомбинантные векторы для экспрессии чужеродных полипептидных антигенов. Наиболее частым способом применения было конструирование желудочных патогенных организмов таким образом, чтобы они могли индуцировать иммунитет слизистых оболочек против чужеродного полипептида при его пероральном введении. В сфере разработки живых бактериальных векторов максимальные усилия, касающиеся разработки штаммов, иммунологии, молекулярных разработок и клинических испытаний были сконцентрированы на *S. typhi*, *V. cholera* и *S. flexneri* также были превращены в рекомбинантные векторы для перорального введения для клинической оценки. Проблемой таких живых аттенуированных векторов остается сохранение достаточной вирулентности для репликации в пищеварительном тракте и экспрессия чужеродных полипептидов на необходимом уровне, а также достижение достаточной аттенуации для обеспечения хорошей переносимости. Способность некоторых из этих видов бактерий реплицироваться внутри клетки может усилить способность экспрессируемых чужеродных полипептидов стимулировать клеточные иммунные реакции против соответствующих патогенных организмов.

### 6.1.3. Субъединичные / инактивированные вакцины

Преимущество субъединичных вакцин состоит в их неспособности размножаться в организме хозяина. Обычно они хорошо переносятся, особенно вакцины, подвергающиеся многоступенчатой очистке с целью удаления других макромолекул. Иммуногенность такой вакцины можно усилить путем ее совместного введения с адъювантом или при помощи систе-

мы доставки. Тем не менее, следует начинать программу разработки с пониманием того, что для достижения длительного защитного иммунитета требуется неоднократное введение вакцины, зачастую – с последующим введением бустерных доз. Такие вакцины обычно функционируют путем стимулирования гуморальной иммунной реакции, а также инициирования иммунологической памяти.

Необходимо отметить, что *конструирование рекомбинантных вирусных вакцин* включает в себя:

- клонирование и экспрессию в различных векторах индивидуальных вирусных генов с целью получения вирусных антигенов в различных экспрессионных системах в качестве высокоочищенных вакцинных препаратов;
- клонирование и экспрессию индивидуальных вирусных антигенов с целью получения вирусоподобных частиц;
- клонирование и экспрессию вирусных антигенов в эукариотических векторах с целью получения ДНК-вакцин.

Для рассмотрения данного вопроса остановимся на противогриппозных вакцинах. На поверхности вирусной частицы локализуются следующие белки-антигены: гемагглютинин (H), нейраминидаза (N) и белок M2. Установлено, что в «головке» апикальной части молекулы H локализуется 5 антигенных сайтов и вируснейтрализующая активность антител связана с иммунным ответом на эти сайты. Антитела к H блокируют взаимодействие вируса с клеточными рецепторами, т.е. инфицирование клеток. Антитела к N блокируют выделение вирусов инфицированными клетками (т.е. распространение инфекции). Антитела к белку M2 также в значительной степени блокируют отсоединение инфекционных вирусных частиц от мембран инфицированных клеток. Исходя из вышесказанного ясно, что из трех основных поверхностных белков принципиальное значение имеет H. Это и лежит в основе технологии производства субъединичных вакцин, содержащих преимущественно H. Считается, что иммунитет на N имеет вспомогательное значение. Белок M2 в силу высочайшей консервативности стал объектом для конструирования универсальной вакцины против гриппа А.

Таким образом, рекомбинантные вакцины с использованием индивидуальных компонентов вирусов гриппа типа А ориентированы главным

образом на ключевой и сильно вариабельный компонент вируса – молекулу Н. Из внутренних антигенов вирусной частицы активно рассматриваются в качестве материала для получения вакцин белки NP, M1, NS1.

#### **6.1.4. Цельные патогенные организмы**

Самый ранний подход к изготовлению инактивированных вакцин состоит в использовании целых бактерий или вирусов с целью стимулирования образования антител ко многим антигенам, некоторые из которых смогут нейтрализовать патогенный организм.

**Бактерии.** Эти вакцины изготавливаются путем культивирования бактерий, сбора клеток и их инактивации при помощи нагрева или химических агентов, таких как мертиолят или фенол, формалин. Конечная вакцина не подвергается дальнейшей очистке. Благодаря отсутствию очистки таких вакцин, которые содержат практически все бактериальные клеточные компоненты (а также продукты метаболизма и следовые количества питательных сред), реактогенность таких вакцин при их парентеральном введении (например, *Bordetella pertussis* или *St. aureus*) обычно выше, чем у других типов вакцин. С другой стороны, инактивированные цельноклеточные вакцины *V. cholerae* и энтеротоксигенной *Escherichia coli* (ЕТЕС) хорошо переносятся при пероральном введении. Пероральная инактивированная цельноклеточная вакцина холеры (WCC), лишенная токсина (и его токсического воздействия) оказалась хорошо переносимой, а ее уровень эффективности составил примерно 60 % при испытании на популяции высокого риска в течение 3-х лет. Для стимуляции антител, которые смогут нейтрализовать токсины и повысить эффективность, рекомбинантная В-субъединица токсина, не обладающая активностью токсина, независимо экспрессируется, очищается, и вновь добавляется к вакцине WCC. Показано, что эта комбинированная вакцина WCC + г-токсин имеет несколько более высокий уровень эффективности, чем сама вакцина WCC.

**Вирусы.** Некоторые инактивированные вирусные вакцины используются уже в течение десятилетий, и обычно хорошо переносятся. Поскольку вирусы при выращивании *in vitro*, как правило, выходят в клеточную культуральную среду, то собирают среду от инфицированных культур, не содержащую клеток. Крупный размер частиц вирусов в сравнении с

другими макромолекулами среды позволяет легко отделить частицы с использованием простых технологий очистки, построенных на разделении частиц по размеру. К примерам таких вакцин относятся вирус полиомиелита, вирус гриппа, вирус бешенства и вирус японского энцефалита. В альтернативном подходе, применяемом в случае убитой вирусной вакцины гепатита А (HAV), инфицированные клетки подвергаются лизису и проводят очистку вирусных частиц. Вирусные частицы инактивируются химическим путем, обычно при помощи обработки формалином, а затем их действие может усиливаться за счет адьювантов (например, гидроокиси или фосфата алюминия). Возможно использование липосом для усиления иммуногенности вирусных вакцин. Защитные эпитопы на поверхности многих не капсулированных мелких вирусов, стимулирующие защитную иммунную реакцию часто имеют конформационную структуру, будучи сформированными из высокоорганизованной совокупности структурных белков в антигенные структуры. Для большинства перечисленных вирусов, для которых были разработаны и зарегистрированы инактивированные вакцины, оказалось невозможным полностью воссоздать конформацию таких эпитопов при помощи других технологий, например, рекомбинантных полипептидов. Инактивированные вирусные вакцины обычно обладают высокой иммунологической активностью, например, 1 доза вакцины гепатита А обеспечивает защиту в количестве 50 нг. Таким образом, эта классическая стратегия, характеризующаяся безупречной историей создания хорошо переносимых и эффективных вакцин, остается весьма перспективной технологией, избираемой для многих вирусных вакцин.

#### **6.1.5. Белковые вакцины**

Разработка вакцины на основе белка является предпочтительной стратегией для многих патогенных организмов, в которых полипептид содержит защитные эпитопы, учитывая вышеуказанные моменты, касающиеся инактивированных вакцин. Подходы, берущие за основу белок, построены на генетических, биохимических и иммунологических методиках, позволяющих выявлять защитные эпитопы и их соответствующие полипептиды как возможные вакцинные антигены.

В последнее время биотехнологи, вместо ранее необходимых биохимических данных или информации об антигенах, позволяют выявлять новые вакцинные антигены. Как только получена полная последовательность (или ее части) геномной ДНК или РНК, выявляются открытые рамки считывания. Полученную аминокислотную последовательность можно проверить на наличие структурных свойств, таких как гомология с белками других родственных патогенных организмов, являющихся кандидатами для создания вакцин, или гидрофобные N-концевые последовательности, предполагающие поверхностную локализацию. Гены экспрессируются в рекомбинантных клетках хозяина (обычно *E. coli*), а рекомбинантный полипептид очищается и используется для иммунизации животных с целью получения поликлональных антител, чтобы выявить, вырабатывается ли патогенным организмом данный гипотетический белок. Антисыворотку можно использовать также для биологических анализов (нейтрализация вирусов, опсонизация бактерий), чтобы проверить, может ли данный белок быть привлекательным кандидатом для создания вакцины. Новый белок может также использоваться для иммунизации и контрольного заражения животной модели. Некоторые из ранних приложений технологии геномики к вирусам имели целью выявление вируса гепатита С (HCV) и вируса гепатита Е (HEV), что привело к непосредственному определению вероятных вакцинных антигенов. Геномный подход был применен и к *Neisseria meningitidis*, в ходе чего было обнаружено несколько вероятных вакцинных антигенов.

**Природные источники антигенов.** Первые вакцины на основе белка были построены на природных источниках антигенов. В данном отношении уникальна вакцина гепатита В первого поколения. Уникальность состоит в том, что в ней в качестве источника вакцинного антигена используется ткань человека (плазма).

Гепатит В – заболевание, передающееся парентеральным или половым путем и являющееся 9-ой причиной заболеваемости и смертности на планете. Инфицирование вирусом гепатита В вызывает различные клинические проявления: молниеносную, острую, хроническую и скрытую формы гепатита. Молниеносная и острая формы являются крайне тяжелыми, и дают высокую смертность. Хронический гепатит несет ответственность за

распространение вируса и потенциально может развиваться в цирроз и рак печени. Каждый год умирает более миллиона хронических вирусоносителей. Вакцинопрофилактика является единственным эффективным способом предупреждения этого заболевания.

Первоначально была создана вакцина для профилактики гепатита В, получаемая из плазмы человека. Весьма интересен опыт, накопленный в ходе создания инактивированной вакцины против вируса гепатита В, который, как известно, не культивируется *in vitro* и не размножается в организме пригодных для широкого использования животных. Клетки печени людей, хронически инфицированных вирусом гепатита В, выделяют избыток вирусного поверхностного белка, т.е. поверхностного антигена гепатита В (HBs-Ag) в кровь в виде вирусоподобных частиц размером 22 нм с защитными эпитопами. Поэтому для производства вакцины было предложено извлекать из плазмы клинически здоровых антигеноносителей поверхностный антиген (HBs-Ag), очищать и концентрировать его, а затем инактивировать формалином. Антиген выделяли с помощью ультрацентрифугирования, хроматографии и ферментативной обработки. Полученный препарат подвергали инактивации для уничтожения вируса гепатита В и других потенциально патогенных контаминантов для организма человека. Препарат проходил клинические испытания в США, Франции, Англии, Голландии, Японии. Однако, в связи с технологическими трудностями при получении вакцины, ограниченностью в сырье и возможности контаминации препарата, эта вакцина не получила широкого применения.

С 1987 г. стали доступны две рекомбинантные вакцины, вырабатываемые дрожжами и содержащие главный поверхностный белок вируса гепатита В – S-белок (HBs-Ag), производимые лидерами производства вакцин: «Merck Sharp Dohme» (США) и «Smith Kline Beecham» (Бельгия). Оценка, проведенная FDA, признала безопасность вакцины против гепатита В на основе исследования 12 млн. доз, введенных детям в возрасте до 12 месяцев. Вакцина продемонстрировала высокую эффективность для защиты от гепатита В. В настоящее время, рекомбинантную вакцину для профилактики гепатита В выпускают: «GlaxoSmithKline» (Бельгия), «Heberbiotec» (Куба), «Berna Biotech» (Корея), «Instituto Butantan» (Бразилия), Научно-производственная компания «Комбиотех» (Россия) и ряд

других производителей. В Украине данная вакцина входит в перечень обязательных прививок.

Белки, очищенные из культур *B. pertussis*, комбинируются для создания неклоточных вакцин против коклюша, которые со временем должны заменить цельноклеточную вакцину коклюша для текущих педиатрических вакцинаций во многих развитых странах. В зависимости от количества различных белковых антигенов, эти вакцины называют одно-, двух-, трех-, четырех- или пятикомпонентными вакцинами. Данные вакцины были зарегистрированы на основании недавних исследований эффективности. Все эти вакцины содержат в качестве компонента токсид коклюша, подготовка которого описана ниже.

**Химическая инактивация.** Многие бактерии вырабатывают белковые токсины, ответственные за патогенез инфекции. Уже несколько десятилетий назад стало известно, что если токсин после инфицирования оставался патогенным, антитоксины (антисыворотка, обогащенная токсинспецифическими антителами), являвшиеся эффективными в нейтрализации активности токсина *in vivo*, могут предотвратить или изменить в лучшую сторону симптомы некоторых бактериальных инфекций. Этот прецедент послужил основой для введения бактериальных токсинов в состав активных вакцин. Молекулы токсина очищаются из бактериальных культур (например, *Corynebacterium diphtheriae* (D), *Clostridium tetani* (T), *B. pertussis* (P)), а затем проходят детоксикацию путем инкубации с таким химическим реагентом, как формалин или глутаральдегид. Токсины, лишённые токсических свойств, называемые *токсоидами* (анатоксинами), представляют собой две части (D, T) комбинированной вакцины против дифтерии, столбняка и коклюша (DTP). PT45, совмещенный с другими антигенами коклюша, составляет ацеллюлярные коклюшные вакцины. В основе процесса обезвреживания токсина заложен принцип необратимого изменения участка его белковой молекулы, ответственного за проявление токсичности, при полном сохранении антигенной активности. Например, метод детоксикации дифтерийного токсина формальдегидом при температуре 37 °C был предложен Рамоном в 1924 году. При изучении механизма анатоксинаобразования было установлено, что *процесс перехода токсина в анатоксин проходит в два этапа*.

*Первый этап* связан с реакцией между формальдегидом и NH<sub>2</sub>-группами белка. При этой реакции образуется метилоаминная группа. На этом этапе детоксикация дифтерийного токсина протекает очень быстро; уже в 1–2-е сутки наблюдается снижение токсичности на 95 %. Однако такое обезвреживание обратимо, и если из препарата удалить избыток формалина, токсичность восстанавливается (реверсия).

*На втором этапе* происходят внутримолекулярные реакции: метилоаминные группы взаимодействуют с некоторыми активными радикалами аминокислот (амидные, индольные, фенольные и др. группы), что приводит к созданию стабильных метиленовых мостиков. Стабильного обезвреживания можно добиться только после второго этапа формальдегидной детоксикации – образования метиленовых групп. Второй этап необратим. Он протекает достаточно медленно (20–40 суток) при температуре 39–40 °C в зоне нейтральных или слабо щелочных значений pH и завершается образованием дифтерийного анатоксина. Необходимо бы отметить, что условия детоксикации токсинов специфичны для каждого вида токсина.

**Генетическая инактивация.** Химическая процедура получения анатоксинов имеет определенные недостатки, в том числе изменение защитных эпитопов, ведущее к снижению иммуногенности, и потенциальный возврат к биологически активному токсину (реверсия). Для получения стабильных анатоксинов коклюша создавалась мутация кодонов аминокислот, требуемых для биологической активности токсина (аденозиндифосфат (ADP) рибозилтрансфераза). Измененный ген заменил собой нативный ген в родительском организме, на основе которого затем был получен иммуногенный, но стабильно инактивированный анатоксин коклюша. В усовершенствованном варианте этой стратегии в токсин коклюша были введены две мутации для обеспечения невозможности возврата в исходное состояние. Этот двойной мутант коклюшного токсина, который также обрабатывается формалином в более мягких условиях, чтобы улучшить его иммуногенность или стабильность, является компонентом ацеллюлярной вакцины коклюша. В близком к этому варианту применения, мутантные культуры *C. diphtheriae* скринировались для выявления секретиции ферментативно неактивных, но антигенных молекул анатоксина. После-

дующее клонирование и секвенирование одного из таких мутантных генов токсина выявило мутацию одной аминокислоты в ферментативно активном сайте (также ADP-рибозилтрансферазы). Этот генетический анатоксин (CRM197)<sup>47</sup> является белком-носителем лицензированной конъюгированной вакцины *H. influenzae* тип *b* (Hib). Данная технология применялась также к токсину *V. cholerae* (СТ) и др.

**Рекомбинантные полипептиды.** Первым применением технологии рДНК при производстве вакцин было создание вакцины против гепатита В. С учетом того, что полученный из крови HBsAg проявил себя как хорошо переносимая и эффективная вакцина, ген S, кодирующий HBsAg, экспрессировали в пекарских дрожжах *S. cerevisiae*, что приводило к образованию частиц HBsAg размером 22 нм внутри клеток. Поверхность HBsAg подобна поверхности вирионов HBV. Вакцина, полученная из дрожжей, доступная во всем мире в больших количествах, в значительной мере вытеснила настолько же эффективную и хорошо переносимую вакцину на основе плазмы. Кроме того, HBsAg экспрессировали в трансгенных листьях табака и клубнях картофеля. Выделенный и очищенный HBsAg сохранял высокую иммуногенность.

Сейчас проводятся многочисленные научные исследования и разработки применения технологии рДНК к производству белков – возможных компонентов вакцин. Основной поверхностный белок *Borrelia burgdorferi* (OspA), экспрессированный в *E. coli* в виде рекомбинантного липопротеина, был зарегистрирован в качестве вакцины против болезни Лайма. Полученные рекомбинантным путем гликопротеины HSV, экспрессированные в клетках яичников китайского хомяка (CHO) и введенные в вакцину, были исследованы в клинических испытаниях.

Чаще всего крупные частицы более иммуногенны, чем отдельные полипептиды. Более того, как и в случае VLP HBsAg, частицы обычно стимулируют выработку антител на конформационные эпитопы частицы, в то время как изолированные поверхностные полипептиды частицы могут не стимулировать продуцирование таких антител. Вирион человеческого вируса папилломы (HPV) – это высокоорганизованная структура, основным белком которой является L1. Экспрессия L1 в эукариотических клетках (например, *S. cerevisiae*) приводит к образованию VLP L1, который по-

сле иммунизации стимулирует выработку антител, которые связываются с вирионами. Рекомбинантные VLP ротавируса и парвовируса также экспрессировались в виде потенциальных родительских вакцин.

Многие клетки хозяев использовались для экспрессии гетерологичных рекомбинантных генов. В дополнение к указанным ранее (*E. coli*, *S. cerevisiae* и CHO), были разработаны системы экспрессии для клеток из других видов бактерий и дрожжей, а также других стабильных клеточных линий (CCL) млекопитающих, например, клетки почки африканской зеленой марышки (*Vero*). Целые животные и растения также могут использоваться в качестве хозяев для рекомбинантной экспрессии. В целом, более мелкие белки, не требующие посттрансляционных модификаций, могут эффективно экспрессироваться в исходной форме в микробных системах экспрессии. В отличие от этого, полипептиды, которым для иммуногенности требуются посттрансляционные модификации, например гликозилирование для надлежащей иммуногенности, экспрессируются в CCL млекопитающих, способных к правильному осуществлению таких модификаций.

*Новым подходом в области рекомбинантных вакцин является применение частиц дрожжей Tu* в качестве убитых носителей чужеродных белков. *Дрожжевая Tu* – это частица, собираемая в *S. cerevisiae*, которая не способна к репликации в организме млекопитающих. Можно экспрессировать ген, кодирующий чужеродный белок, совместно с генами Tu таким образом, что чужеродные белки вместе с белками Tu будут собираться в смешанные частицы. Благодаря тому, что чужеродные белки экспрессируются на поверхности этих крупных частиц, их иммуногенность в качестве вакцинных антигенов может быть усилена.

**Носители, основанные на белках.** Во многих случаях было возможно идентифицировать в составе полипептида В-клеточные эпитопы, против которых направлено действие нейтрализующих антител. Многие В-клеточные эпитопы являются конформационными, образующимися вследствие наложения в трехмерном пространстве остатков аминокислот из различных частей полипептида, что означает, что данным эпитопам для надлежащей иммуногенной презентации требуется полный полипептид. В отличие от этого, другие пептидные эпитопы линейны по своей природе, и обладают всеми антигенными свойствами даже в виде коротких линейных

последовательностей длиной порядка 6–20 последовательных аминокислотных остатков полипептида. Некоторые линейные эпитопы обладают слабой иммуногенностью при их презентации на фоне полного полипептида. В других случаях природные пептиды были бы эффективными вакцинами антигенами, если бы их можно было сделать достаточно иммуногенными. Линейные В-клеточные эпитопы данного типа были определены для малярийного белка сиркумспорзойте (CS) (повторная последовательность, состоящая из 4-х аминокислотных остатков) и для белка пилуса *Pseudomonas aeruginosa*. Оба эти полипептида содержат линейные эпитопы, распознаваемые антителами, которые нейтрализуют соответствующие патогенные микроорганизмы, однако целые полипептиды лишь слабо стимулируют выработку таких антител. Интересно предположение, что это явление может представлять собой механизм, при помощи которого эти и другие патогенные организмы эволюционировали с целью избегания иммунологического контроля, делая свои эпитопы нейтрализации менее иммуногенными.

Применение следующих стратегий (слитый белок, конъюгат, комплексный пептид) к слабо иммуногенным линейным эпитопам привело к иммуногенным презентациям, стимулирующим значительно более высокие титры нейтрализующих антител в сравнении с теми, которые стимулируются эпитопами, презентированными на фоне природного целого полипептида. Тем не менее, наиболее эффективная стратегия по показателям конечной клинической пользы должна определяться в зависимости от конкретного случая.

**Носители, основанные на слитом белке.** Иммуногенность линейных эпитопов можно повысить при помощи генетического слияния определенных эпитопов с белком-носителем, который формирует крупную частицу с целью улучшения иммунной презентации пептида. Двумя обычно используемыми белками – партнерами по слиянию такого типа являются HBsAg и ядерный белок гепатита В (частица размером 28 нм, кодируемая вирусом гепатита В). Слияние может происходить по N-концу, C-концу или внутренней части полипептидной последовательности белка-партнера, в зависимости от того, какое расположение обеспечивает наилучшую им-

муногенную презентацию при сохранении эффективного формирования частиц.

**Носители, основанные на конъюгатах.** Пептид может быть химически конъюгирован с белком-носителем. Пептидная последовательность синтезируется химическим путем вместе с реактивным аминокислотным остатком, при помощи которого происходит конъюгация с белком-носителем. Наиболее часто используемыми белками-носителями в конъюгатах являются бактериальные белки, с которыми часто сталкивается человек, такие как столбнячный токсин (ТТ), конъюгат которого с малярийным эпитопом CS прошел клинически испытания.

**Носители, основанные на комплексном пептиде.** Можно синтезировать мультимеры пептидной последовательности для совместного связывания в повторяющиеся массивы, что применяется для пептидных эпитопов малярийного CS и gp120 HIV-1.

**Носители, основанные на Т-клеточных эпитопах.** Пептидные эпитопы, распознаваемые CTL, могут быть полезными иммуногенами для профилактики инфекций, вызываемых такими возбудителями, как HIV, или для иммунотерапии хронических заболеваний, таких как гепатит В. Эпитопы пептида CTL обычно являются слабыми иммуногенами. Поэтому для иммунотерапевтической вакцины гепатита В эпитоп CTL из ядерного белка HBV был модифицирован путем ковалентного связывания с Т-хелперным эпитопом (из токсина столбняка), а также с двумя молекулами пальмитиновой кислоты. В ходе клинических испытаний было показано, что данная вакцина обладает достаточной иммуногенностью для стимуляции HBV-специфических CTL и CTL памяти. Меланома-специфические Т-клеточные эпитопы в виде пептидов использовались в импульсной обработке дендритных клеток *in vitro* для доставки пациенту. При этом наблюдалось некоторое снижение размера опухоли.

**Носители, основанные на полисахаридах.** Ряд грамотрицательных и грамположительных бактерий образуют капсульную структуру, содержащую полисахариды (ПС). Способность бактерий к образованию капсул в значительной степени определяет взаимодействие между бактериальными клетками и организмом хозяина при развитии инфекционного процесса. Капсульные антигены играют важную роль в вирулентности и иммуноген-



ности бактерий. Имеется зависимость между наличием у бактерий капсулы и их токсичностью. Установлено, что гемолитическая активность также свойственна преимущественно капсульным формам бактерий. Капсульные антигены способны подавлять фагоцитоз бактерий и создавать условия для размножения возбудителей инфекции в организме хозяина. Капсульные полисахариды несут в себе основную серологическую антигенность бактериальных видов и успешно взаимодействуют с антителами к данным бактериям. Такие полисахариды представляют собой эффективные вакцинные антигены. В качестве примера использования полисахаридных вакцин можно привести препарат, содержащий очищенные капсульные полисахариды *Streptococcus pneumoniae* (Pneumo 23 – PPV 23). Вакцина поливалентна и содержит полисахариды из 23-х серотипов бактерий. Вакцина PPV 23 (Sanofi Pasteur) эффективна против 90 % нечувствительных к пенициллину пневмококков и 96 % пневмококков, вызывающих заболевания. В некоторых случаях для конкретного патогенного организма имеется единственный серотип полисахарида, например, Haemophilus influenzae типа b (Hib) против инвазивного менингита H. Influenzae типа b. В этом случае можно создать моновалентную вакцину. Однако в большинстве случаев имеют место многочисленные серотипы капсульных полисахаридов (около 90 для *Streptococcus pneumoniae*), и такие вакцины должны быть мультивалентными, чтобы обладать достаточно высоким уровнем общей эффективности. Эти вакцины первого поколения были просто очищенными полисахаридами и обладали низкими протективными свойствами.

Гемофильная инфекция (возбудитель – Haemophilus influenzae b) является основной причиной гнойного менингита у детей до двух лет жизни, который часто приводит к серьезным неврологическим осложнениям и летальным исходам. Кроме менингита Haemophilus influenzae b вызывает перикардиты, эндокардиты, перитониты и другие гнойно-септические заболевания. Заражение происходит воздушно-капельным путем. По данным ВОЗ ежегодно от данных инфекций умирает около 500000 детей во всех странах мира.

Во многих, если не в большинстве изученных инкапсулированных бактерий, антитела, направленные против капсульных ПС, способны за-

щищать от инфекции. Эти наблюдения позволили использовать капсульные ПС в качестве вакцинных антигенов.

### 6.1.6. Индивидуальные полисахаридные вакцины

Нативный капсульный ПС содержит до сотен повторяющихся единиц, характерных для каждого вида бактерий и антигенного подтипа, в котором каждый мономер состоит из сочетания моносахаридов, фосфатных групп и мелких органических компонентов. ПС высвобождаются организмом по мере его роста и собираются из культуральной среды. Эти препараты ПС обычно обладают иммуногенностью для взрослых и детей старше 2-х лет и стимулируют выработку антител, которые могут опосредовать опсонизацию организма, таким образом, защищая его от инфекции. Вакцины ПС лицензированы для Hib64 (моновалентные для серотипа b), *Neisseria meningitides* (квадривалент) и *Streptococcus pneumoniae* (23-валентный). Недостаток этих вакцин состоит в том, что ПС, будучи иммуногенами, *независимыми от Т-клеток* (TI), обладают слабой иммуногенностью или не обладают иммуногенностью у детей младше 2-х лет, и не стимулируют иммунологическую память у старших детей и взрослых.

**Конъюгированные вакцины.** Хотя дети младше 2-х лет не могут эффективно распознавать иммуногены TI, они могут проявлять иммунологические реакции на *зависимые от Т-клеток* (TD) иммуногены, например, белки. Химическая конъюгация ПС с белком-носителем превращает ПС из TI в TD иммуноген. Вследствие этого, вакцины в виде конъюгата Ps-белок могут стимулировать защитный иммунитет IgG и иммунологическую память у младенцев и маленьких детей. Данная стратегия особенно важна для инкапсулированных бактерий, таких как Hib и *S. pneumoniae* (пневмококковые; Pn), вследствие преобладания инвазивных заболеваний, вызываемых этими бактериями у детей младше двух лет, для которых вакцина ПС неэффективна.

Первая лицензированная вакцина Haemophilus influenzae b (Hib) содержала полирибосилрибатолфосфат (PRP), полисахарид капсулы микроорганизма. Однако полисахаридная вакцина была недостаточно иммуногенна для детей младше 2-х лет. В связи с этим она была разрешена к ис-

пользованию только для детей старше 18 месяцев. Изучение в Финляндии (1977 г.) подтвердило значительное снижение НІв-заболеваний и эффективность PRP-вакцины в 90 % случаев. В то же время изучение вакцины в США показало её менее надежную эффективность. В результате этих исследований и существенной потребности иметь вакцину для малолетних детей начались разработки по созданию конъюгированных вакцин. Такие конъюгированные вакцины, в которых НІв-полисахарид связан с белком, обладают рядом преимуществ:

- ✓ индуцируют высокие титры антител;
- ✓ более иммуногенны для малолетних детей;
- ✓ демонстрируют высокий иммунный ответ при ревакцинации.

В 1989 году было разрешено к использованию у детей младше 18 месяцев четыре конъюгированных вакцин:

- ❖ PRP-D – содержала полисахарид, конъюгированный с дифтерийным анатоксином;
- ❖ НЬОС – содержала полисахарид, конъюгированный с нетоксичным мутантным дифтерийным токсином, известным как CRM197;
- ❖ PRP-OMR – содержала полисахарид, конъюгированный с белком наружной мембраны *Neisseria meningitidis*;
- ❖ PRP-T – содержала полисахарид, конъюгированный со столбнячным анатоксином.

Доза каждой вакцины составляет 0,5 мл.

Вакцины содержат различное количество полисахарида и конъюгированного белка, причем соотношения полисахарида к белку значительно отличаются (см. табл. 14). Изучение иммуногенных свойств четырех вакцин в процессе трех иммунизаций продемонстрировало существенные отличия в продукции антител.

Таблица 14 – Состав комбинированной вакцины *Haemophilus influenzae b* (НІв)

Название вакцины	Количество полисахарида в 1 дозе, мкг	Название протеина	Количество протеина в 1 дозе, мкг	Соотношение полисахарид – протеин
PRP-D	25	Анатоксин дифтерийный	18	1,38
НЬОС	10	CRM197	25	0,4
PRP-T	10	Анатоксин столбнячный	20–30	0,33–0,5
PRP-OMP	7,5	<i>Neisseria meningitidis</i>	125	0,06

Структура капсульного полисахарида, играющего важную роль в вирулентности бактерии *Haemophilus influenzae*, установлена как 3-В-D-рибофунарозил (1-1)-D-рибитол-5-фосфат.

Таким образом, сегодня на рынке вакцин присутствует четыре различных лицензированных вакцины – конъюгатов НІв. Все они имеют разные белки-носители (ТТ, DT, CRM197 и внешний мембранный белковый комплекс *N. meningitidis* группы В) с разными размерами и иммунологическими параметрами, различные длины цепи Ps и различные технологии конъюгации. Учитывая эти различия, *четыре вакцины имеют одно или более различий по следующим иммунологическим свойствам*: реакция 2-х месячных младенцев на первую дозу вакцины; реакция 4-х и 6-ти месячных младенцев на вторые и третьи дозы; реакция детей старше 1 года на бустерную дозу; кинетика снижения уровней антител; пик титра антител и возраст, в котором может впервые проявиться защита от клинического заболевания.

Бактерия Pn (пневмококковая) состоит примерно из 90 серотипов, что отражается в отличных структурах капсулярных ПС. Для создания педиатрической конъюгированной вакцины Pn было определено 7 серотипов,

ответственных за 60–75 % основных педиатрических заболеваний Pn (острый средний отит, пневмония, менингит). Недавно была лицензирована семивалентная вакцина. Другие вакцины, проходящие расширенные клинические испытания, состоят из смесей до 11 отдельных конъюгатов Pn ПС.

#### **6.1.7. ДНК вакцины. Вирусная и бактериальная доставка**

Новый подход, позволяющий индуцировать у организма иммунный ответ без введения антигена, основанный на включении в клетки животного-мишени гена, кодирующего белок-антиген привел к появлению нового типа вакцин – ДНК-вакцин. Обнаружено, что фрагменты ДНК вирусов и бактерий, имплантированные в клетки животных, способны синтезировать собственные белки. Сами клетки, получившие гены другого организма, в ответ начинают вырабатывать антитела на вновь синтезируемые белки. Эксперименты по созданию ДНК-вакцин преимущественно ведутся с бактериальными плазмидами – небольшими стабильными кольцевыми ДНК, которые содержатся вне хромосом. Плазмиды хороши в том плане, что сами по себе не провоцируют развитие инфекции. Их используют в качестве вектора – средства доставки. Для того чтобы вызвать необходимый иммунный ответ, выделенные из бактерий плазмиды модифицируют, внося определенные изменения в структуру ДНК, а именно, «вшивают» гены, которые кодируют один или несколько определенных белков-антигенов, вырабатываемых конкретными вирусами или бактериями. Так же встраиваются в плазмиду гены, необходимые для обеспечения экспрессии всей конструкции. Очень важно, что фрагменты ДНК, ответственные за воспроизводство и развитие инфекционного процесса в плазмиды не вводятся.

Одной из стратегий было внутримышечное введение раствора ДНК, кодирующего вакцинный антиген. Клетки поглощают плазмидную ДНК, транскрибируют ее и синтезируют антиген, который может проходить такую же обработку, как и в процессе вирусной инфекции. *Преимуществами использования ДНК* являются относительная техническая простота изготовления и возможность направлять синтез многочисленных копий мРНК туда, откуда следует ожидаемое усиление как синтеза антигена, так и иммунной реакции. Такие вакцины проявили свою эффективность на многих

животных моделях инфекции, особенно вирусных моделях. В поисках нового пути доставки ДНК без оболочки наносили на кожу мышей, откуда она поглощалась волосяными фолликулами с целью стимуляции иммунного ответа. Хотя ДНК без оболочки и оказывает стимулирующее воздействие на выработку специфических антител, она особенно эффективно стимулирует клеточные иммунные реакции.

Особо необходимо остановиться на *вирусной доставке ДНК-вакцин*. Все вышеуказанные вакцины на основе нуклеиновых кислот приводят к помещению плазмиды в клетку. С целью доставки ДНК при помощи вируса оспы домашней птицы экспрессионная кассета рекомбинантного белка интегрируется в вирусный геном. Эти птичьих поксвирусы могут инфицировать клетки млекопитающих (человека), но не могут продуцировать инфекционный вирус, следовательно, данный подход можно считать основанным на нуклеиновых кислотах. Этого единственного цикла самоограничивающейся инфекции может быть достаточно для стимуляции широкого иммунитета против патогенного организма, рекомбинантный полипептид которого экспрессируется этими птичьими поксвирусами в инфицированных клетках, в то время как реактогенность должна быть минимальной, учитывая неспособность вируса распространяться в организме хозяина. Одним из вариантов конструкции экспрессионной плазмиды является применение системы экспрессии ДНК на основе вируса, который может повышать уровень РНК и белковой экспрессии, что происходит при живой вирусной инфекции, как было разработано для вирусных векторов *Sindbis*.

Использование векторов для конструирования и производства вирусоподобных частиц в качестве вакцин является весьма перспективным. Аденовирусы многие годы используются в качестве инструмента в модельных исследованиях по генотерапии. В последние годы преимущества векторов на основе аденовирусов привлекают специалистов в области конструирования рекомбинантных вакцин. Особенно ценной является высокая продуктивность аденовирусов и высокая эффективность переноса генов и экспрессии. Векторы для вакцин конструируются с делециями по ранним генам E1 и E2. В ряде исследований аденовирусные векторы используют для экспрессии индивидуальных вирусных антигенов и, в частности, гемагглютининов вирусов гриппа. Серьезным недостатком этих векторов является наличие в популяции людей широко распространенного иммуните-

та, что приводит к быстрому ограничению экспрессии целевых антигенов. От 15 до 25 % популяции людей в эпидемические периоды страдают аденовирусной инфекцией. Наиболее сильным антигеном среди белков аденовируса является гексон, антитела к которому обнаруживаются у более 75 % здоровых людей. В связи с этим, при планировании работ по использованию таких векторов следует учитывать их популяционную восприимчивость.

*Векторы на основе  $\alpha$ -вирусов* – относительно новый инструмент для конструирования рекомбинантных вакцин. Вирус венесуэльского энцефаломиелиита лошадей, избирательно патогенный для лошадей, относится к привлекательным объектам вирусологов. Фундаментальные проблемы репликации и экспрессии генома РНК-содержащих вирусов исследуются с начала 70-х годов. Экспрессия генома этого вируса обеспечивается двумя оперонами, ранними и поздними генами. В рамки считывания поздних генов осуществляют вставку чужеродных генов с обеспечением высокого уровня их экспрессии, сравнимого с таковым поверхностных мажорных белков  $\alpha$ -вирусов. Компания «Alfa Vax» является мировым лидером в использовании  $\alpha$ -вирусов в качестве векторов для конструирования вакцин. При этом следует подчеркнуть *безопасность векторов на основе  $\alpha$ -вирусов*: они непатогенны для человека, и в человеческой популяции не существует иммунитета против этих вирусов, так как они никогда не циркулировали среди людей.

В первых экспериментах такого рода *E.Coli*-плазмиду, содержащую клонированный ген белка-антигена, транскрипция которого находилась под контролем промотора вируса животных, конъюгировали с микрочастицами золота и бомбардировали ими клетки уха мыши при помощи «генной пушки». В этом методе используется сжатый гелий, содержащий частицы коллоидного золота с сорбированными на нем плазмидами экспрессирующими антиген. При этом препарат вводится в эпидермис. Преимуществами этого метода является попадание плазмид непосредственно в клетки и факт того, что большая часть плазмид прямо контактирует с клетками Лангерганса. Это важно в связи с тем, что кожа богата антигенпредставляющими клетками (клетки Лангерганса), синтезирующими молекулы II класса МНС (главный комплекс гистосовместимости). Поэтому ДНК, введенная непосредственно в кожу может быть легко ими захвачена.

Впоследствии выяснилось, что клонированную ДНК можно вводить в клетки и с помощью внутримышечной инъекции раствора с большим количеством плазмиды, несущей соответствующую ДНК. Для этого необходимо в  $10^3$ – $10^4$  раз больше ДНК, чем при бомбардировке микрочастицами. В одном из экспериментов более чем в 75 % случаев ген включался в клетки мыши, и синтезированный белок-антиген индуцировал синтез антител. В одной из серий экспериментов мышам в задние конечности вводили раствор с *E. Coli*-плазмидой, несущей ДНК нуклеопротеина вируса гриппа А, транскрипция которой находилась под контролем промотора вируса саркомы Рауса или цитомегаловируса. Хотя уровень экспрессии гена нуклеопротеина был настолько низок, что не поддавался регистрации, через 2 недели после иммунизации в крови мышей обнаруживались антитела к вирусу гриппа А. Выживаемость иммунизированных мышей оказалась значительно выше, чем мышей из контрольной группы. Более того, они были нечувствительны и к другому штамму вируса гриппа. Такая перекрестная защита не вырабатывается при введении традиционных противогриппозных вакцин. Позднее состоялись первые клинические испытания на человеке, которые, прежде всего, продемонстрировали безопасность нового метода. Гены ВИЧ вносили в клетки пациентов уже зараженных вирусом. Еще позднее аналогичные эксперименты провели со здоровыми людьми. Кроме генов ВИЧ пересаживали гены гриппа и гепатита В. Во всех случаях вакцины приводили к иммунному ответу в виде выработки специфических антител. Вакцины вводили либо путем инъекций, либо с помощью так называемой «генной пушки». Этот аппарат, выпуская струю сжатого гелия, пробивает клеточные мембраны микроскопическими металлическими частицами, покрытыми ДНК. Эта технология «генной пушки», согласно отчетам, мощно стимулирующая иммунную реакцию, уже прошла исходные клинические испытания. Для повышения эффективности всасывания ДНК заключали в оболочку из катионных липидов, липосперминов или других молекул, которые нейтрализуют их заряд и обладают липидными группами для улучшения проникновения сквозь мембрану. Такие составы исследовались также на предмет альтернативных путей введения (например, пероральный или назальный), которые могут стимулировать иммунитет слизистых оболочек. Было показано, что анестезирующее вещество бупивакаин, вводимое совместно с ДНК, усиливает всасывание и экспрессию

ДНК. АДФ-рибозилирующие экзотоксины, вводимые совместно с ДНК и наносимые на кожу, могут стимулировать чрезкожную иммунизацию. Существуют данные о возможности «выстреливать» ДНК-вакцину, упакованную в липосомы. Облегчение воздействия может происходить на уровне клеточного всасывания, экспрессии или иммунологической активации.

Бактерии, реплицирующиеся внутриклеточно, можно подвергнуть генно-инженерной обработке с целью доставки плазмидной ДНК в клетки для экспрессии рекомбинантных белков. *S. flexneri* был аттенуирован путем создания делеционного мутанта по жизненно важному гену (*asd*). Хотя такой штамм может размножаться *in vitro* при наличии диаминопимелиновой кислоты (DAP) и может оккупировать клетки, он не способен размножаться *in vivo*, при отсутствии DAP. Этот штамм был трансформирован плазмидой, несущей эукариотический промотор и рекомбинантный ген. Полученный рекомбинантный штамм *S. flexneri strain* оказался способным заселять клетки млекопитающих *in vitro* и экспрессировать белок, кодируемый плазмидой, в качестве потенциального вакцинного антигена. Поскольку *S. flexneri* реплицируется в кишечнике и стимулирует иммунитет слизистых оболочек, данный вектор можно вводить пероральным путем с целью доставки ДНК к клеткам, в которых стимулируется иммунитет слизистых оболочек. Другие аттенуированные штаммы различных видов бактерий (например, *Salmonella*, способный к заселению клеток млекопитающих, но не к делению), также могут доставлять рекомбинантные плазмиды пероральным путем для экспрессии рекомбинантных белков в качестве вакцинных антигенов.

При введении ДНК-вакцины активизируются клетки иммунной системы: В-лимфоциты вырабатывают антитела, нейтрализующие антигены в жидких межклеточных тканях (гуморальный иммунный ответ), а цитотоксические Т-лимфоциты разрушают бактерии и вирусы внутри клеток (клеточный иммунный ответ). Получены экспериментальные данные, что один и тот же антиген, введенный в организм обычным методом и с помощью ДНК-вакцины, продуцирует разные варианты иммунного ответа. При ДНК-вакцинации синтезируются иммуноглобулины – IgG2a (максимум через 6 недель), а при традиционном введении IgG1 (через 1–2 недели). При ДНК-вакцинации Т-хелперы животных секретируют интерферон- $\gamma$ , а после обычной вакцинации – интерлейкины ИЛ-4 и ИЛ-5. Таким образом,

использование ДНК-вакцины приводит к так называемому Т-хелперному ответу (Th-1), а обычная вакцинация – к Th-2. Интерес к ДНК-вакцинам стимулируется рядом свойств, которыми они обладают. Используя один и тот же плазмидный или вирусный вектор можно создавать вакцины против различных инфекционных заболеваний, меняя только последовательность, кодирующую необходимые антигены. В то же время, по мнению ряда исследователей, прямая инокуляция плазмидной ДНК должна приводить к синтезу белков *in vivo*, конформационная и посттрансляционная модификация которых идентична синтезируемым при инфекционном процессе заражением вирусом.

*Преимуществом ДНК-вакцин являются:* отсутствие специальных методов доставки и высокая стабильность (ДНК-вакцины стабильны даже при комнатной температуре), высокая степень очистки, отсутствие балластных белков и контаминации посторонними агентами и индуцирование у животных системного и местного иммунитета. Двукратная внутримышечная вакцинация собак плазмидной ДНК, экспрессирующей гликопротеин вируса бешенства защищает животных от контрольного заражения вирулентным штаммом вируса бешенства. Уже разработаны и проходят испытания ДНК-вакцины против инфекций, вызываемых вирусами гепатита В и С, гриппа, лимфоцитарного хориоменингита, бешенства, японского энцефалита, туберкулеза, лейшманиоза, малярии и др. Нужный ген, вставляются в плазмиду или безопасный вирус. Такой носитель-вектор проникает в клетку и синтезирует нужные белки, обладающие протективным действием. Для внедрения этих вакцин в медицинскую практику требуется решение еще очень многих вопросов. Например, генами кодируются белковые антигены, и пока нет альтернативы полисахаридным антигенам, входящим в состав ряда традиционных вакцин. Несомненно, важным является разработка методов получения и очистки плазмидной ДНК, освобождение от балластных примесей бактериального происхождения, хромосомной ДНК и примесей РНК. Самостоятельным вопросом является подбор для ДНК-вакцин адьювантов и носителей. Обращает на себя внимание вопрос о судьбе введенной в клетку ДНК. На сегодняшний день нет однозначного ответа. ДНК может интегрироваться в геном хозяина с весьма серьезными последствиями, если при этом происходит злокачественная трансформация клеток или затрагивается какой-то важный ген, что приводит к мутагенно-

му эффекту. По мнению многих исследователей, такое развитие событий считается крайне маловероятным. По их мнению, такая ДНК какое-то время просуществует в клетке в виде нереплицирующегося внехромосомного элемента, а затем разрушится. По нашему мнению эти вопросы еще недостаточно изучены и внедрение ДНК-вакцин в медицинскую практику требует всестороннего изучения, а именно: судьба введенной ДНК-вакцины; длительность экспрессии антигена; безвредность ДНК-вакцин; образование антител к самой ДНК и примесям вакцины и т.п.

Таким образом, было показано, что после того, как клетки *in vivo* принимают ДНК, кодирующую вакцинные антигены, они могут секретироваться или связываться с клеточной поверхностью таким способом, который будет запускать гуморальный или клеточный иммунный ответ. Более того, поглощение ДНК можно усилить химическим путем или при использовании для доставки вирусов или бактерий. Последние подходы способствуют определению вакцины на основе ДНК как неспособной реплицироваться в организме человека. Недавно начали проходить клинические испытания вакцины ДНК без оболочки, усовершенствованные и вводимые при помощи вирусов. Несмотря на то, что ДНК-вакцины разрабатываются более 20 лет, ни одна из таких вакцин до сих пор не разрешена к применению.

### 6.1.8. Разработка состава вакцин

Иммунологическая эффективность вакцин (кроме живых) может повышаться путем подбора состава, что касается окончательной формы вакцины, которая должна вводиться *in vivo*. В дополнение к «активному веществу» (антиген или ДНК), состав может включать в себя адъювант и / или систему доставки в дополнение к наполнителям. *Адъювант* – это вещество, которое стимулирует повышенный гуморальный и / или клеточный иммунный ответ на совместно введенный антиген. *Система доставки* представляет собой носитель для обеспечения презентации вакцины клеткам иммунной системы или для стабилизации и высвобождения антигенов в течении длительного периода времени. Адъюванты и системы доставки могут перекрываться по структуре и функциям. Ожидается, что многие будущие вакцины будут содержать новые адъюванты и системы доставки.

**Адъюванты.** Соли алюминия, такие как гидроксид или фосфат, на данный момент являются единственными адъювантами, широко лицензированными для использования людьми. Эти адъюванты уже используются в течение десятилетий в вакцинах, которые вводились более чем 1 млн. людей во всем мире. Вакцинный антиген образует стабильную связь с солью алюминия за счет ионных связей, и образует макроскопическую суспензию в растворе. Этот адъювант преимущественно стимулирует иммунную реакцию типа Th-2, т.е. основанную на антителах, что не является полезным в случаях, когда для защиты необходим опосредованный клетками иммунный ответ. Хотя соли алюминия полезны для некоторых вакцин (например, гепатит В, коклюш), в случае остальных вакцинных антигенов они не обладают достаточной мощностью, чтобы стимулировать иммунный ответ, опосредованный антителами, достаточно высокий для оптимальной эффективности. Показано, что соли алюминия не обладают пользой для презентации вакцин, вводимых пероральным или интраназальным путем. Поэтому многие химические вещества, биохимические вещества из природных источников, а также белки, обладающие активностью по отношению к иммунной системе (цитокины) исследовались в качестве потенциальных адъювантов. Адъювантная способность практически всех известных составов связана с местными или системными побочными эффектами, которые могут быть основаны на определенном механизме, или быть неспецифическими. *Идеальный адъювант должен сохранять баланс между степенью побочных эффектов и усилением иммунного ответа.*

Некоторым бактериальным токсинам с АДФ-рибозилирующей активностью уделялось значительное внимание при их рассмотрении в качестве адъювантов слизистых оболочек в молекулярной инженерии. В частности, было показано, что столбнячный токсин обладает активностью адъюванта слизистых оболочек для совместно вводимого антигена, презентуемого пероральным, назальным, вагинальным или ректальным путями, как было впоследствии показано для термолabile токсина (LT) ЕТЕС. Эти токсины состоят из каталитической субъединицы А и пентамерной субъединицы В, которая связывается с ганглиозидом GM1 на мно-

гих типах клеток. Однако, и столбнячный токсин, и LT токсичны для людей, особенно при пероральном введении, в результате которого они вызывают диарею. Для разделения токсичности и адьювантной способности столбнячного токсина и LT были созданы точечные мутации, которые привели к снижению или исключению АДФ-рибозилирующей активности, снижению токсичности, и заметному сохранению адьювантной способности у мышей. Альтернативным подходом была элиминация В-субъединицы и ее замена на синтетический димерный пептид, полученный на основе белка A *Staphylococcus aureus*, который связывается с иммуноглобулином (Ig). Несомненный интерес представляют данные о возможности использования в качестве адьювантов ганглиозидов GT1 и GD1a, которые при введении животным их комплекса с вирусом бешенства SVS повышали иммуногенность вируса и снижали летальность зараженных вирусом мышей. Переносимость и эффективность адьювантов, созданных генно-инженерным путем, должны проходить оценку на людях. Тема адьювантов подробно рассмотрена нами в учебном пособии: Краснопольский Ю. М., Борщевская М. И. «Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов». – Харьков, НТУ «ХПИ», 2009 г.

**Системы доставки.** Помимо презентации антигена или ДНК клеткам иммунной системы, система доставки может осуществлять другие ключевые функции. Может иметь место «эффект депо», когда поддерживается наличие антигена в определенном месте *in vivo* для постоянной стимуляции иммунной системы. Может происходить усиление стабильности вакцины *in vivo*. Для вакцин, вводимых через слизистые оболочки, система доставки может обеспечить эффективную презентацию и поглощение М-клетками, после чего происходит транзитоз в пейеровы бляшки и презентация лимфоцитам с целью индукции иммунитета слизистых оболочек. Для некоторых составов вакцина может поддерживаться *in vivo* внутри физической структуры в течение значительного периода времени, на протяжении которого она высвобождается медленно или в пульсирующем режиме, чтобы она могла функционировать как однократно вводимая вакци-

на. Широко лицензированных систем доставки не существует. Нарботка клинического и фармацевтического опыта с новыми системами доставки и адьювантами остается ключевой целью в данной области.

В заключении хотелось бы сказать, что технологические разработки последнего десятилетия значительно расширили число общих стратегий создания новых вакцин. В следующем десятилетии количество подходов будет и дальше расширяться, а технические аспекты дополнительно оттачиваться, чтобы большинство антигенов можно было представить в высокоиммуногенной форме в виде живой или субъединичной вакцины. Белковые антигены в альтернативной форме можно представить в виде вакцины на основе нуклеиновых кислот. Дальнейшее понимание функций генов вирусных и бактериальных патогенных организмов может позволить более стабильно и предсказуемо аттенуировать живые вакцины, как в виде вакцин, так и в виде живых векторов для иммунизации против других патогенных организмов. Технологии адьювантов должны развиваться до тех пор, пока составы, более действенные, чем соли алюминия, и настолько же хорошо переносимые, не станут широко применимыми для субъединичных / инактивированных вакцин, и пока не станет возможной пероральная доставка очищенных белков для иммунизации. Аналогичным образом, составы ДНК могут улучшить действенность ДНК-вакцин и их пригодность для доставки путями, стимулирующими иммунитет слизистых оболочек.

Весьма вероятно, что по мере совершенствования этих биотехнологических достижений лимитирующим фактором в разработке новых вакцин для применения людьми будет оставаться более полное понимание иммунологии. Одной из областей, в которых возрастание знаний имело бы практическую пользу для разработки вакцин, являются иммунобиология белков, тип и специфичность иммунной реакции, требуемые для постоянной защиты от заболевания, приобретение иммунитета слизистых оболочек, а также оптимальная стратегия вакцинации для достижения такой защиты. Ожидаются и значительные достижения в области применения вакцин к лечению неинфекционных заболеваний, таких как рак и аутоиммунные болезни.

## 6.2. Биотехнология цитокинов

*Цитокины* (медиаторы) – вещества белковой природы, которые образуются преимущественно в иммунокомпетентных клетках и являются средством клеточного взаимодействия. Они обеспечивают теснейшую функциональную связь между различными группами клеток. В настоящее время описано более 100 различных цитокинов, составляющих самостоятельную систему регуляции иммунной системы. Практически все описанные цитокины участвуют в развитии антиинфекционного иммунитета (см. табл. 15). Отдельные медиаторы достаточно хорошо изучены, клонированы их структурные гены, получены гомологичные образцы цитокинов, определена их аминокислотная последовательность.

Таблица 15 – Цитокины иммунного ответа

Название (сокращенное, полное)	Главные клетки продуценты	Молекулярная масса (кД)	Основные функции
1	2	3	4
ИЛ-1α ИЛ-1β Интерлейкин-1α,β	Макрофаги, моноциты, В-клетки	17,5	Стимулирует Т-, В- и ЕК-клетки
ИЛ-2 Интерлейкин-2	Т-клетки	15–20	Стимулирует рост и дифференцировку Т- и В-клеток
ИЛ-3 Интерлейкин-3	Т-клетки, тучные клетки	15–28	Стимулирует гемопоэтические клетки-предшественники
ИЛ-4 Интерлейкин-4	Т-клетки, тучные клетки и базофилы	15–20	Стимулирует рост Т- и В-клетки, ингибирует ИЛ-1α и ИЛ-1β

Продолжение таблицы 15

1	2	3	4
ИЛ-5 Интерлейкин-5	Т-клетки, тучные клетки	21,5	Стимулирует дифференцировку В-клеток и хемотаксис эозинофилов
ИЛ-6 Интерлейкин-6	Т-клетки, моноциты, макрофаги, фибробласты	21–28	Индукцирует созревание мегакариоцитов, стимулирует гепатоциты
ИЛ-7 Интерлейкин-7	Костномозговые стромальные клетки	25	Стимулирует рост пре-В- и пре-Т-клетки
ИЛ-8 Интерлейкин-8	Моноциты, макрофаги, Т-клетки, фибробласты	8–10	Усиливает хемотаксис нейтрофилов, базофилов, Т-лимфоцитов
ИЛ-9 Интерлейкин-9	Т-клетки	32–39	Стимулирует Т-клетки, тучные клетки, мегакариоциты
ИЛ-10 Интерлейкин-10	Моноциты, макрофаги, Т-клетки, В-клетки	19	Стимулирует В-клетки, тучные клетки, подавляет функцию макрофагов и пролиферацию Т-клеток
ИЛ-11 Интерлейкин-11	Фибробласты	20–23	Стимулирует образование мегакариоцитов
ИЛ-12 Интерлейкин-12	В-клетки, моноциты, макрофаги	35	Стимулирует индукцию и созревание Т-клеток, активирует ЕК-клетки
ИЛ-13 Интерлейкин-13	Т-клетки (CD4, CD8)	12	Стимулирует рост В-клеток
ИЛ-14 Интерлейкин-14	Т-клетки	16	Индукцирует дифференцировку активированных В-клеток



Продолжение таблицы 15

1	2	3	4
ИЛ-15 Интерлейкин-15	Моноциты, фибробласты	14–15	Стимулирует Т-клетки, ЕК-клетки
ИФ- $\alpha$ Интерферон $\alpha$	Моноциты, макрофаги, Т-, В-клетки	16–27	Стимулирует ЕК-клетки, макрофаги, В-клетки и экспрессию антигенов ГКГ
ИФ- $\beta$ Интерферон $\beta$	Фибробласты, моноциты, макрофаги	20	Стимулирует ЕК-клетки, макрофаги, В-клетки и экспрессию антигенов ГКГ
ИФ- $\gamma$ Интерферон $\gamma$	Т-клетки	17	Стимулирует моноциты, макрофаги, В-клетки, и экспрессию антигенов ГКГ, ингиби- рует клеточную пролиферацию
ФНО- $\alpha$ Фактор некроза опухоли $\alpha$	Моноциты, макрофаги, Т-клетки, нейтрофилы, ЕК-клетки	17	Стимулирует лимфоци- ты, нейтрофилы, эози- нофилы, фибробласты, разрушает инфицированные и трансформированные клетки
ФНО- $\beta$ Фактор некроза опухоли $\beta$ (он же ЛТ $\alpha$ , лимфотоксин $\alpha$ )	Т-клетки	20	Стимулирует лимфоци- ты, нейтрофилы, эози- нофилы, фибробласты, разрушает инфицированные и трансформированные клетки

Продолжение таблицы 15

1	2	3	4
ЛТ- $\beta$ Лимфотоксин $\beta$	Т-клетки	33	Стимулирует лимфоциты, нейтрофилы, эозинофи- лы, фибробласты, разру- шает инфицированные и трансформированные клетки
МИФ Фактор торможе- ния миграции мак- рофагов	Т-клетки	12	Ингибирует миграцию макрофагов, моноцитов
МХАТ Моноцит- хемотаксический и активирующий фактор	Моноциты, макрофаги, В-клетки	8–10	Вызывает хемотаксис мо- ноцитов, макрофагов, ре- гулирует экспрессию мо- лекул адгезии на поверх- ности этих клеток
ГМ-КСФ Гранулоцит, мак- рофаг колоние- стимулирующий фактор	Т-клетки, фибробласты, макрофаги, нейтрофилы	22	Усиливает дифференци- ровку мультипотентных клеток-предшествен- ников, стимулирует Т-клетки, моноциты, нейтрофилы
Г-КСФ Гранулоцит колониестимули- рующий фактор	Моноциты, макрофаги, фибробласты, нейтрофилы	18–22	Усиливает дифференци- ровку предшественников макрофагов и нейтрофи- лов, стимулирует нейтрофилы
М-КСФ Макрофаг колониестимули- рующий фактор	Моноциты, макрофаги, фибробласты	45	Усиливает дифференци- ровку предшественников моноцитов

Продолжение таблицы 15

1	2	3	4
ТРФР Тромбоцитарный фактор роста	Тромбоциты, моноциты, макрофаги	30–32	Стимулирует фибробласты, глиальные клетки, освобождает гранулы из нейтрофилов и моноцитов, вызывает хемотаксис фибробластов
ТФР Трансформирующий фактор роста	Моноциты, макрофаги, кератиноциты, мегакарициты, фибробласты	5–12,5	Стимулирует фибробласты, остеобласты, ингибирует пролиферацию Т- и В-клеток
ЛИФ Лейкоз ингибирующий фактор	Костномозговые клетки, фибробласты, Т-клетки, моноциты, макрофаги	46	Подавляет дифференцировку эмбриональных стволовых клеток

Система медиаторов связана не только с иммунитетом, она имеет более широкое биотехнологическое значение, она поддерживает определенный уровень пролиферации, дифференцировки и активации многих видов клеток. Цитокины играют существенную роль во всех физиологических процессах, включая развитие и старение организма. Как видно из таблицы 3, большинство медиаторов (цитокинов) клеточного взаимодействия образуется в лимфоцитах и клетках моноцитарно-макрофагального ряда. Цитокины классифицируются по органам (тимус, костный мозг, лимфатические узлы и пр.), в которых они преимущественно образуются, по клеткам-продуцентам и клеткам-мишеням, по характеру действия, физико-химическим свойствам. Цитокины участвуют во многих видах взаимодействия, обеспечивающих функционирование иммунной системы и контроль гемопоэза. Первая группа цитокинов была представлена интерферонами

(ИФН), часть цитокинов была классифицирована как интерлейкины (ИЛ), пронумерованные в порядке их обнаружения.

### 6.2.1. Технология получения интерферонов

Интерферон был открыт в 1957 году И. Линденманом и Х. Исааком. Авторами обнаружено интересное явление – заражение клеток крови вирусом приводит к выделению ими белка, который обладает противовирусной активностью. Этот белок получил название интерферона (интерференция – отталкивание). Интерес к этому феномену был огромен. *Интерфероны* – низкомолекулярные белки с молекулярной массой 20–40 кДа. Синтез интерферона осуществляется клетками в ответ на проникновение в них вируса, в результате чего прекращается развитие и размножение вируса в тканях. *Биологическое действие интерферона* характеризуется следующими факторами:

- ✓ универсальностью – интерферон активен против большинства ДНК и РНК-содержащих вирусов;
- ✓ выраженной тканевой специфичностью;
- ✓ последствием – после удаления интерферона в обработанных клетках сохраняется способность подавлять размножение вирусов;
- ✓ внутриклеточной активностью с дистанционным характером действия – интерферон действует на вирусы лишь в процессе их размножения, через цитоплазматическую мембрану клетки, а не непосредственно на геном;
- ✓ нечувствительность к антителам против вирусов, их индуцирующим.

Общие эффекты в действии интерферонов могут проявляться как противовирусные, антипролиферативные и иммуномодулирующие. Антипролиферативное действие интерферонов обусловлено множеством эффектов: ингибированием трансляции, подавлением экспрессии клеточных протоонкогенов и других ростовых факторов клетки.

В зависимости от вида индуктора и типа клеток-продуцентов интерфероны разделяют на  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -типы:  *$\alpha$ -интерферон или лейкоцитарный интерферон* продуцируют лейкоциты, которые обработаны вирусами или другими агентами (вирусы, бактерии и их токсины, полисахариды и синте-

тические вещества); *β-интерферон или фибробластный интерферон* продуцируется фибробластами, обработанными вирусами или другими агентами; *γ-интерферон или иммунный интерферон*. Существует несколько подтипов интерферонов. Молекулы интерферона имеют различия в аминокислотном составе.

По своим *структурным и функциональным свойствам интерфероны подразделяют на две группы*. К *интерферонам I типа* принадлежат интерфероны альфа (α), бета (β), дельта (δ), эпсилон (ε), каппа (κ), тау (τ), омега (ω). К *интерферонам II типа* относится γ-интерферон. Все интерфероны I типа имеют очень много общего в аминокислотных, и соответственно, в нуклеотидных последовательностях и структуре соответствующих генов. У всех видов животных α-интерферон состоит из многих индивидуальных представителей (около 20 подвидов), гомологичность между которыми на уровне нуклеотидных последовательностей составляет около 80 %. Все гены этого семейства формируют кластер, сгруппированный преимущественно на одной хромосоме (у человека – хромосома 9). В отличие от α-интерферона у большинства видов животных β-интерферон существует в виде только одного представителя. Кроме того, в отличие от α-интерферона, β-интерфероны представляют собой гликопротеины. При анализе библиотеки ДНК были открыты ω-интерфероны. Они присутствуют не у всех видов животных, а у человека из 6 представителей этого семейства только один существует в функциональной форме, а остальные представлены псевдогенами. Только у коров и овец в эпителии эмбрионов на ранних стадиях эмбрионального развития был обнаружен τ-интерферон.

Интерферон-γ не имеет структурной гомологичности с интерферонами I типа. В отличие от генов интерферона I типа, гены интерферона II типа содержат интроны (участок ДНК, который является частью гена, но не содержит информации о последовательности аминокислот белка). Интерфероны типа II выполняют важные функции регуляторов иммунной системы. Интерферон-β, как и γ-интерферон представляет собой гликопротеин. *Интерфероны I и II типов объединены только по основной функции, а именно по противовирусной активности.*

Как правило, в норме клетки не продуцируют заметного количества интерферонов до тех пор, пока не состоится его индукция. Однако очень

небольшие количества иРНК интерферона можно определить при помощи высокочувствительных методов анализа и без какой-либо явной индукции интерферона. Можно говорить о том, что при нормальных условиях, постоянной продукции интерферона не наблюдается.

Необходимо остановиться на *механизме действия интерферонов*. Сами по себе молекулы интерферона не влияют непосредственно на внутриклеточные процессы. Подобно гормонам, факторам роста и другим медиаторам межклеточного взаимодействия интерфероны взаимодействуют лишь с рецепторами, расположенными на поверхности клеточных мембран. Эндогенные интерфероны для проявления своей биологической активности должны сначала секретироваться клетками, в которых они синтезируются, а затем взаимодействуют с поверхностными рецепторами. После связывания интерферона с рецепторами инициируется цепь сложных внутриклеточных реакций, которые начинаются передачей сигнала к ядру и активацией транскрипции генов, которые отвечают на интерфероны. Транскрипция соответствующих генов и синтез соответствующих белковых продуктов приводит к выработке эффекторных внутриклеточных механизмов, что и является специфичным действием интерферонов. В итоге мы наблюдаем цепочку многочисленных эффектов интерферона (как на клеточном уровне, так и на уровне организма в целом), главным из которых является ингибирование репликации вируса в инфицированных клетках. Рецепторы интерферона I и II типа различны, хотя и имеют определенную структурную общность. Все интерфероны I типа конкурируют за одни и те же рецепторы, в то время как взаимодействие γ-интерферона с клетками осуществляется при участии других рецепторов. Под действием интерферонов наблюдается продукция других цитокинов, индукция специфических ферментов, подавление пролиферации клеток, иммуномодуляция (усиление фагоцитарной активности макрофагов, специфической цитотоксичности лимфоцитов по отношению к клеткам-мишеням) и т.д.

Сегодня в Украине зарегистрирован *ряд препаратов интерферона: природные* (α-интерфероны: человеческий лейкоцитарный интерферон (ЗАО «Биолек», ОАО «Биофарма»); β-интерфероны: человеческий фибробластный интерферон-β 1b (Бетаферон –«Schering AG») и *рекомбинантные*

(Роферон –  $\alpha$  2a – «Roche», Интрон-А –  $\alpha$  2b – «Schering-Plough», Лаферон –  $\alpha$  2b – «ФармБиотек»).

Мы рассмотрим методы биотехнологического получения ряда фармацевтических препаратов, содержащих интерфероны различных типов.

**Получение лейкоцитарного  $\alpha$ -интерферона.** Лейкоцитарный интерферон относится к интерферонам первого поколения и его производство до сих пор существует в ряде стран (Финляндия, Украина, Россия и др.). Мы рассмотрим основные этапы получения интерферона из лейкоцитов крови человека под воздействием вируса – интерферогена.

Прежде всего, остановимся на культивировании вирусов при помощи куриных эмбрионов и контроле вирусов на культуре клеток в реакции гемагглютинации или определения цитопатического действия.

Начало применения развивающихся куриных эмбрионов для выращивания вирусов приходится на 1928–1935 гг. Этот период австрийский ученый Бернет назвал «первой золотой эпохой» развития вирусологии, поскольку она открыла возможность культивирования вирусов на довольно удобной лабораторной модели, как правило, интактной в отношении многих возбудителей инфекционных заболеваний. По сути, это был первый биотехнологический процесс накопления вирусов, пригодный для промышленного и массового производства вирусной биомассы.

Развивающиеся куриные эмбрионы являются универсальным и простым для манипуляций объектом. Это объясняется тем, что куриный эмбрион содержит четыре различных естественных питательных субстрата для накопления вирусов (амниотическую и аллантоисную жидкость, хорион-аллантоисную оболочку и желточный мешок), клетки которых, как и клетки самого эмбриона, являются высокочувствительными к различным вирусам. Для получения куриных эмбрионов используют яйца от белых леггорнов, имеющих тонкую скорлупу. Они могут быть использованы только в течение 10 дней после снесения. В противном случае развитие зародыша, несмотря на оплодотворение, сильно задерживается. Инкубацию проводят в обычных инкубаторах с автоматическим приспособлением для переворачивания яиц, вентилятором, термометром и гигрометром, при температуре 37,2–37,8 °C и влажности 60–70 %. Работу по заражению ку-

риных эмбрионов проводят в асептических условиях. В настоящее время, согласно международным требованиям (GMP), работу с вирусосодержащим материалом проводят в ламинарных боксах, обеспеченных избыточным потоком стерильного воздуха, прошедшего через мембранные фильтры. Для получения вируса, используемого при производстве интерферона, заражение проводят в аллантоисную полость. Заражение осуществляют на 10–11 сутки развития эмбриона. В области воздушной камеры скорлупу дезинфицируют спиртовым раствором йода и прожигают. Затем прокалывают её зондом и в образовавшееся отверстие вносят 0,1–0,2 мл инокулята с оттитрованным вирусом. При этом инъекционную иглу вводят на 1–2 мм ниже границы. Заражение проводят вирусом в определенном титре. Чтобы иметь стерильную суспензию вируса к вирусному материалу добавляют по 100–1000 мг стрептомицина и 100–1000 ЕД пенициллина. После заражения эмбриона отверстие в скорлупе заливают парафином и яйца помещают в инкубатор. Яйца с эмбрионами выдерживают в течение 48 часов. Затем их охлаждают в течение 3–4 часов при температуре 2–4 °C и подвергают ово-скопии (от лат. ovum – яйцо и греч. skopgo – смотрю). При обнаружении погибших эмбрионов яйца выбраковывают. Перед получением вируса скорлупу над воздушной камерой дезинфицируют и отделяют пинцетом. Аллантоисную жидкость отсасывают пипеткой или с помощью специального аппарата. Из одного эмбриона, в зависимости от его возраста, можно собрать до 8–10 мл аллантоисной жидкости. Аллантоисную жидкость можно получить без эритроцитов, подвергнув её центрифугированию при 3000 об/мин в течение 20–30 минут при температуре 2–6 °C. После получения аллантоисной жидкости её проверяют на стерильность, а также на содержание вируса и его количества путем титрования, например, в реакции гемагглютинации или определения цитопатического действия.

Для критерия оценки биологической активности вирусов используют титрование на клеточной культуре – обнаруживают дозу, вызывающую цитопатический эффект в 50 % зараженных культур (ЦПД-50) или определяют гемагглютинирующие единицы вируса.

*Одним из методов контроля активности вируса является реакция гемагглютинации, основанная на способности вируса склеивать эритроци-*

ты. Для проведения реакции готовят ряд последовательных двукратных разведений вируса и прибавляют к ним определенное количество эритроцитов (например, куриных). В тех образцах, где количество вируса было достаточно для полной агглютинации, наблюдается образование конгломератов из эритроцитов, которые быстро оседают на дно, образуя на всей поверхности красную пленку. При отсутствии вируса эритроциты оседают на дно в виде компактного осадка. За титр принимают предельное разведение вирусосодержащей жидкости, вызвавшее агглютинацию эритроцитов на 50 %.

*Другим методом контроля активности вируса является определение ЦПД-50.* Цитопатическое действие вируса используемого при производстве лейкоцитарного интерферона должно быть  $10^8$ – $10^9$  ЦПД-50. Титрование вирусов проводят на культуре клеток, например, фибробластов. Жидкость, содержащую вирус, разводят методом последовательных разведений (на среде Игла, среде 199 и др.) от  $10^{-1}$  до  $10^{-10}$ . Образцы разведений вируса  $10^8$ – $10^{10}$  в необходимом количестве переносят в лунки плашек, содержащих культуру клеток. Плашки с культурой клеток, зараженных вирусом, помещают в термостат при температуре  $(37 \pm 1)$  °С на 72 часа. Затем проводят учет биологической активности вируса по эффекту цитопатического действия. Титром вируса считается максимальное разведение вируса, при котором эффект цитопатического действия выражен в образцах с одинаковым разведением.

*Технология получения лейкоцитарного  $\alpha$ -интерферона* состоит из следующих стадий:

1. Для получения лейкоцитарной пленки используют кровь или плазму доноров из специализированных центров (в Украине это центры переливания крови), утвержденных национальным органом контроля иммунобиологических препаратов. Доноры проходят контроль на контаминацию вирусными (гепатиты В и С, ВИЧ и др.) и бактериальными агентами. Кровь или плазму центрифугируют при 1000–1500 об/мин в течение 20–25 минут при температуре 2–8 °С. Отделяют слой лейкоцитов со значительным содержанием эритроцитов. В ряде методов предлагается использовать поливиниловый спирт для лучшего разделения компонентов крови.

Количество живых лейкоцитов в полученной пленке должно быть не менее 97 %. Определение нежизнеспособных лейкоцитов проводят окрашиванием эозинамом натрия.

2. Эритроциты лизируют с помощью хлорида аммония (0,83 %-ый раствор при значении рН –  $7,0 \pm 0,5$ ) согласно методике Кэнтелла (1981 г.).

3. Обработанную хлоридом аммония лейкоцитарную пленку ресуспендируют в среде Игла МЕМ, содержащую бикарбонат натрия, антибиотик и сыворотку крови человека, очищенную от иммуноглобулинов.

4. В качестве праймера добавляют 20 ЕД/мл сырого  $\alpha$ -интерферона (сырой  $\alpha$ -интерферон – это продукт полученный в результате процесса индукции, но не подвергшийся очистке и обработке хлористоводородной кислотой при рН = 2,0 в течение 5 дней с целью инактивации вирусных агентов).

5. Полученную суспензию инкубируют в стерильных стеклянных емкостях. Лейкоциты праймируют в течение 2–3 часов при температуре  $(36 \pm 0,5)$  °С и периодическом перемешивании (50–200 об/мин), а затем добавляют вирус-индуктор (вирус Сендай или вирус болезни Ньюкасла и др.) до конечной концентрации 150–250 гемагглютинационных единиц/мл. Используется аллантоисная жидкость с титром вируса не менее  $10^8$ /мл ЦПД-50. После 1 часа инкубации для прикрепления вируса лейкоциты разводят до  $4 \cdot 10^6$  кл/мл (в 2,5 раза) той же средой. Затем культуру инкубируют 15–20 часов при  $(36 \pm 0,5)$  °С, удаляют клетки и дебрис при 500–1000 об/мин в течение 15–20 минут при температуре 2–8 °С. В полученном растворе определяют титр интерферона.

6. Раствор интерферона концентрируют в 50 раз, используя фильтрующую систему с тангенциальным потоком через которую проходят соединения с молекулярной массой 10 кДа и менее. Процесс проводят при температуре 2–8 °С. Концентрированный раствор интерферона центрифугируют при 9000 g в течение 30 минут при температуре 2–8 °С. Возможно хранение раствора при температуре минус 60–70 °С.

7. Затем проводят очистку интерферона при помощи аффинной хроматографии. Данный метод очистки предусматривает использование моноклональных антител, специфических к  $\alpha$ -интерферону человека, напри-

мер, антител NK2 коммерческого производства («Celltech Limited», England). Моноклональные антитела соединяют с активированной CNBr Сефарозой 4В. Концентрированный сырой интерферон размораживают и очищают центрифугированием 15000–18000 g в течение 60 минут при температуре 2–8 °С. Прозрачный раствор интерферона фильтруют через фильтры с размером пор 0,22–0,45 мкм и наносят на колонку с моноклональными антителами. Интерферон элюируют с колонки раствором, содержащим 0,1 М лимонной кислоты и 0,3 М хлористого натрия (рН – 2,0).

8. Кислотную инкубацию и нейтрализацию вирусов при рН 2,0 проводят при 4 °С в течение не менее 5-ти суток. За этот период происходит необходимая инкубация посторонних агентов, включая вирусы.

9. После 5-ти дней инкубации рН раствора доводят до значения 7,2–7,4 и стандартизуют раствор до содержания белка 1–3 мг/мл.

10. На данном этапе проводят гель-фильтрационную хроматографию интерферона. Раствор интерферона наносят на колонку с препаративной гранулированной сефарозой в количестве 5 % от объема колонки. Элюирование проводят фосфатным буфером. Все фракции, содержащие основное количество интерферона объединяют и подвергают стерилизующей фильтрации через мембраны с размером пор 0,22 мкм. Раствор хранят при температуре минус 60–70 °С.

11. При получении интраназального интерферона проводят очистку ультрафильтрацией через мембраны с порогом отсечения 300 кDa (без проведения стадии аффинной хроматографии). К раствору интерферона добавляют криопротекторы, препарат разливают во флаконы и подвергают лиофилизации.

Технология получения лейкоцитарного интерферона представлена на рис. 17.



Рисунок 17 – Технология получения лейкоцитарного интерферона

Существует мнение, что природные интерфероны, которые являются смесью разных подклассов и видов, имеют более высокую терапевтическую эффективность в сравнении с рекомбинантными интерферонами. Так, например, природный  $\alpha$ -интерферон может использоваться для лечения кондилом одинаковой с рекомбинантным интерфероном эффективностью в дозах в 4 раза меньших по сравнению с рекомбинантным интерфероном

**Получение рекомбинантного интерферона.** В настоящее время большинство препаратов интерферона получено методами генной инженерии. Применение рекомбинантного интерферона позволило расширить арсенал лекарственных средств для лечения очень многих тяжелых заболеваний: новообразований лимфатической системы и системы кроветворения (хронический миелолейкоз, кожная Т-клеточная лимфома, неходжкинская лимфома низкой степени злокачественности и др.); солидные опухоли (саркома Капоши у больных СПИДом, метастазирующая меланома, меланома после хирургической резекции и др.); вирусные заболевания (хронический активный гепатит В, гепатит С и др.).

Первым этапом создания рекомбинантного интерферона является выделение кДНК интерферонов. Для выделения генов или кДНК белков человека используют разные подходы. В ряде случаев выделяют нужный белок и определяют аминокислотную последовательность соответствующего участка молекулы. Исходя из этого находят кодирующую его нуклеотидную последовательность, синтезируют соответствующий олигонуклеотид и используют его в качестве гибридизационного зонда для выделения нужного гена или кДНК из геномных или кДНК-библиотек. Другой подход состоит в выработке антител к очищенному белку и использовании их для скрининга библиотек, в которых происходит экспрессия определенных генов. Для белков человека, синтезируемых преимущественно в какой-то одной ткани, кДНК-библиотека, полученная на основе мРНК, выделенной из этой ткани, будет обогащена последовательностью ДНК-мишени. Например, основным белком, синтезируемым клетками островков Лангерганса поджелудочной железы, является инсулин, и 70 % мРНК, выделенных из этих клеток, кодируют, именно его.

Однако принцип обогащения кДНК неприменим для тех белков человека, количество которых очень мало или место синтеза которых неизвестно. В этом случае понадобится использовать другие экспериментальные подходы. Интерфероны ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) – это природные белки, каждый из которых может найти свое терапевтическое применение. При выделении их кДНК пришлось разработать новый подход, позволяющий преодолеть трудности, связанные с недостаточным содержанием соответствующих мРНК и белков.

*Процедура выделения кДНК интерферонов* состояла в следующем:

1. Из лейкоцитов человека выделили мРНК и фракционировали её по размерам; провели обратную транскрипцию и встроили в сайт PstI плазмиды pBR322.

2. Полученным продуктом трансформировали *Escherichia coli*. Образовавшиеся 6000 клонов подразделили на 12 групп: по 512 клонов в каждой. Тестирование проводили на группе клонов, что позволило ускорить процесс их идентификации;

3. Каждую группу клонов гибридизовали с неочищенным препаратом интерферон-мРНК;

4. Из образовавшихся гибридов, содержащих клонированную ДНК и мРНК, выделили мРНК и провели её трансляцию в бесклеточной системе синтеза белка;

5. Определили интерферонную противовирусную активность каждой смеси, полученной в результате трансляции. Группы, проявившие интерферонную активность, содержали клон с кДНК, гибридизовавшийся с интерферон-мРНК;

6. Позитивные группы разбили на 8 подгрупп, содержащих по 64 клона, и вновь провели тестирование. Разбиение на подгруппы повторяли до тех пор, пока не идентифицировали клон, содержащий полноразмерную интерферон-кДНК человека.

Одним из первых рекомбинантных препаратов интерферона является Роферон-А ( $\alpha$ -2a), «Hoffman la Roche» – высокоочищенный белок, который содержит 165 аминокислот с молекулярной массой около 19 кДа. Интерферон имеет четыре остатка цистеина, участвующих в образовании двух дисульфидных связей (Cys 1-Cys 98 и Cys 29-Cys 138), одна из которых (Cys 29-Cys 138) существенна для проявления интерфероном антивирусной активности. Препарат получают по технологии рекомбинантной ДНК

с использованием генно-инженерного штамма *E. Coli*, с включенной плазмидой, содержащей ген интерферона лейкоцитов человека.

Экспериментально показано, что уровень экспрессии генов интерферона действительно увеличивается пропорционально числу tandemных копий гена, по крайней мере, до четырех копий на плазмиду. Однако tandemные повторы иногда оказываются нестабильными и со временем некоторые из них или даже все утрачиваются плазмидой.

Плазмидозависимые технологии являются высокопроизводительными, тем не менее, имеют серьезный недостаток – целевой продукт, как правило, образует в клетке нерастворимые в воде кристаллообразные формы, так называемого «тельца включения». *Процесс изготовления и очистки интерферона при использовании плазмидной технологии состоит из таких стадий:* сборание клеточной биомассы; её дезинтеграция; растворение «тельца включения» путем денатурации белковых структур с помощью мочевины или гуанин-дихлорида; ренатурация денатурированных молекул интерферона; очистка интерферона от балластных компонентов. Стадия ренатурации является ключевой стадией в процессе получения рекомбинантных белков, в процессе которой денатурированный белок приобретает нативную пространственную структуру, обеспечивающую его биологическую активность. В процессе ренатурации молекул интерферона наблюдается образование некорректных внутримолекулярных и межмолекулярных связей. Это приводит к частичному образованию неправильных мономерных форм рекомбинантного интерферона, конформация которых отличается от таковой у естественного интерферона, и возникновению его олигомерных структур, которые отсутствуют в естественном интерфероне.

Предложен оригинальный способ получения рекомбинантного интерферона с использованием встроенного в бактериофаг гена интерферона. Бактериофаг, заражая бактериальную клетку, размножается в ней, копируя многократно свою ДНК и встроенный в неё ген интерферона, синтезирует свои белки, в том числе и интерферон. На определенной стадии развития бактериофаг лизирует бактериальную клетку. Интерферон выходит в культуральную жидкость, причем, в водорастворимом состоянии, не образуя нерастворимых форм. Синтез организован таким образом, что интерферон накапливается вне клетки (в культуральной среде), поэтому не образует «тельца включения», как это имеет место в плазмидной технологии получения интерферона (Intron-A, Roferon-A и др.). Накопление

интерферона в культуральной жидкости разрешает очищать его по упрощенной схеме: отсутствие необходимости сбора биомассы, её дезинтеграции, денатурации белков с целью растворения «тельца включения» и ренатурации молекул интерферона. Отсутствие стадии концентрирования клеток (сбор биомассы), а также и клеточных белков, разрешает получить высокоочищенный препарат интерферона менее сложным методом, чем тот который используется при «плазмидной» технологии. Очищение осуществляется ионообменной хроматографией. По предложенной технологии был получен рекомбинантный интерферон «Лаферон». В полученном препарате обнаруживается не менее 95 % белка интерферона.

Первый ген интерферона был выделен в начале 80-х годов. С тех пор обнаружено несколько различных интерферонов. Исходя из химических и биологических свойств, их можно подразделить на три группы:  $\alpha$ -интерферон,  $\beta$ -интерферон,  $\gamma$ -интерферон. Интерферон- $\alpha$  и  $\beta$ -интерферон синтезируются клетками, обработанными препаратами вирусов или вирусной РНК, а  $\gamma$ -интерферон вырабатывается в ответ на действие веществ, стимулирующих рост клеток. Интерферон- $\alpha$  кодируется семейством генов, включающих как минимум 15 неаллельных генов, в то время как  $\beta$ -интерферон и  $\gamma$ -интерферон кодируются одним геном каждый. Подтипы  $\alpha$ -интерферона проявляют разную специфичность. Например, при проверке эффективности интерферона- $\alpha 1$  и интерферона- $\alpha 2$  на обработанной вирусом линии клеток быка эти интерфероны проявляют сходную противовирусную активность, в случае же обработанных вирусом клеток человека интерферон- $\alpha 2$  оказывается в семь раз активнее, чем интерферон- $\alpha 1$ . Если противовирусная активность проверяется на клетках мыши, то интерферон- $\alpha 2$  оказывается в 30 раз менее эффективным, чем интерферон- $\alpha 1$ .

Было предпринято несколько попыток создать интерфероны с комбинированными свойствами, используя тот факт, что члены семейства  $\alpha$ -интерферона различаются по степени и специфичности своей противовирусной активности. Теоретически этого можно достичь, если соединить части последовательности генов разных  $\alpha$ -интерферонов. Это приведет к образованию гибридного белка с другими свойствами, чем у каждого из исходных белков. Сравнение последовательностей кДНК интерферона- $\alpha 1$  и интерферона- $\alpha 2$  показало, что они содержат одинаковые сайты рестрикции в позициях 60, 92 и 150. После расщепления обеих кДНК в этих сайтах и последующего лигирования фрагментов было получено несколько гиб-



ридных генов. Эти гены экспрессировали в *E. coli*, синтезированные белки очистили и исследовали их биологические функции. Проверка защитных свойств гибридных интерферонов на культуре клеток млекопитающих показала, что некоторые из них проявляют большую активность, чем родительские молекулы. Кроме того, многие гибридные интерфероны индуцировали образование 2'-5'-олигоизoadенилат-синтетазы в контрольных клетках. Этот фермент участвует в синтезе 2'-5'-связанных олигонуклеотидов, которые в свою очередь активируют латентную клеточную эндорибонуклеазу, расщепляющую вирусную мРНК. Другие гибридные интерфероны проявляли большую, чем родительские молекулы, антипролиферативную активность в культурах различных раковых клеток человека.

Кроме рекомбинантных  $\alpha$ -интерферонов, которые относятся к конкретной разновидности этого типа интерферонов, начат также выпуск так называемых «консенсусных» интерферонов. К ним относятся, в частности, интерферон «Альфакон-1» или «Инферген» («Амген»). Интерфероны с такими последовательностями вообще не существуют в природе, а представляют собой новые заданные комбинации аминокислотных последовательностей известных субтипов. Такие комбинированные интерфероны являются более эффективными, чем рекомбинантные интерфероны на основе природных субтипов.

Однако генно-инженерные интерфероны представлены белками только одной определенной формы, которая не подвергается посттрансляционной модификации и не идентична природным интерферонам, что может ограничить биологическую активность соответствующей композиции. Intron ( $\alpha$ -2b) – Schering Plough, Roferon A ( $\alpha$ -2a) – Hoffman la Roche, Лаферон ( $\alpha$ -2b) – Украина представляют собой исключительно ( $\alpha$ -2)-форму интерферона. Интерфероны, полученные с помощью природных источников, таких как лимфобластная клеточная линия человека или лейкоциты периферической крови человека, представлены многими формами. По имеющимся данным препараты полученные из природных источников могут содержать более 15 белков с молекулярной массой от 18 до 25 кДа, обладающих антивирусной, антиростовой и иммунорегуляторной активностью.

Технология получения рекомбинантного интерферона представлена на рис. 18.

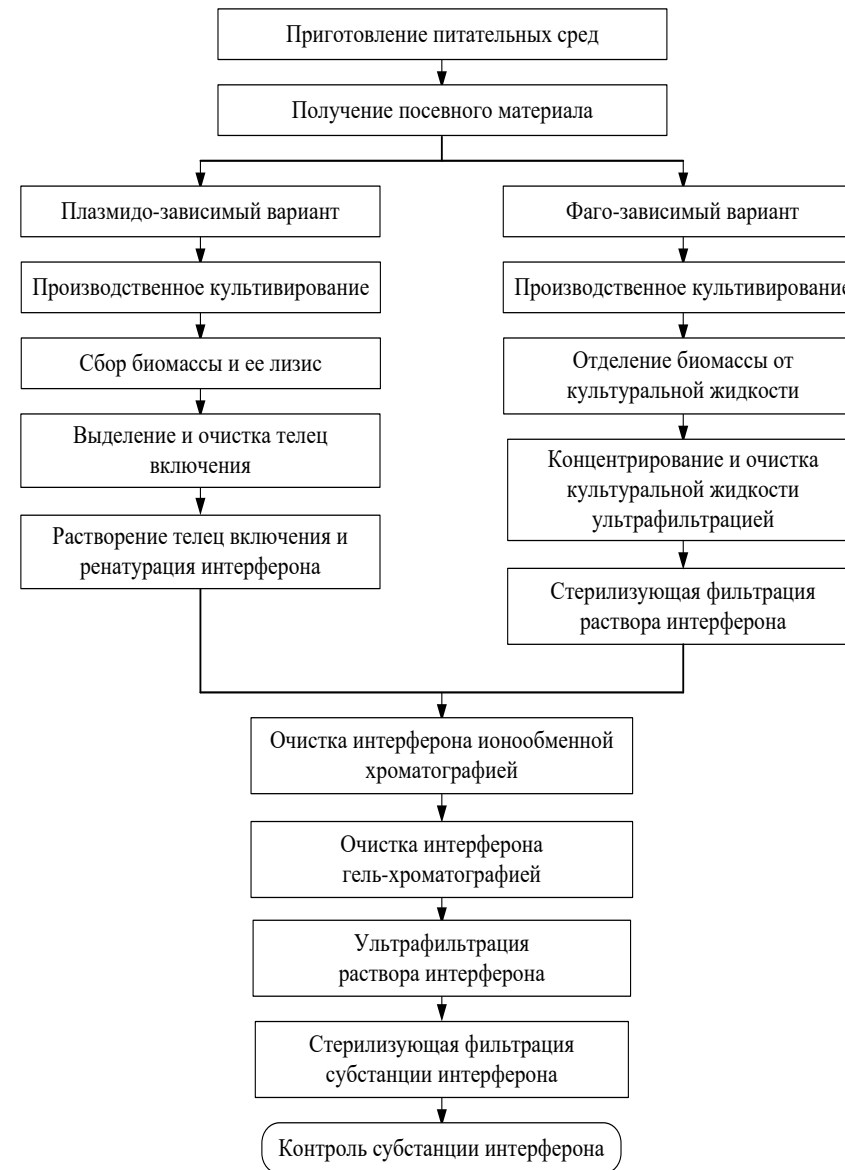


Рисунок 18 – Технология получения рекомбинантного интерферона

За последнее десятилетие создано значительное количество штаммов-продуцентов рекомбинантного интерферона, в частности, интерферона- $\alpha$ -2b. Получение гена интерферона- $\alpha$ -2b также проводится различными методами, определяемыми конкретным исследователем. В качестве примера приводим краткую технологию получения интерферона- $\alpha$ -2b, предложенную российскими учеными.

*E. Coli* BL21(DE3) – хорошо известный лабораторный штамм микроорганизма, используемый для получения рекомбинантных продуктов, например, используя данный штамм, был получен продуцент гормона роста человека (соматотропин). Ген интерферона- $\alpha$ -2b был собран из олигонуклеотидов методом ПЦР по теоретической последовательности и клонирован по сайтам BamHI и NdeI в экспрессионном векторе pET22(b+)-2Тф. Штамм BL21(DE3) был трансформирован полученной плазмидой pET22(b+)-IFN- $\alpha$ -2b-2Тф. После отбора клонов, содержащих вставку гена интерферона, методом рестрикционного анализа целевая структура гена интерферона была подтверждена путем определения нуклеотидной последовательности ДНК.

*Технология получения интерферона- $\alpha$ -2b* представлена следующими стадиями:

1. *Культивирование штамма продуцента интерферона- $\alpha$ -2b.*

Единичную колонию штамма *E. Coli* BL21(DE3)[pET22(b+)-IFN- $\alpha$ -2b-2Тф] пересевали в колбу с 30 мл среды Лурия – Бертани, состоящей из триптона – 10 г/л, дрожжевого экстракта – 5 г/л, натрия хлористого – 10 г/л, ампициллина – 100 мкг/мл. Культивирование проводили в течение 7 часов при температуре 37 °С и перемешивании 240 об/мин. Далее выращенный инокулят переносили в лабораторный ферментер (рабочий объем 1,5 л), используя синтетическую среду, содержащую: триптон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, глюкозу – 30 г/л, ампициллин – 200 мкг/мл. Поддерживали pH культивирования на уровне 6,8 с помощью 12 %-ного раствора гидроксида аммония. В качестве индуктора в ростовую среду добавляли лактозу до концентрации 20 г/л или изопропил- $\beta$ -D-тиогалактозид до конечной концентрации 1 мМ. Аэрация составляла 25 % растворенного кислорода от насыщения до и после индукции изопропил- $\beta$ -D-тиогалактозидом. Аэрация составляла 25 % растворенного кислорода от

насыщения до и 10 % после индукции лактозой. Культивирование продолжали до тех пор, пока прирост оптической плотности культуры за 1 час не снижался до 1 ОЕ. Клетки дрожжей после ферментации центрифугировали 20 минут при 7000 об/мин и 4 °С.

2. *Приготовление экстракта клеток, содержащего интерферон- $\alpha$ -2b.*

Клетки штамма *E. Coli* ресуспендировали в 0,5 л буфера для дезинтеграции (50 мМ натрия фосфорнокислого, 1 мМ ЭДТА, 100 мМ натрия хлористого, pH – 6,8). Клетки разрушали на проточном дезинтеграторе, используя 2 цикла на каждую партию. Тельца включения собирали центрифугированием в течение 30 минут при 10000 об/мин и температуре 4 °С. Осадок телец включения ресуспендировали в 0,5 л отмывочного буфера (50 мМ натрия фосфорнокислого, 1 мМ ЭДТА, pH – 7,2) и собирали центрифугированием, дважды повторяя эту процедуру.

Как видно из приведенных данных после дезинтеграции клеток осадок телец включения подвергали двукратной отмывке. Это необходимо для удаления основной массы нуклеиновых кислот и части растворимых белков. Подобные этапы отмывки присутствуют почти во всех работах с тельцами включения, причем встречаются как относительно простые процедуры с использованием буфера, в котором проводили лизис или дезинтеграцию, так и многоступенчатые, с использованием 3–8 М мочевины, тритона X-100 и других неионных детергентов. По данным авторов, при первой отмывке из осадка телец включения уходит около 30 % клеточного белка от начального количества, а при второй – около 8 %. Потери интерферона по данным SDS-ПААГ-электрофореза при этом незначительны – не более 2 %.

Осадок отмытых телец включения переносят в емкость с частично растворенными навесками буфера для растворения (29 мМ трис-НСl, pH – 8,0, 1 мМ ЭДТА, 7 М гуанидин-НСl). Доводят общий объем до 150 мл и совместно растворяют твердые вещества в течение 2–4 часов при постоянном перемешивании и подогреве до комнатной температуры. В раствор добавляют навеску сульфита натрия (до 30 г/л) и проводят реакцию окислительного сульфитолиза в течение 12 часов при слабом перемешивании и комнатной температуре.

Как известно, в тельцах включения интерферон присутствует в виде высокомолекулярных полимеров (вплоть до 5 млн. Da) с хаотично замкнутыми S-S связями. В связи с этим после растворения осадка телец включения в гуанидин-гидрохлориде проводили реакцию окислительного сульфитолита, которая переводит полимеры интерферона в мономерную форму. Эта реакция более эффективна, чем восстановление S-S связей дитиотреитолом или 2-меркаптоэтанолом. Кроме того, полное растворение белков из телец включения достигается при более высоких концентрациях белка в растворе гуанидин-гидрохлорида, чем при использовании восстановителей.

Полученный раствор S-сульфоната интерферона разводили до 1,5 л 50 мМ Na-фосфатным буфером, осветляли центрифугированием и обессоливали на колонке сефадекса G-25 (11,5 x 55 см), уравновешенной 50 мМ Na-фосфатным буфером, pH – 8,0. На выходе получают 2,5 л раствора интерферона.

В полученный обессоленный и освобожденный от гуанидина и сульфита раствор добавляли 2-меркаптоэтанол до конечной концентрации 1,2 мМ и инкубировали 48 часов при 6 °С без перемешивания. Далее в ренатурирующую смесь медленно добавляли 2 М уксусную кислоту до pH 4,5. Выпавший осадок удаляли центрифугированием. Раствор ренатурированного интерферона концентрировали с помощью ультрафильтрации в 5–10 раз на ультрафильтрационной ячейке Biomax 10 kDa.

После проведения обессоливания и восстановления 2-меркаптоэтанолом интерферон подвергали ренатурации в течение двух суток, а затем изменяли pH с 8,0 до 4,5. На данном этапе образуется осадок, который удаляли центрифугированием. В осадок выпадает часть бактериальных белков, а также часть неправильно собранного интерферона. На этом этапе возможны существенные потери интерферона, количество которого зависит от условий хранения телец включения (замораживались ли они и на какой срок, или же сразу после получения растворялись в гуанидин-гидрохлориде), а также от содержания примесей нуклеиновых кислот и бактериальных белков в ренатурирующей смеси, которые могут являться центром коагуляции интерферона.

### 3. Ионно-обменная хроматография.

Ренатурированный интерферон- $\alpha$ -2b наносят на колонку SP-Toyorearl 550 C (2,6 x 100 см), уравновешенную 10 объемами 50 мМ Na-ацетатного буфера, pH – 4,5, со скоростью потока 600 мл/ч. Колонку промывали тем же буфером, пока оптическая плотность при 280 нм не снижалась до базовых значений. Далее интерферон элюировали 50 мМ Na-ацетатным буфером, pH – 4,5 в градиенте натрия хлористого от 0 до 400 мМ (25 объемов колонки) со скоростью потока 250 мл/ч. Фракции анализировали ВЭЖХ, объединяя те из них, содержание мономера нативного интерферона в которых составляло более 80 %.

Несомненный интерес представляют данные сравнения влияния индукторов интерферона – лактозы и изопропил- $\beta$ -D-тиогалактозида. Показано, что при добавлении лактозы накопление интерферона в клетках происходит медленнее, чем при добавлении изопропил- $\beta$ -D-тиогалактозида. Однако культура при длительной ферментации достигает большей оптической плотности при использовании лактозы. Более того, при последующем выделении интерферона из образующихся в обоих случаях телец включения, субстанция интерферона, полученная из биомассы, индуцированной лактозой, содержит меньшее количество модифицированного (ацетилированного, содержащего N-концевой метионин или окисленные аминокислотные остатки) интерферона по сравнению с препаратом, полученным при индукции изопропил- $\beta$ -D-тиогалактозидом.

Приведенные методы получения интерферонов описывают выделение рекомбинантного продукта из нерастворимых агрегатов – телец включения. Однако, в ряде случаев, например, при получении дельтаферона, который синтезируется в растворенном виде, возможно использование надосадочной жидкости после отделения штамма-продуцента. В качестве штамма-продуцента использовали *E. Coli* МН-1 трансформированные плазмидой pIFN-дельта10. На первой стадии очистки дельтаферона использовали хроматографию на КМ-сефарозе. Дельтаферон практически полностью сорбируется на колонке при значении pH – 8,3; затем элюируется с сорбента в градиенте хлористого натрия от 0 до 0,5 М и при значении pH от 8,3 до 6,5. Доочистку дельтаферона проводили с помощью повторной хроматографии на КМ-сефарозе. Наносимый раствор белка дово-

дили до значения рН – 6,3. Элюцию белка осуществляли в градиенте натрия хлористого от 0 до 1,0 М при значении рН от 6,3 до 8,3. Дельтаферон полностью элюировался с сорбента в виде узкого пика, при этом чистота полученного препарата была более 98 %.

В настоящее время разработаны методы получения субстанций различных видов получения рекомбинантных интерферонов (интерферон- $\alpha$ -2b, интерферон- $\alpha$ -2a,  $\gamma$ -интерферон,  $\delta$ -интерферон и др.) и их готовых лекарственных форм, многие из которых нашли широкое применение в медицине.

### 6.2.2. Технология получения интерлейкинов

На сегодняшний день существуют десятки вариантов технологий получения рекомбинантного интерлейкина-2, отличающиеся используемыми штаммом-продуцента, структурой плазмиды, методами концентрации и очистки фармацевтической субстанции препарата. Мы приводим одну из технологий получения интерлейкина-2, нашедшую практический вариант реализации. Рекомбинантный интерлейкин-2 получен биотехнологическим методом из клеток продуцента – рекомбинантного штамма непатогенных пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, в генетический аппарат которых встроен ген интерлейкина-2 человека. Он представляет собой полипептид, состоящий из 133 аминокислот с молекулярной массой 5,4 кДа.

Первоначально проводят получение культуры продуцента интерлейкина-2. Для этого в отобранный трансформант дрожжей вводят плазмиду pJDB. Данная плазида содержит промотор и терминатор транскрипции гена PH05 дрожжей, кодирующую часть гена интерлейкина-2, обеспечивающего синтез рекомбинантного интерлейкина-2 клетками дрожжей при отсутствии неорганических фосфатов в культуральной среде.

*Технология получения и очистки интерлейкина-2:*

1. Штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* GRF 18-pJDB выращивают в 2-х литрах минеральной среды SC, в состав которой входит 0,67 % дрожжевого пептона, 2 % глюкозы и L-гистидин в количестве 50 мг/мл. Культивирование дрожжей проводят в течение 48 часов при температуре 30 °С и постоянном перемешивании при 170–190 об/мин.

2. Выращенные дрожжевые клетки отделяют центрифугированием. Полученный осадок промывают стерильной водой для инъекций и переносят в 4 литра свежей минеральной среды аналогичной по составу питательной среде SC, но имеющей пониженное содержание неорганических фосфатов (вместо 1500 мг/л однозамещенного фосфата калия в среде содержится 1500 мг/л калия хлорида и 30 мг/л однозамещенного фосфата калия). Культивирование дрожжей проводят в течение 24–48 часов при температуре 30 °С и постоянном перемешивании при 170–190 об/мин. Интерлейкин-2 секретируется в культуральную среду.

3. После достижения оптической плотности культуры дрожжей 5–8 ед. при 600 нм, культуральную среду отделяют от клеток центрифугированием. При росте в аэробных условиях клетки значительно подкисляют среду в интервале рН от 3,5 до 5,5. При необходимости доводят величину рН культуральной жидкости до 4,8 добавлением раствора едкого натра. Выход интерлейкина-2 составляет 30–50 мг биологически активного рекомбинантного белка на 1 литр культуральной жидкости.

4. В культуральную жидкость вносят 150 мл суспензии сорбента CM-сефадекса G-25 или CM-целлюлозы. Суспензию медленно перемешивают в течение 3-х часов при температуре около 4 °С. За это время интерлейкин-2 сорбируется на поверхности сорбента. Сорбент отделяют декантацией, трижды промывают 0,5 л 30 мМ натрий цитратного буфера, рН 4,8 и суспендируют в 0,4 л 1,5 М натрий цитратного буфера с величиной рН – 4,8.

5. Суспензию медленно перемешивают в течение 8 часов при температуре 4 °С. На этой стадии происходит десорбция белков с сорбента. Раствор отделяют декантацией. К сорбенту для промывки прибавляют 0,2 л 1,5 М натрий цитратного буфера с величиной рН 4,8. Элюаты, содержащие интерлейкин-2 объединяют, подвергают центрифугированию при 10000 об/мин в течение 10 минут и наносят на колонку с обращено фазовым носителем.

6. Хроматографию проводят на колонке с носителем в обращенной фазе (средний размер зерна 10 мкм). Смолу уравнивают 0,1 % раствором трифторуксусной кислоты, наносят раствор интерлейкина-2 со скоростью 10 мл/мин и проводят элюцию при помощи элюента (элюент А –

0,1 % раствор трифторуксусной кислоты; элюент В – 0,1 % раствор трифторуксусной кислоты в ацетонитриле). Пробы собирают по 15–18 мл. Оптическую плотность определяют при 280 нм.

7. Интерлейкин-2 обнаруживается в конце хроматографии в области градиента соответствующей примерно 55 % концентрации ацетонитрила. Из фракций в той области, в которой предполагается элюция интерлейкина-2 отбирают аликвоты по 100 мкл. Аликвоты высушивают в вакууме, растворяют в 0,125 М трисгидрохлоридном буфере, рН – 6,8, содержащем 1,0 % додецилсульфата натрия и 1,0 % меркаптоэтанола. Образцы прогревают при 100 °С в течение 2-х минут.

8. Подготовленные указанным способом пробы анализируют при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в стандартной системе буферных растворов. Результаты электрофореза позволяют точно определить границы пика интерлейкина-2.

9. Фракции, содержащие интерлейкин-2, объединяют, добавляют маннитол до концентрации 5 мг/мл и подвергают лиофильному высушиванию. *Биологическая активность рекомбинантного интерлейкина-2, очищенного по приведенной схеме, соответствует биологической активности не рекомбинантного интерлейкина-2 человека, очищенного из культуры человеческих клеток.* Активность составляет 10–30 млн. интерлейкиновых единиц/мг белка. Продукт содержит более 90 % основного вещества. Рекомбинантный интерлейкин-2 человека, синтезированный в клетках дрожжей, обладает биологической активностью, обеспечивая пролиферацию интерлейкин-2 зависимых Т-лимфоцитов мышей линии CTLL-2. Активность рекомбинантного интерлейкина-2 составляет не менее 10 млн. ед. на литр.

Для очистки рекомбинантных белков, в частности, интерлейкина-2 предложено получать химерный белок, который не только стабилизирует пептидную молекулу цитокина, но и позволяет упростить процедуру очистки. Так, плазмидная конструкция *Saccharomyces cerevisiae*, содержащая ген человеческого интерлейкина-2 с присоединенным к нему сегментом ДНК, кодирующий маркерный пептид Asp-Тур-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys, выполняет двоякую функцию: обеспечивает стабилизацию продукта гена интерлейкина-2 и облегчает его очистку. Химерный белок, образующийся

после экспрессии этой генетической конструкции в дрожжевых клетках, может быть очищен за один прием с помощью иммуноаффинной хроматографии. Для этого моноклональные антитела к маркерному пептиду фиксируют на полипропиленовом носителе (подложке) и пропускают через колонку химерный белок, который связывается этими антителами. Маркерный пептид – небольшая молекула, на его образование расходуется лишь малая часть клеточных ресурсов. Химерный белок обладает такой же биологической активностью, что и нативный интерлейкин-2. Однако, если он предназначен для применения в клинике, то маркерный пептид необходимо удалить. Для этого используют бычью энтерокиназу, которая расщепляет связь между пептидом и молекулой интерлейкина. Несомненный интерес представляют разработки, позволившие получить модифицированный рекомбинантный белок, например, комплекс: альбумин человека – интерлейкин-2 или комплекс: дифтерийный токсин – интерлейкин-2.

Сегодня известно две формы интерлейкина-1: альфа и бета. В отличие от интерлейкина-1 $\alpha$  синтезируемого сразу в активной форме, интерлейкин-1 $\beta$  синтезируется в виде предшественника молекулярной массой 33 кДа, активная форма которого образуется в результате отщепления части предшественника ферментами, например, каспазой-1 или матриксными металлопротеиназами.

Интерлейкин-1 $\beta$  получают биотехнологическим путем, используя рекомбинантный штамм *E. Coli*.

Приводим *технологии получения рекомбинантного интерлейкина-1 $\beta$  человека:*

1. Рекомбинантную плазмидную ДНК pPr-TGATG-hIL-1beta-tsr, обеспечивающую синтез рекомбинантного интерлейкина-1 $\beta$  человека трансформацией вводят в клетки штамма *E. Coli* С600. Эффективность трансформации клеток *E. Coli* С600 составляет около 10<sup>6</sup> клонов на 1 мкг нативной ДНК плазмиды. Трансформанты отбирают на среде, содержащей ампициллин (100 мкг/мл) после культивирования клеток 24 часа при 28 °С. Из отобранных клонов выделяют плазмидную ДНК и подтверждают её идентичность препарату ДНК pPr-TGATG-hIL-1beta-tsr с помощью рестриктационного анализа. Получен штамм-продуцент интерлейкина-1 $\beta$  человека – *E. Coli* ВКПМ-В-5830.

2. *E. Coli* ВКПМ-В-5830 выращивают в течение 14 часов при 28 °С на скошенной агаризованной среде Хоттингера, содержащей 50 мкг/мл ампициллина. Выросшую биомассу смывают питательной средой Хоттингера и используют в качестве посевного материала.

3. Клетки *E. Coli* ВКПМ-В-5830 переносят в колбы Эленмейера объемом 750 мл, содержащих 75 мл среды Хоттингера. В среду добавляют 5 г/л глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина. Культивирование проводят при перемешивании в течение 6–8 часов при температуре 28 °С. Культивирование прекращают при достижении плотности посевной культуры 2–3 О.Е. при 540 нм.

4. Полученную культуру в количестве 5,0–7,5 % переносят в ферментер объемом 2 л. Для выращивания культуры используют питательную среду следующего состава (г/л): глюкоза – 20,0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,01; CaCl<sub>2</sub> – 0,01; NaCl – 1; бульона Хоттингера до 1 литра; pH среды 6,75–7,0. Ферментер должен быть оснащен системой измерения и регулирования температуры, pH, парциального давления кислорода, скорости вращения мешалки и подачи стерильного воздуха для аэрации. Культивирование проводят при постоянном перемешивании и начальной температуре 28 °С. Оптимальная зона pH для роста клеток 6,7–6,9. При росте в аэробных условиях клетки значительно подкисляют среду. Для стабилизации pH используют 8 %-ый раствор аммиака. Парциальное давление растворенного кислорода поддерживают на уровне 25–30 % путем регулирования скорости вращения мешалки и расхода воздуха в диапазоне 0,5–1,5 объема от объема культуральной жидкости.

5. При достижении оптической плотности культуры около 10 оптических единиц при 540 нм температуру повышают до 42 °С и процесс культивирования продолжают еще 2–3 часа.

6. После завершения ферментации биомассу охлаждают до 8–12 °С, центрифугированием отделяют культуральную жидкость и дрожжевые клетки промывают 0,05 М раствором фосфатного буфера (pH 7,2 – центрифугированием) для удаления остатков культуральной жидкости и используют для получения интерлейкина-1β.

7. Осадок дрожжевых клеток суспендируют в 0,05 М растворе фосфатного буфера, pH 7,2 и клетки подвергают разрушению (например,

ультразвуковой обработкой в ледяной бане или кипячением в течение 2–3 минут в буфере, содержащем 1,0 % додецилсульфата натрия или другими детергентами). Осадок отделяют центрифугированием, а надосадочную жидкость, содержащую интерлейкин, передают на хроматографическую очистку.

8. Для очистки интерлейкина используют различные виды хроматографии: ионно-обменную, гельфильтрацию ВЭЖХ, аффинную хроматографию.

9. Продуктивность штамма составляет не менее 10–12 % рекомбинантного интерлейкина-1β от суммарного количества бактериальных белков. Биологическая активность интерлейкина не менее 2 · 10<sup>8</sup> МЕ на мг препарата. Выход составляет 5–10 мг интерлейкина-1β на 1 грамм массы влажных клеток.

Многие интерлейкины проходят стадию клинического изучения, некоторые другие нашли разнообразное применение в лечении инфекций, воспалительных, аутоиммунных и неопластических расстройств. Так, интерлейкин-1β (препарат Беталейкин®) применяют в качестве стимулятора лейкопоза при токсической лейкопении II–IV степени, осложненной химио- и радиотерапией злокачественных опухолей и как протектор лейкопоза, при необходимости проведения химиотерапии в условиях лейкопического фона (число лейкоцитов в крови не менее 3 × 10<sup>9</sup> на литр). Основным показанием к применению Беталейкина® в качестве иммуностимулятора являются вторичные иммунодефицитные состояния, развивающиеся после тяжелых травм, обширных хирургических вмешательств, в результате гнойно-септических и гнойно-деструктивных процессов, инфекционных заболеваний, а также при хронических септических состояниях.

Интерлейкин-2 включен в схемы иммунохимиотерапии опухолей (меланомы, почечно-клеточного рака, рака мочевого пузыря, колоректального рака), перитонита, панкреатита, в комплексной терапии гнойно-воспалительных и инфекционных заболеваний.

*В заключение* хотелось бы отметить, что цитокины определяют выживаемость клеток, стимуляцию или ингибирование их роста, дифференцировку, функциональную активность и апоптоз клеток.

### 6.3. Биологически активные факторы

#### 6.3.1. Колонистимулирующие факторы

Нейтропения является одним из наиболее серьезных осложнений системной химиотерапии у больных гемобластозами и прямо коррелирует с увеличением риска инфекционных осложнений и смертности от них. В связи с этим особую актуальность приобретает вопрос использования в клинической практике препаратов, позволяющих сократить длительность нейтропении и снизить частоту инфекционных осложнений – *рекомбинантных колонистимулирующих факторов* (КСФ). КСФ – это группа эндогенных физиологически активных соединений высокомолекулярной полипептидной структуры, обладающих специфической способностью связываться с рецепторами гемопоэтических клеток и стимулировать их пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность. К настоящему времени выделено более 20 факторов роста гемопоэтических клеток, из которых наиболее изучены гранулоцитарно-макрофагальный КСФ (ГМ-КСФ), гранулоцитарный (Г-КСФ), макрофагальный КСФ, эритропоэтин (см. п. 5.3.) и тромбопоэтин.

#### *Гранулоцитарный колонистимулирующий фактор человека.*

Гранулоцитарный колонистимулирующий фактор человека (Г-КСФ) – гликопротеин с молекулярной массой 19 кДа, продуцируемый моноцитами, фибробластами и эндотелиальными клетками. Он обладает стимулирующим действием на стволовые клетки, регулирует образование функционально активных нейтрофилов, их выход в кровь из костного мозга, а также влияет на некоторые функции зрелых нейтрофилов, включая хемотаксис. Широкий спектр иммунобиологической активности Г-КСФ предопределил его востребованность в медицинской практике, что привело к созданию рекомбинантного препарата. Рекомбинантный человеческий КСФ применяется для лечения онкологических больных, ВИЧ-инфицированных и людей с врожденной нейтропенией, для коррекции иммунодефицитных состояний, а также для профилактики инфекционных осложнений.

Гранулоцитарный колонистимулирующий фактор человека был впервые выделен в 1985 г. из среды, в которой культивировались клетки карциномы мочевого пузыря. Гены, кодирующие образование КСФ у человека, расположены на длинном плече хромосомы 17 – для Г-КСФ и хромосомы 5 – для ГМ-КСФ. В организме Г-КСФ продуцируются моноцитами, макрофагами, нейтрофилами, фибробластами, клетками стромы костного мозга. Уровень Г-КСФ в физиологических условиях у здоровых людей низкий, однако, он может значительно возрасти при различных патологических состояниях, связанных с потребностью в большем количестве нейтрофилов. Индукторами синтеза Г-КСФ являются некоторые цитокины, такие как фактор некроза опухоли альфа, интерлейкины-1, -17, ингибитором может выступать простагландин E<sub>2</sub>. Г-КСФ связываются со специфическими рецепторами, которые имеются на гранулоцитах всех стадий созревания. Рецепторы к Г-КСФ – это протеины, состоящие из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 100–150 кДа. На одной клетке гранулоцитарного ряда имеется от 50 до 100 рецепторов.

В последние годы были созданы и внедрены в медицинскую практику рекомбинантные КСФ. К этим препаратам относятся: ГМ-КСФ – молграмостим, Г-КСФ – филграстим и ленограстим. Молграмостим и филграстим представляют собой негликозилированные белки, продуцируемые генно-модифицированным лабораторным штаммом *E. Coli*. Ленограстим – гликозилированный Г-КСФ, близкий по структуре эндогенному фактору, получен из культуры клеток яичника китайского хомячка (СНО). Препарат зарегистрирован в Европе и Японии в 1993 году. Используемая технология позволила получать гликозилированный рекомбинантный Г-КСФ человека, идентичный природному Г-КСФ. Однако было показано, что O-гликозилирование придает молекуле Г-КСФ большую стабильность, защищая сульфгидрильную группу цистеина в положении Cys17, хотя в целом не оказывает существенного влияния на его биологическую активность. Поэтому в подавляющем большинстве случаев в настоящее время больных продолжают лечить именно с использованием филграстима.

Филграстим – гликопротеин с молекулярной массой 19 кДа, продуцируемый моноцитами, фибробластами и эндотелиальными клетками. Филграстим представляет собой одну полипептидную цепь, состоящую из



175 аминокислотных остатков и содержащую на N-конце неотщепленный метионин. Молекула филграстима, также как и природный Г-КСФ, содержит в положении 17 остаток цистеина со свободной сульфгидрильной группой и две внутримолекулярные дисульфидные связи в положениях Cys36-Cys42 и Cys64-Cys74. Две S-S-связи формируют две малые петли, разделенные 21 аминокислотным остатком. Подобно другим рекомбинантным белкам, которые продуцируются в клетках *E. Coli* в виде телец включения, филграстиму необходимо пройти процедуру окислительного рефолдинга для восстановления своей биологической активности. Сегодня известны готовые лекарственные формы филграстима: «Нейпоген», Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд, Швейцария; «Граноген», Фармапарк, Россия; «Нейпомакс», Фармстандарт, Россия и др.

Мы рассмотрим основные **принципы биотехнологического получения рекомбинантного филграстима** по технологии предложенной российскими учеными института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова и российской фармацевтической компании ЗАО «Мастерклон».

Рассматриваемый метод включает пять основных стадий: биосинтез, выделение телец включения, ренатурацию белка, ионообменную хроматографию на носителе Sp-Sepharose FF и гель-хроматографию на матрице Sephadex G-25.

### 1. *Культивирование штамма-продуцента филграстима.*

Культуру штамма-продуцента *E. Coli* BL21(DE3)/pES3-7 выращивали в 250 л питательной среды УТ х 2, содержащей глюкозу (6 г/л), ампициллин (100 мкг/мл) в ферментере объемом 400 л. Культивирование проводили в течение 7–10 часов (рН – 7,0) при температуре 37 °С и перемешивании. Количество посевного материала составляло около 1 % от объема питательной среды (2,5 л). Величину рН во время культивирования корректировали подачей 25 %-ого раствора NH<sub>4</sub>OH. Аэрация составляла 20 % растворенного кислорода от насыщения путем увеличения скорости перемешивания культуральной жидкости от 250 до 400 об/мин и расхода воздуха от 150 до 250 л/час. В процессе выращивания продуцента оценивали клеточный рост путем измерения оптической плотности культуральной жидкости при длине волны 600 нм. При достижении оптической плотности

2,8–3,2 ОЕ индуцировали экспрессию рекомбинантного белка добавлением в культуральную жидкость изопропил-β-D-тиогалактозида. После индукции происходил синтез рекомбинантного белка, который накапливался в клетках в виде телец включения. Через 3 часа культивирования в качестве индуктора в ростовую среду добавляли изопропил-β-D-тиогалактозид до конечной концентрации 0,25 мМ. Культивирование продолжали еще 2–3 часа. Затем клетки, содержащие тельца включения центрифугировали при 16000 об/мин и скорости подачи культуральной жидкости в ротор центрифуги 3–4 литра в минуту.

### 2. *Выделение телец включения.*

Клетки, содержащие тельца включения после центрифугирования, суспендировали в буферном растворе (2М мочевины, 50 мМ ЭДТА, 50 мМ трис-НСl, рН 8,0) в соотношении 1 : 10 (масса/объем) и разрушали в проточном дезинтеграторе при давлении 600 бар. После дезинтеграции клеточную суспензию центрифугировали на проточной центрифуге при 16000 об/мин и скорости подачи суспензии в ротор центрифуги 1 литр в минуту. Тельца включения дважды отмывали от соосажденных клеточных компонентов в буферном растворе (50 мМ трис-НСl, рН 8,0) в соотношении тельца включения/ буферный раствор 1 : 10 (масса/объем). Отмытые тельца включения выделяли на проточной центрифуге при 16000 об/мин и скорости подачи суспензии в ротор центрифуги 1 литр в минуту. Содержание рекомбинантного белка в суммарном клеточном лизате и чистоту телец включения анализировали с помощью электрофореза в ПААГ. Из 1 литра питательной среды получали 1,2 ± 0,1 г телец включения, содержащие по данным электрофореза 58–62 % целевого белка.

### 3. *Ренатурация.*

3.1. Для сольубилизации белков, экспрессированных в тельцах включения, применяют буферные растворы, содержащие хаотропные агенты, такие как мочевины, гуанидин гидрохлорид, додецилсульфонат натрия и другие детергенты. Так как гуанидин гидрохлорид детергенты затрудняют процесс очистки, в качестве сольубилизирующего агента была выбрана мочевины. Оптимизацию условий сольубилизации проводили по двум параметрам: рН и концентрация мочевины. Авторами установлено, что при высоких значениях рН (более 11,0) увеличивается выход белка из телец



включения. Однако при pH 11,5 весьма заметна деградация белковой молекулы Г-КСФ. Также изучено влияние концентрации мочевины (от 0 до 8 М) на освобождение белка из телец включения с учетом выбранного значения pH. Установлено, что наиболее приемлемой концентрацией является 2 М.

Влажные тельцы включения (280 г) растворяли в 8 л буферного раствора (2М мочевины, 50 мМ трис-НСl, pH 11,0) и оставляли перемешиваться в течение 30 минут при комнатной температуре (солюбилизация телец включения).

3.2. Ренатурация является ключевой стадией получения рекомбинантных белков, в процессе которой белковая молекула приобретает пространственную структуру, обеспечивающую её биологическую активность. Известно, что белки, локализованные в тельцах включения, могут иметь правильную вторичную структуру. Известно, что хаотропные агенты в высоких концентрациях приводят к необратимому разрушению вторичной структуры, что значительно затрудняет проведение ренатурации и снижает выход биологически активного белка. Предложенная авторами схема проведения ренатурации сохраняла биологическую активность рекомбинантного белка.

Раствор белка, полученный после солюбилизации, добавляли к различному количеству буферного раствора (5мМ трис-НСl, 0,1 % полисорбата 20, pH 8,0; pH раствора доводили до значения 8,0 при помощи 1 М раствора уксусной кислоты). Полученный раствор медленно добавляли к 3,0 мл 1 М раствора сульфата меди и реакционную смесь оставляли при комнатной температуре и перемешивании на 16–18 часов. Затем в раствор вносили 800 мл 0,5 М раствора ЭДТА и оставляли еще на 2 часа. Затем pH смеси медленно доводили до 4,0 1 М раствором уксусной кислоты.

#### 4. Ионообменная хроматография.

Хроматографическую очистку рекомбинантного филграса проводили при 4 °С на радиальной колонке объемом 1 л. В качестве сорбента использовали Sp-Sepharose FF. Раствор белка после ренатурации (82 л) с помощью перистальтического насоса со скоростью 300 мл/мин наносили на радиальную колонку Sepragen 1000, уравновешенную 50мМ натрий-ацетатным буферным раствором, pH 4,0 (стартовый буфер). После нанесе-

ния всего объема белка сорбент промывали тремя объемами стартового буфера. Сорбированный белок элюировали градиентом концентрации хлорида натрия от 0 до 0,5 М в том же буферном растворе при pH 4,0. Белок отбирали в соответствии с фотометрическим профилем при длине волны 280 нм; фракции, содержащие филграсим, объединяли.

#### 5. Гель-фильтрация.

Раствор белка после ионообменной хроматографии наносили на колонку, заполненную гелем Sephadex G-25 Fine. Колонку предварительно уравнивали буферным раствором (20 мМ ацетата натрия, 5 % сорбита, 0,004 % полисорбата 80, pH – 4,0). Тот же буферный раствор использовали для проведения элюции белка при скорости 120 мл/мин. На этом этапе белок переводили в буфер, пригодный для готового лекарственного средства. Белок в элюате детектировали с помощью проточного фотометра при длине волны 280 нм; фракции, содержащие филграсим, объединяли.

Контроль препарата проводили по следующим тестам: специфическая активность *in vitro* с Международным стандартом филграса по стимуляции роста клеток линии NFS60 мышей; изоэлектрическое фокусирование для определения изоформ и примесей; определение содержания эндотоксинов с помощью гель-тромб-теста (LAL-тест) и др.

Время производственного цикла 30 ч. Выход составляет 90–110 мг субстанции из 1 литра питательной среды (10 грамм за 1 цикл)

По указанной технологии была произведена активная фармацевтическая субстанция филграса и создана готовая лекарственная форма под названием «Нейпомакс».

*В заключение* необходимо отметить, что филграсим обладает стимулирующим действием на стволовые клетки, регулирует образование функционально активных нейтрофилов их выход в кровь из костного мозга, а также влияет на некоторые функции зрелых нейтрофилов, включая хемотаксис. Широкий спектр иммунобиологической активности Г-КСФ предопределил его востребованность в медицинской практике, что привело к созданию рекомбинантного препарата. Рекомбинантный человеческий КСФ применяется для лечения онкологических больных, ВИЧ-инфицированных и людей с врожденной нейтропенией, для коррек-

ции иммунодефицитных состояний, а также для профилактики инфекционных осложнений.

### 6.3.2. Факторы свертывания крови

Рекомбинантные препараты производства *in vitro* и их активные фармацевтические субстанции не несут в себе риска гемотрансмиссионных инфекций. По мере прогресса биотехнологического производства молекулярная структура рекомбинантных препаратов становится все более идентичной природным белкам по структуре и функциональной активности.

Проблема остановки кровотечений является актуальной для многих направлений медицины. Мировые тенденции последнего времени – это использование препаратов крови, а не её компонентов, а также использование продуктов генно-инженерных технологий, которые становятся альтернативой продуктам донорской крови.

Прежде, чем приступить к рассмотрению конкретных рекомбинантных препаратов, необходимо представить *современную модель свертывания крови, состоящую из трех основных стадий*:

*1-я фаза* – инициация процесса свертывания крови, которая развивается за счет образования комплекса тканевого фактора (ТФ): фактора свертывания VIIa на поверхности субэндотелиальных клеток в месте повреждения сосудистой стенки и приводит к образованию незначительного стартового количества тромбина. Тканевой фактор ТФ экспрессируется во многих типах клеток, в том числе в гладкомышечных, фибробластах, макрофагах, не контактирующих с кровью. При нормальных условиях большинство клеток, находящихся в прямом контакте с кровью, лишены ТФ. В их число входят эндотелиальные клетки кровеносных сосудов и тромбоциты, хотя рядом авторов в настоящее время этот факт оспаривается. Исключительным свойством ТФ является его способность связываться с фактором VII с образованием комплекса ТФ : VII. Важно отметить, что в отличие от других прокоагулянтов, циркулирующих в крови в неактивной форме, у здорового человека от 0,01 % до 1 % от всего количества фактора VII присутствует в кровотоке в активированной форме – VIIa.

*2-я фаза* – усиление процесса свертывания крови за счет активации тромбоцитов и целого ряда коагуляционных факторов тромбином, который образуется под влиянием комплекса ТФ / VIIa.

*3-я фаза* – распространение процесса свертывания крови с формированием теназного и протромбиназного комплексов на поверхности активированных тромбоцитов. В результате образуется значительное количество тромбина, способного сформировать сгусток фибрина. Этому процессу способствует уникальные свойства тромбоцитов, которые объясняются наличием на их поверхности высоко аффинных рецепторов для факторов XI, XIa, IX, IXa, VIII, VIIIa, V, Va, X, Xa, протромбина и тромбина. Формирование теназного комплекса (VIIIa / IXa) требует наличия активных форм двух факторов – фактора IXa и фактора VIIIa. Установлено, что активация фактора IX достигается двумя путями. Первый путь – это активация фактора IX комплексом ТФ / VIIa. Образующийся при этом фактор IXa переходит с клеток, несущих ТФ, на поверхность рядом расположенных тромбоцитов, практически не теряя своей активности, поскольку он не подвержен действию ТФPI (ингибитор пути тканевого фактора) и очень медленно ингибируется антитромбином и другими плазменными ингибиторами протеаз. Однако критическое количество активного фактора IX, которое необходимо для остановки кровотечения, образуется другим путем – под влиянием фактора XIa, связанного с тромбоцитами.

Сегодня для терапевтических целей еще достаточно широко используются плазменные факторы, полученные из донорской крови. Учитывая роль указанных факторов в системе свертывания крови, становится понятна актуальность создания рекомбинантных препаратов, принимающих участие в коагуляции. Целью исследований является создание технологии производства рекомбинантных белков – аналогов белков донорской крови, как альтернатива производству лекарственных препаратов получаемых путем фракционирования крови.

*Рекомбинантный активированный фактор VII.* Активированный фактор VIIa занимает уникальное место в обеспечении гемостаза. Во-первых, непосредственно в месте повреждения сосуда фактор VIIa, соединившись с тканевым фактором – ТФ, активирует фактор IX и фактор X. Фактор Xa в этом же месте превращает небольшие количества протромби-

на в тромбин. Это небольшое количество тромбина достаточно для диссоциации комплекса, состоящего из фактора VIII и фактора Виллебранда, и активации тромбоцитов для обеспечения возможности связывания фактора IXa с соответствующими рецепторами тромбоцитов.

Во-вторых, фактор VIIa может и непосредственно активировать фактор X при отсутствии TF, но при наличии достаточного количества фосфолипидов на поверхности активированных тромбоцитов.

Таким образом, фактор VIIa запускает процесс коагуляции по шунтирующему пути, активируя фактор X в обход факторов VIII и IX, т.е. фактор VIIa стимулирует образование тромбина в отсутствие факторов VIII и IX.

Фактор VII свертывания крови является белком-протеазой, с молекулярной массой 50 кДа. Он принадлежит к группе Витамин К-зависимых коагуляционных протеаз. Фактор VII состоит из одной пептидной цепи из 406 аминокислот. Активирование фактора VII происходит благодаря специфическому расщеплению в точке Arg 152.

Препарат рекомбинантного фактора VIIa «Novo Seven» (Novo Nordisk, Дания) используется у больных ингибиторной формой гемофилии А и В и во многих случаях он эффективен в ситуациях, когда все другие методы лечения ингибиторной формы гемофилии оказываются безрезультатными. Кроме того, фактор VII применяется у пациентов с тяжелой степенью недостаточности фактора VII; болезнью Виллебранда; дефицитом фактора XI; кровотечением на фоне приобретенных коагулопатий; кровотечении на фоне тромбоцитопенией различного генеза (болезнью Гланцмана, синдром Бернара – Сулье); передозировкой кумаринов (ятрогенный дефицит фактора VII вследствие ингибирования гамма-карбоксилирования в печени). Получение рекомбинантного фактора VIIa проводят на культуре клеток почек хомяка.

В России сегодня производится препарат VII фактора человека «Коагилл» (Фармстандарт), в состав которого входит субстанция эптактог-альфа (активированная) – VIIa (молекулярная масса 50 кДа), полученная методом генной инженерии из клеток почек хомячков (ВНК-клетки). Потребность в субстанции фактора VII в России составляет около 200 грамм.

Представляют интерес данные, полученные учеными Гематологического научного центра РАМН, института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова и российской фармацевтической компании ЗАО «Мастерклон». Авторами предложена плазмидная ДНК рEFZeoF7, содержащая последовательность полипептида коагуляционного фактора VII человека. Получен штамм ВНК/F7 эукариотических клеток ВНК (клетки почек хомячка), содержащих рекомбинантную плазмиду ДНК рEFZeoF7, кодирующую коагуляционный фактор VII человека. Предложенная учеными экспрессионная конструкция, содержащая последовательность полипептида коагуляционного фактора VII человека отличается от известных конструкций по следующим данным:

- состоит из 6296 п.о., молекулярная масса – 4,16 MDa;
- включает XhoI-BgIII/BamHI фрагмент плазмиды рEFZeoF7, содержащей ген Amp (R), обеспечивающий устойчивость трансформированных клеток к ампициллину; ген, обеспечивающий устойчивость трансформированных клеток к зеоцину;
- уникальные участки узнавания следующих рестриктаз – NotI (31 п.о.), XhoI (61 п.о.), pstI (1142 п.о.), BamHI (1946 п.о.).

Выход рекомбинантного фактора VII человека около 4 мкг/мл культуральной среды, что в четыре раза выше, чем у других производителей. Применение рекомбинантных препаратов позволяют освободиться от трансмиссионных инфекций.

**Рекомбинантные факторы VIII и IX.** Первый рекомбинантный фактор VIII с альбумином в качестве стабилизатора был лицензирован в 1992 году. Позднее был создан препарат второго поколения (с делецией В-домена), не содержащий альбумин. Для лечения гемофилии используется несколько препаратов содержащих рекомбинантный фактор VIII: «Kogenate FS» (Bayer Corporation), «Helixate FS» (Aventis-Behring), «Recombinate» (Baxter Hyland Immuno), «ReFacto» (Genetics Institute). Эти препараты находятся на фармацевтическом мировом рынке с 2000 года.

Первоначально для препаратов, например, «Kogenate FS» (молекулярная масса – 80 кДа, получен на культуре почек хомячков) использовалась среда для клеточной культуры, содержащая раствор белков плазмы крови человека и рекомбинантный инсулин. Процесс очистки включал

этап вирусной инактивации с использованием сольвент / детергентной обработки; этапы ионообменной хроматографии и иммуноаффинной хроматографии с моноклональными антителами. Производители препаратов провели валидационные исследования и доказали, что предлагаемые методы очистки позволяют устранить инфективность препарата, что гарантирует проявление трансмиссионных инфекций (модельные эксперименты проведены на губчатой энцефалопатии и ряде вирусов).

Необходимо отметить, что производители указанных препаратов проводят постоянное совершенствование технологии и повышение уровня качества продукта. Так, например, из состава «Kogenate FS» и «ReFacto» был удален альбумин. В 2008 году был получен рекомбинантный фактор VIII, в технологии которого: культивирование клеточной линии проводилось без альбумина; при проведении аффинной хроматографии моноклональные антитела были заменены на синтетический полипептидный лиганд; стадия нанофильтрации проведена на фильтре с размером пор 35 нм.

Таким образом, на стадии высоко избирательной аффинной хроматографии применяется синтетический лиганд, разработанный для устранения потенциального заражения мышиными вирусами. Определение низкомолекулярных лигандов проводится при помощи метода докинга *in silico* – скрининга библиотек химических соединений для поиска новых аффинных сорбентов на основе низкомолекулярных пептидов или новых лекарственных средств. Синтетический лиганд зафиксирован на смоле для хроматографии. Лиганд известен под названием TN 8.2. При сравнении эффективности проведения аффинной хроматографии с синтетическим лигандом и мышиными моноклональными антителами выявлены следующие преимущества лиганда: выход составляет 85 %, а при использовании антител 63 %. Удаление белков яичника хомячков при использовании лиганда в 1,15 раза выше, чем при работе с антителами.

По данным профессора Б. Колвина из Великобритании уровень TN 8.2 в лекарственной субстанции крайне низкий – не более 1 промиля. TN 8.2 не токсичен при избытке в 300 млн. раз на животной модели и не создает помех при определении коагуляционной активности при избытке в 1 млн. раз. Кроме того, достаточно как минимум одной обработки продукта для удаления TN 8.2. В результате разработки получен препарат реком-

бинантного фактора VIII высокой степени очистки: примеси ДНК клеток хомячков не более 10 пг/МЕ; примеси протеина клеток хомячков не более 80 пг/МЕ.

Препарат рекомбинантного фактора IX был разработан в 1997 после осуществления клонирования соответствующего гена и лицензирован в 1999 году. Это белок отличается от естественного количеством посттрансляционных модификаций и фармакокинетикой, обуславливающей более высокую дозировку. Препарат, получивший название «Venefix» до сегодняшнего дня является единственным продуктом, который в настоящее время имеется в продаже. *Ключевые стадии производства рекомбинантного фактора IX* можно определить как:

1. Стабильное внедрение генов фактора IX в клетки яичников китайского хомячка;

2. Отбор клеточной линии, способной экспрессировать большие количества активного рекомбинантного фактора IX при культивировании в биореакторе в питательной среде, которая полностью освобождена от продуктов крови или плазмы;

3. Очистка рекомбинантного фактора IX с использованием нанофильтрации и хроматографии без применения моноклональных антител на Q-сефарозе FF. Нанофильтрация на мембранах «Виресол-70» включена для: повышения уровня вирусной безопасности и удаления протеинов и вирусов с молекулярной массой более 70 кДа. Стадия хроматографии и нанофильтрации прошли валидацию в плане доказательства удаления вирусов с использованием модельных экспериментов с участием 3–4 видов вирусов.

Фактор VIII применяют при заболевании гемофилии А, болезни Виллебранда (лечение и профилактика кровотечений, в том числе во время хирургических вмешательств); приобретенный дефицит VIII фактора, заболевания, сопровождающиеся образованием антител к фактору VIII.

Фактор IX применяют при геморрагическом синдроме при дефиците фактора IX (врожденном или приобретенном) гемофилии В и А (монотерапия или в сочетании с ингибиторами фактора VIII), передозировка антикоагулянтов кумаринового ряда или необходимость проведения вмешательств на фоне их применения.

### 6.3.3. Факторы некроза опухоли

Факторы некроза опухоли (Tumor necrosis factor alpha – TNF $\alpha$ ) получили название по своему биологическому эффекту – способности оказывать цитотоксическое действие на опухолевую клетку за счет генерации активных форм кислорода и окиси азота, вызывая геморрагический некроз опухоли, не повреждая нормальные клетки организма. Кроме опухолевых клеток, фактор некроза опухоли обладает способностью ликвидировать клетки, пораженные вирусом.

В настоящее время, известен фактор некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО $\alpha$ ) и фактор некроза опухоли- $\beta$  (ФНО $\beta$ ). ФНО $\alpha$  продуцируется моноцитами, активированными макрофагами, Т-клетками и другими клетками в организме и стимулирует лимфоциты, фибробласты, разрушает инфицированные и трансформированные клетки. ФНО $\alpha$  по механизму действия относится к цитокинам. ФНО $\beta$  (он же лимфотоксин- $\alpha$  – ЛТ $\alpha$ ) продуцируется Т-клетками и стимулирует лимфоциты, нейтрофилы, эозинофилы, фибробласты, разрушает инфицированные и трансформированные клетки.

ФНО $\alpha$  представляет собой полипептид с молекулярной массой около 17 кДа, состоящий из 157 аминокислотных остатков. Первоначально открыт в 1975 году, как вещество способное вызывать некроз саркомы мышей. Позднее было показано, что он способен вызывать лизис опухолевых клеток различных линий, и не действует на нормальные клетки организма. К настоящему времени показано, что ФНО $\alpha$  обладает различными биологическими активностями, играет ключевую роль в иммунной и воспалительной реакциях организма. На фармацевтическом рынке ФНО $\alpha$  представлен несколькими поколениями:

- ✓ препараты, содержащие ФНО $\alpha$ , представляющие экстракты тимуса млекопитающих;
- ✓ синтетический ФНО $\alpha$ , полученный путем химического синтеза;
- ✓ ФНО $\beta$ , полученный путем культивирования клеток (например, человеческие периферические моноциты крови или перевиваемая культура HL-60 человеческой клеточной линии) и последующей очисткой фактора;
- ✓ рекомбинантный ФНО $\alpha$ , полученный путем биосинтеза с использованием *E. Coli*.

ФНО $\beta$  представляет собой полипептид с молекулярной массой около 20 кДа. Рекомбинантный ФНО $\beta$  человека представляет собой негликозилированный полипептид с молекулярной массой около 17 кДа, идентичен природному полипептиду ФНО $\beta$  человека с 22-й по 177. Аминокислоту, метилированную с N-конца. Рекомбинантный ФНО $\beta$  сохраняет свойства природного, вызывает некроз некоторых видов опухолей и является иммуномодулятором широкого спектра действия. ФНО $\beta$  обладает выраженным противовирусным действием, описаны также его радиопротекторные свойства.

Рассмотрим несколько технологических схем получения факторов некроза опухолей, в частности, **типовую схему получения фактора путем культивирования клеток и последующей очисткой белковой молекулы.**

1. Человеческие периферические моноциты крови используют для получения фактора некроза опухоли (моноциты должны быть использованы в течение 24 часов после сбора). Разделение моноцитов и эритроцитов достигается центрифугированием на Фиколл-Гипак градиентах при 1000 g в течение 30 минут. Клетки, собранные на разделе фаз, трижды промывают забуференным фосфатным солевым раствором. Моноциты, полученные от каждого донора, выращивают отдельно в 2-х литровых вращающихся колбах среде RPMI 1640 (без сыворотки) при плотности клеток  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл. Прибавляют к культуре по 1 мкг/мл каждого индуктора: стафилококкового энтеротоксина В и рекомбинантного тимозин- $\alpha 1$  и инкубируют клетки в увлажненной атмосфере при 37 °C с 10 % CO $_2$ . После 24–72 ч, собирают клетки (от каждого донора) надосадочного слоя фильтрацией через 3 мкм Синклин фильтр. Прозрачный фильтрат испытывают на активность фактора некроза опухолей и используют для последующей очистки.

2. Полученный на стадии 1 фильтрат обрабатывают стеклянными шариками с контролируемыми порами для абсорбции ФНО на шариках. Шарика уравнивают 10 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 8,0. Процесс проводят при постоянном перемешивании и температуре 4 °C, используя 100 мл стеклянных шариков на 5 л среды. После 1 часа перемешивания, шарикам дают отстояться и декантируют надосадочный слой. Затем шарика переносят в колонку (5 x 50 см) при комнатной температуре и

промывают 10 мМ натрий фосфатным буфером, рН 8,0, содержащим 1 М NaCl. ФНО элюируют со стеклянных шариков 20 %-ным этиленгликолем в 10 мМ натрий фосфатного буфера, рН 8,0, содержащим 1 М NaCl.

3. Элюат со стадии 2 наносят на колонку (2,5 x 20 см) с ДЕАЕ целлюлозой 53, уравновешенную 10 мМ натрий фосфатным буфером, рН 8,0, содержащим 0,01 % Твин 20, при скорости потока приблизительно 500 мл/час. После того как скорость потока установится 100 мл/час, вносят  $4,2 \times 10^6$  единиц ФНО в образце 1000 мл при 4 °С. Колонку промывают указанным буфером и элюируют при возрастающем градиенте от 75, 150 и 500 мМ NaCl в 10 мМ фосфатном буфере, рН 8,0. Элюат контролируют по поглощению при 280 нм и по активности ФНО.

4. Полученный на 3-ей стадии элюат концентрируют и диализуют на мембране, пропускающей молекулярные массы меньше, чем у ФНО. Полученный концентрат ФНО помещают в колонку (5 x 0,5 см), заполненную сефарозой замещенной четвертичными аммониевыми группами. Промывают колонку буфером А (20 мМ Трис-HCl, рН-8,0, 0,01% Твин 20), а затем элюируют при линейном градиенте 40–75 мМ NaCl в буфере А. Элюент собирают в виде фракций по 2 мл и контролируют по поглощению при 280 нм и активность фактора некроза опухоли.

5. Полученные на стадии 4 фракции, содержащие ФНО, подвергают дальнейшей очистке рядом методов, определяемых исследователем:

- хроматофокусирование (изоэлектрическая точка ФНО находится при 5,3);
- препаративным электрофорезом на SDS-полиакриламидном геле (приблизительно 80 % активности ФНО инактивируется на этой стадии) – применяют для аналитического изучения;
- высокоэффективная жидкостная хроматография позволяет выделить гомогенный ФНО с сохраненной биологической активностью.

Разработаны также способы получения рекомбинантных препаратов: ФНО $\alpha$ -тимозина и ФНО $\beta$ , используемых как для экспериментальных работ, так и для применения в клинике.

Рассмотрим *технологическую схему выделения и очистки рекомбинантного ФНО $\alpha$ -тимозин*. Для получения гибридного белка ФНО $\alpha$  используют плазмидную ДНК рThy230, кодирующую данный белок. Гибридный белок ФНО получают культивированием штамма *E. Coli* SG20050 с плазмидой рThy230.

1. Выращивают штамм *E. Coli* SG20050 в 5 мл LB-среды при 37 °С в течение ночи. Разводят культуру свежим LB-средой в 50–100 раз и растят на качалке при 37 °С до оптической плотности при 590 нм равной 0,2–0,3. Если оптическая плотность более 0,3 культуру разводят LB-средой до 0,1 и подращивают 30 мин. Переносят 100 мл культуры в стерильную центрифужную пробирку и осаждают клетки при 4 °С 5000g в течение 10 минут. НЖ удаляют, клетки суспендируют в 50 мл 0,1 М CaCl<sub>2</sub> охлажденного на льду. Инкубируют клетки 20 минут на льду и их осаждают центрифугированием при 5000 об/мин, в течение 10 мин при температуре 4 °С. НЖ удаляют, клетки суспендируют в 3 мл 0,1 М CaCl<sub>2</sub>, охлажденного на льду. К компетентным клеткам прибавляют стерильный глицерин до 15 % и хранят клетки для трансформации до трех месяцев при минус 70 °С. Переносят 3 мл клеток в охлажденную пробирку и добавляют 5–10 мкг плазмидной ДНК рThy230. Инкубируют на льду 1 час, а затем пробирку инкубируют при 42 °С в течение 5 минут. Переносят клетки в колбу с 100 мл нагретого до 37 °С L-бульона без антибиотика и инкубируют при 37 °С в течение 60–90 минут. Заполняют ферментер вместимостью 10 л 7 литрами L-бульона с ампициллином в концентрации 50 мкг/мл. Нагревают среду в ферментере до температуры 30–34 °С и вносят посевную дозу 100 мл L-бульонной культуры свежеполученных трансформантов. Культивируют при температуре 30–34 °С и перемешивании (250–300 об/мин) с аэрацией воздуха 0,5 л/мин на один литр бульона. При достижении стационарной фазы роста, берут пробу для определения уровня синтеза гибридного белка методом электрофореза в 15 % в полиакриламидном геле с додецилсульфатом (ПААГ-ДСН). Клетки отделяют центрифугированием или микрофилтрацией, а затем используют для выделения гибридного белка. Экспериментально определено, что культивирование штамма *E. Coli* SG20050 (рThy230) при 30–34 °С приводит к образованию 100 % гибридного белка в растворимой форме.



2. *Выделение и очистка Т-ФНО*. Клетки штамма *E. Coli* SG20050 с плазмидой pThy230, выращенные при 30–34 °С, осаждают центрифугированием при 6000 об/мин 4 °С в течение 10 минут. Среду удаляют, клетки суспендируют в лизирующем буфере, содержащем 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 5 мМ ЭДТА и 1мМ феноксиметилсульфонилфторида (ФМСФ), из расчета 10 мл буфера на 1 г клеток. Клетки разрушают пригодным способом, например, замораживанием – оттаиванием; ультразвуком трижды по 40 сек при 22 кГц; продавливанием через фильеру в French-прессе. Полученный лизат центрифугируют 10 мин при температуре 4 °С, и 5000g. НЖ отделяют от осадка и доводят СН<sub>3</sub>СООН до рН 5,8. Добавляют (NH)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до 28 % насыщения. Инкубируют 30 минут при комнатной температуре, центрифугируют 8000 g в течение 10 мин. НЖ наносят на колонку с фенол-сефарозой, уравновешенной 25 мМ натрий ацетатным буфером, содержащим 33 % (NH)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, рН 5,6–5,8 (на 30 мл носителя около 100 мл лизата). Промывают колонку после нанесения белка 25 мМ натрий-ацетатным буфером, рН 5,8 (без (NH)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), а затем элюируют белок 7 М раствором мочевины в том же буфере. Фракции, содержащие гибридный белок, наносят на колонку с носителем ДЕАЕ, уравновешенным 25 мМ натрий-ацетатным буфером рН 5,8 с 7 М мочевиной. Загрузка на 100 мл носителя около 100 мл белка. Промывают колонку 25 мМ натрий-ацетатным буфером рН 5,8 с 7 М мочевиной и 150 мМ NaCl. Фракции с гибридным белком наносят на колонку с голубой агарозой, уравновешенной 25 мМ натрий-ацетатным буфером рН 5,8 с 7 М мочевиной и 0,4 М NaCl. К образцу белка, фракции с ДЭАЕ, добавляют 1/100 объема 100 мМ ФМСФ и NaCl до 0,4 М. Наносят белок объемом до 200 мл на 30 мл носителя. Элюируют белок 50 мМ натрий-фосфатным буфером рН 7,8 с 7 М мочевиной и 400 мМ NaCl. Фракции, содержащие гибридный белок диализуют при 4–8 °С в течение 18 часов против 100 объемов буфера (150 мМ NaCl, 10 мМ натрия фосфата, рН 7,2–7,4). Заменяют буфер и диализуют еще несколько часов. Белок хранят при минус 20 °С.

Контроль биологической активности ФНО $\alpha$ -тимозина проводят в тесте цитотоксичности на линии клеток фибросаркомы мыши L-929.

Клетки L-929 выращивают на среде RPMI 1640 с добавлением сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота, 2мМ L-глутамин и 50 мкг/мл

гентамицина. Клетки помещают в лунки планшета и проводят инкубацию при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> в течение ночи до образования монослоя. После инкубации удаляют среду и добавляют по 100 мкл свежей ростовой среды и двукратные разведения исследуемого ФНО $\alpha$ -тимозина. В качестве контроля используют аттестованный стандарт ФНО $\alpha$ -тимозина. Клетки инкубируют в течение 12 часов при тех же условиях. После инкубации среду удаляют и клетки окрашивают 0,5 % раствором генцианового фиолетового в течение 15 мин, после чего промывают водой и измеряют оптическую плотность. За единицу активности принимают разведение препарата, вызывающее 50 % гибель клеток, учитывая исходную концентрацию гибридного белка в препарате. Гибридный белок ФНО $\alpha$ -тимозин обладает цитотоксической активностью 1–2·10<sup>7</sup> ед/мг белка. Исследованиями ФНО $\alpha$ -тимозина в ПААГ-ДСН установлено: молекулярная масса 22 ± 1 кДа и чистота более 95 %. При гидролизе в 80%-ной муравьиной кислоте при 37 °С в течение 40–48 ч происходит расщепление ФНО $\alpha$ -тимозина на два фрагмента: ФНО с молекулярной массой 17,5 ± 0,5 кДа и тимозин- $\alpha_1$  с молекулярной массой 3,1 ± 0,1 кДа.

Лекарственные препараты, содержащие тимозин- $\alpha_1$  является одним из немногих препаратов для лечения хронических вирусных гепатитов: для проведения монотерапии гепатита В и в составе комбинированной терапии с интерфероном для лечения хронического гепатита С.

*Для получения рекомбинантного человеческого ФНО $\beta$  используют технологическую схему сходную со схемой получения ФНО $\alpha$ , отличающуюся по ряду принципиальных положений.*

В качестве штамма продуцента используют штамм *E. Coli* SG20050, трансформированный плазмидой pLT21, кодирующей ФНО $\beta$  под контролем двух промоторов ранней области бактериофага T7.

Клетки штамма *E. Coli* SG20050 с плазмидой pLT21, выращенные при 30–34 °С, осаждают центрифугированием при 6000 об/мин 4 °С в течение 10 минут. Среду удаляют, клетки суспендируют в лизирующем буфере (А), содержащем 10 мМ трис-НСl, рН 8,7–9,2, 1 мМ ЭДТА и 0,1мМ феноксиметилсульфонилфторида (ФМСФ), (5 мл буфера на 1 г клеток). Клетки разрушают ультразвуком. Клеточный дебрис удаляют центрифугированием. НЖ подвергают очистке на ДЕАЕ-целлюлозе ДЕ-52. Элюируют

ние проводят линейным градиентом концентрации NaCl в буфере А. Фракции анализируют электрофорезом в 15 % в полиакриламидном геле. Фракции, содержащие рчФНОβ, объединяют. Обычно рчФНОβ элюируются с колонки при концентрации натрия хлорида 0,07–0,12 М. Объединенные фракции разбавляют в 2 раза буфером Б (10мМ КН<sub>2</sub>Р<sub>4</sub>, рН 7,0) доводят раствором HCl величину рН до 7,0 и наносят на колонку с гидроксилалатитом, уравновешенную буфером Б. После нанесения белкового раствора на колонку её промывают буфером Б до снижения оптической плотности раствора при длине волны 280 нм до оптической плотности буфера Б и белки элюируют линейным градиентом концентрации КН<sub>2</sub>Р<sub>4</sub> от 0,01 до 0,3 М при рН 7,0. Обычно рчФНОβ элюируется при концентрации 0,15–0,2 М. Фракции, содержащие рчФНОβ объединяют и диализуют против буфера В (20 мМ НЕРЕС, рН 6,6) в течение 20 часов и наносят на колонку с гидроксилалатитом, уравновешенную буфером В. Обычно рчФНОβ элюируется при концентрации 0,15–0,2 М. Фракции, содержащие рчФНОβ объединяют и диализуют против буфера Г (10 мМ NaH<sub>2</sub>Р<sub>4</sub>, рН 7,2, 0,15 М NaCl) Полученный препарат содержит 1,4 мг/мл (общий объем 73 мл), активность  $3 \cdot 10^7$  ед/мг белка, электрофоретическая чистота не менее 95 %, содержание примесей ДНК – 32 пг/мл, ЛПС 200 нг/мг. Выход составляет 20 % от исходного гибридного белка.

Как прогормон ФНО существует в физиологических условиях в виде белка клеточной мембраны, экспрессируясь на поверхности макрофагов / моноцитов. При наступлении экстремальных условий, например, при вирусной инфекции или новообразованиях, под воздействием активирующих факторов транскрипция гена ФНОα повышается в 3 раза, возрастает количество мРНК, вследствие чего увеличивается его количество. ФНО способен транскрибироваться в ответ на всевозможные стимуляторы (вирусы, энтеротоксины, эндотоксины и др.). Активный ФНО синтезируется, как правило, в течение 2 часов, далее вне зависимости от уровня антигенной стимуляции наблюдается прекращение транскрипции.

В настоящее время на фармацевтическом рынке присутствует несколько препаратов, в которых в качестве активного фармацевтического ингредиента присутствует ФНОα-тимозин. Одним из таких препаратов является «Рефнот», производства российской фирмы «Фармаклон». «Реф-

нот» обладает прямым противоопухолевым действием *in vitro* и *in vivo* на различные линии опухолевых клеток. Препарат представляет собой генно-инженерный слитый белок на основе фактора некроза опухоли α и тимозина α1 и рекомендован при раке молочной железы. Причем, токсичность препарата в 100 раз меньше, чем токсичность природного ФНО. Механизм действия ФНОα-тимозин можно представить как:

- непосредственное воздействие белка ФНОα-тимозин на опухолевую клетку;
- мишень через соответствующие рецепторы на её поверхности, в результате чего происходит апоптоз клетки (цитотоксическое действие) или прекращение клеточного цикла (цитостатическое действие);
- каскад химических реакций, включающий активацию коагуляционной системы крови и местных воспалительных реакций, обусловленных активированным действием препарата клетками эндотелия и лимфоцитами, ведущее к «геморрагическому» некрозу опухоли;
- блокирование ангиогенеза приводящее к уменьшению прорастания новыми сосудами быстрорастущей опухоли и как следствие снижения кровоснабжения, вплоть до некроза опухоли;
- воздействие клеток иммунной системы, цитотоксичность которых оказалась тесно связанной с наличием молекул ФНОα-тимозин.

Установлено, что комбинация ФНОα-тимозин (препарат «Рефнот») с рекомбинантными α- и γ-интерферонами обладает синергичным цитотоксическим эффектом. Препарат «Рефнот» усиливает противовирусную активность рекомбинантного γ-интерферона в 100–1000 раз против вирусного везикулярного стоматита.

Известен препарат «Альноран», представляющий собой человеческий рекомбинантный ФНО-α, применяемый в комплексной терапии у взрослых при солидных опухолях различной локализации: злокачественных заболеваниях кожи, саркома Капоши, опухолях молочной железы, рака головы и шеи, меланомы и др. Кроме того, «Альноран» усиливает действие цитотоксических противоопухолевых препаратов при комбинированной терапии. Препарат «Бефнорин», представляющий собой человеческий рекомбинантный ФНОβ, идентичный природному ФНОβ с 22 по 171



аминокислоте с добавлением метионина на N конце, обладающий иммуностимулирующим, противоопухолевым и антиметастатическим действием.

Нельзя не остановиться еще на одном вопросе. При ряде заболеваний и патологических состояний наблюдается увеличение количества ФНО, что приводит к активизации патологических процессов и затруднению лечения. К таким заболеваниям относятся: ревматоидный артрит, туберкулез, болезнь Альцгеймера и другие заболевания ЦНС, грибковые инфекции и др. В этих случаях необходимо проводить нейтрализацию ФНО. Основными ингибиторами ФНО в настоящее время являются инфликсимаб, адалимумаб, этанерцепт, представляющие собой рекомбинантные препараты моноклональных антител (материалы о моноклональных антителах изложены в учебном пособии: Краснопольский Ю.М., Борщевская М.И. «Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов». Харьков, НТУ «ХПИ», 2009 г.). Являясь антицитокинами, каждый из этих антител в значительной степени нейтрализует ФНО $\alpha$  и тем самым существенно тормозит ряд патологических процессов.

Необходимо отметить, что в настоящее время, ФНО $\alpha$ -тимозин (TNF $\alpha$ ), ФНО $\beta$  (TNF $\beta$ ) и рецепторы факторам некроза опухоли: Fas (CD95), FasL, TRAIL, CD40L, CD27L, CD30L (L- лиганд) и другие относятся к семейству фактора некроза опухоли.

Исследования по изучению структуры и свойств представителей данного семейства развиваются достаточно интенсивно и приводят к появлению оригинальных диагностических и лекарственных продуктов.

#### 6.4. Антитромботические препараты

При ряде патологических состояний возникает тромбирование сосудов, что приводит к смертности при остром инфаркте миокарда и при тромбоэмболиях мозговых артерий. Тромб состоит из молекул фибрина, фактора свертывающей системы крови, образующего сеть в ответ на повреждение сосудистой стенки. Антисвертывающая система представлена плазмином (фибринолизин) – протеолитическим ферментом, находящимся в крови в неактивном состоянии (плазминоген), белками плазмы крови (протеинами С, S, антитромбином III, тормозящими процесс образо-

вания фибрина, а также веществами, продуцируемыми или фиксированными на эндотелиальных клетках, например, гепарин (см. главу 3). В случае неэффективности системы, предотвращающей образование фибрина, используют лекарственные препараты как активаторы плазминогена.

Рассмотрим роль плазминогена в системе растворения тромба при закупорке артерий. *Плазминоген* – одноцепочечный гликопротеин с молекулярной массой 90 кДа, превращающийся в плазмин с помощью природных активатор, находящихся в небольшом количестве в органах и тканях (активаторы плазминогена тканевого типа), либо с помощью стрептокиназы. Активаторы плазминогена тканевого типа представлены ферментами и являются естественными тромболитическими агентами. Например, трипсин, находящийся в крови активирует плазминоген, превращая его в плазмин (фибринолизин). Плазмин является протеолитическим ферментом – эндопептидазой, который вызывает только наружный лизис тромба (преимущественно в венах) так как быстро нейтрализуются антиплазмином, в избытке циркулирующим в крови. Кроме того, плазмин обладает свойствами активатора, переводящего эндогенный плазминоген в плазмин. Продукты деградации фибрина, образующиеся при его разрушении, препятствуют полимеризации мономеров фибрина и образованию тромбопластина.

С учетом энзиматических и иммунохимических свойств, способности связывать фибрин плазмы крови, *активаторы плазминогена* принято делить на *активаторы тканевого типа* (препарат, полученный из клеток меланомы человека и рекомбинантный тромболитический препарат – альтеплаза) и *активаторы урокиназного типа* (урокиназа, стрептокиназа, стрептодеказа и др.).

В настоящее время в Украине зарегистрирован и используется в клинической практике ряд препаратов: Стрептокиназа – Эберкиназа (Heber Biotec), Стрептаза (Aventis Behring), Строкиназа (Byarat Serum & Vaccines); Альтеплаза – Актилизе (Boehringer Ingelheim); Урокиназа (Medac); Фибринолизин (Биофарма). На мировом фармацевтическом рынке присутствуют разработки препаратов: Альтеплазы – Activase (Genentech), Стрептокиназа (Kabi Vitrum, Smith Kline, Hoechst); сконструированная химерная молекула, содержащая фрагмент активатора плазминогена тканевого типа, уроки-

назы и проурокиназы (Ciba-Geigy); ацилированный комплекс стрептокиназы и плазминогена (Beecham).

*Альтеплаза* – тромболитическое средство, гликопротеин, рекомбинантный человеческий тканевой активатор плазминогена. После внутривенного введения находится в кровотоке в неактивном виде. Связываясь с фибрином, стимулирует переход плазминогена в плазмин, который растворяет сгустки фибрина. Из-за относительной фибриноспецифичности альтеплаза при введении в терапевтической дозе лишь незначительно влияет на уровень фибриногена, плазминогена и  $\alpha$ -2-антиплазмина крови. Антигенные свойства не выражены. Применение альтеплазы способствует снижению уровня смертности при остром инфаркте миокарда, благоприятно влияет на течение заболевания и прогноз при острой тромбоэмболии легочной артерии и ишемическом инсульте. Альтеплаза быстро выводится из кровеносного русла и подвергается метаболизму, в основном, в печени. Через 20 минут в плазме крови определяется менее 10 % от исходной концентрации активного вещества. Альтеплаза получена с использованием штаммов-продуцентов *E. Coli* и *S. cerevisiae*, в которые был введен ген активатора плазминогена тканевого типа, который расположен у человека в хромосоме 8.

*Стрептокиназа* – высокоочищенный фермент, получаемый при культивировании штамма  $\beta$ -гемолитического *Streptococcus* группы С с молекулярной массой 40–50 кДа. Обладает фибринолитической активностью. При соединении с плазминогеном стрептокиназа образует комплекс, активирующий переход плазминогена крови или кровяного сгустка в плазмин. Плазмин растворяет сгустки фибрина, а также приводит к деградации фибриногена и других белков плазмы крови. После окончания инфузии гиперфибринолитический эффект стрептокиназы наблюдается только в течение нескольких часов, однако удлинение тромбинового времени может сохраняться до 24 часов. Вследствие одновременного снижения уровня фибриногена и увеличения числа циркулирующих продуктов деградации фибрина и фибриногена. Период полувыведения комплекса стрептокиназа – плазминоген, активирующего плазмин, составляет около 23 минут. Поскольку стрептокиназа является слабым стрептококковым антигеном, она частично инактивируется антистрептококковыми антителами, которые

всегда присутствуют в крови. Состояние фибринолиза достигается только при введении избыточного количества стрептокиназы, необходимого для нейтрализации антител и последующего проникновения активной стрептокиназы в тромб. Применяют фермент при остром инфаркте миокарда, тромбозе глубоких вен, острой массивной тромбоэмболии легочной артерии, тромбировании гемодиализного шунта и др.

В настоящее время активно проводится исследование на создание рекомбинантных препаратов стрептокиназы, например, в Украине зарегистрирован рекомбинантный препарат стрептокиназы – «Эберкиназа» (Heber Biotec, Куба). Фирма «Phillips Petroleum» (США) запатентовала метод экспрессии фермента в *S. cerevisiae*, экспрессируемый в дрожжах белок по биологической активности и молекулярной массе идентичен стрептокиназе, полученной из *Streptococcus* (выход фермента 1 г с 1 литра среды).

*Урокиназа* – фермент – активатор плазминогена, получаемый из культур клеток эмбриона почки человека. Активным центром которого является аминокислота серин (синоним – сериновая протеаза). Урокиназа обладает специфическим сродством с плазминогеном и превращает плазминоген непосредственно в плазмин путем гидролиза связи аргинин-валин. Оказывает фибринолитическое действие, активировать глю- и лиз-плазминогены, превращает их в плазмин, вызывающий ферментативное разрушение фибрина. Лизис фибрина приводит к дезинтеграции составных элементов тромба и его распаду на мелкие фрагменты, которые уносятся током крови или растворяются на месте плазмином. Образовавшиеся продукты деградации фибриногена способствуют гипокоагуляции, блокируют агрегацию эритроцитов и тромбоцитов, снижают вязкость крови. Период полувыведения не превышает 20 минут. Урокиназа не обладает выраженными антигенными свойствами, поэтому при её использовании меньшая опасность возникновения аллергических реакций и её назначают повторно. Применяют при острых тромбозах, тромбоэмболии артерий и вен, остром инфаркте миокарда, нестабильной стенокардии, тромбозе глубоких вен, тромбозе артериовенозного шунта.

В качестве антитромботических препаратов предложены химерные (гибридные) молекулы, содержащие активаторы плазминогена тканевого типа и урокиназы. Эти гибридные молекулы характеризуются таким же

средством к фибрину и способностью к лизису тромбов. Химерные молекулы получают методом слияния концевой кДНК, кодирующей концевой аминокислотный фрагмент активатора плазминогена тканевого типа, ответственный за специфичность в отношении фибрина, с кДНК, кодирующей концевой карбоксисодержащий фрагмент проурокиназы, ответственный за ферментативные свойства молекулы. По данным авторов этих исследований, данное соединение обладает специфичностью к фибрину, характерной для обеих молекул; лечебная доза этого препарата может быть в 4 раза меньшей, чем доза активатора плазминогена тканевого типа и урокиназы, вводимых отдельно. Снижение дозы – это уменьшение вероятности побочного действия.

Исследования, направленные на создание рекомбинантных препаратов тромболитиков продолжают во многих странах с развитой фармацевтической наукой и промышленностью.

### 6.5. Рекомбинантные белки плазмы крови

В настоящее время уровень производства альбумина, выделенного из плазмы крови человека, составляет около 440 тонн в год.

Во многих странах мира проводятся интенсивные разработки по получению рекомбинантного человеческого альбумина. Причин для этого несколько: дефицит донорского сырья и возможность инфицирования больных при инфузии препарата.

В России разработана программа по созданию *рекомбинантного альбумина человека*. Осуществлено получение новой конструкции, содержащей ген человеческого сывороточного альбумина. Проведена интеграция необходимой генетической информации в геном метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*. Удалось получить новый штамм GS115/Alb2 метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*, содержащего 2 копии ДНК кодирующих человеческий сывороточный альбумин. Штамм отличается высокой продуктивностью и устойчивостью к селективному антибиотику, что позволяет контролировать гомогенность культуры в производственных условиях. Выход составляет 2–3 грамма с 1 литра культуральной жидкости. По

мнению авторов при масштабировании процесса выход может увеличиться до 6–7 грамм с 1 литра. Первое в мире предприятие по производству рекомбинантного человеческого сывороточного альбумина организовано в Японии с производительностью 40 тонн в год.

*Протеин С* синтезируется в гепатоцитах и является К-зависимым белком. Активированный протеин С ингибирует факторы Va и VIIIa путем частичного их протеолиза. Эта реакция происходит на поверхности фосфолипидов тромбоцитов и эндотелия сосудов в присутствии протеина С как кофактор. Активность протеина С инактивирует ингибитор активатора плазминогена, стимулируя тем самым фибринолиз. При дефиците протеина С тромбозы начинают проявляться между 20 и 30 годами жизни. Характерны появления тромбозов глубоких вен и легочной артерии. При уровне протеина С около 50 % от нормы возникает тенденция к развитию тромбозов, тромбофлебита и эмболии.

Препарат рекомбинантного активированного протеина С «Drotrecogin alfa activated» (Zovant) (Eli Lilly & Company, США) обладает антитромботическим, противовоспалительным и профибринолитическими свойствами. Препарат получен на культуре трансформированных клеток яичников китайского хомячка. Для очистки использована аффинная хроматография на Q-сефарозе. Препарат лицензирован в 50 странах мира. Показана эффективность препарата при сепсисе – генерализованном, неадекватном, воспалительном и прокоагулянтном ответе организма на инфекцию. Препарат не оказывает эрадицирующего эффекта в отношении инфекции, обусловившей развитие сепсиса, однако существенным образом снижает интенсивность воспалительных явлений и нарушений свертываемости крови. В клиническом исследовании установлено, что применение «Drotrecogin alfa activated» снижает риск смерти у больных сепсисом на 6 %. В то же время, установлено, что побочными действиями при применении препарата являются кровотечения.

## 6.6. Биотехнология препаратов фагов

Бактериофаги (от бактерии и греч. *Phagos* – пожиратель), фаги – бактериальные вирусы, вызывающие лизис бактерий. Бактериофаги размножаются в клетках, лизируют их и переходят в другие клетки, как правило, молодые, растущие клетки. Впервые перевиваемый лизис бактерий (сибирязвенной палочки) наблюдал в 1898 г. русский микробиолог Н.Ф. Гамалея. В 1915 г. английский ученый Ф. Туорт описал это же явление у гнояного стафилококка, а в 1917 г. французский ученый Ф.Д. Эрелль назвал литический агент, проходящий через бактериальные фильтры.

Частицы многих бактериофагов состоят из головки округлой, гексагональной или палочковидной формы диаметром 45–150 нм и отростка толщиной 10–40 нм и длиной 100–200 нм. Некоторые бактериофаги не имеют отростка; одни из них округлы, другие – нитевидны, размером 8 x 800 нм. Содержимое головки состоит из ДНК. Длина нити ДНК во много раз превышает размер головки и достигает 60–70 мкм. Эта нить плотно скручена в головке. Некоторые фаги содержат РНК-геном. Отросток имеет вид полый трубки, окруженной чехлом, содержащим сократительные белки. У ряда бактериофагов чехол способен сокращаться, обнажая часть стержня. На конце отростка у многих бактериофагов имеется базальная пластинка с несколькими шиповидными или другой формы выступами. От пластинки отходят тонкие длинные нити, которые способствуют прикреплению фага к бактерии. Оболочки головки и отростка состоят из белков. Общее количество белка в частице фага 50–60 %, нуклеиновых кислот – 40–50 %. Каждый бактериофаг обладает специфическими антигенными свойствами, отличными от антигенов бактерии-хозяина и других фагов. Имеются антигены общие для ряда фагов, особенно содержащих РНК.

Бактериофаги прикрепляются своим отростком к бактериальной клетке и, выделяя фермент, растворяют клеточную стенку. Затем содержимое его головки через каналец отростка переходят внутрь клетки, где под влиянием нуклеиновой кислоты фага останавливается синтез бактериальных белков, ДНК и РНК и начинается синтез нуклеиновой кислоты, а затем и белков фага. Часть этих белков ферменты, другая часть образует оболочку зрелой частицы бактериофага. О сложности строения отростка у

Т-четных фагов дает представление простое перечисление структурных элементов, его составляющих: муфта, шейка, воротничок, стержень, базальная пластинка, чехол, длинные и короткие фибриллы, причем каждый из этих элементов в свою очередь состоит из нескольких белков. Наличие особой и сложно устроенной органеллы, предназначенной для адсорбции фага на клетке, продиктовано тем, что бактерии имеют жесткую полисахаридную оболочку, разрешающую введение ДНК лишь по механизму инъекции, в процессе которой оболочка буквально прокалывается отростком фага. Фаговая частица, согласно существующим представлениям, рассматривается как своеобразный микрошприц, осуществляющий инъекцию своей ДНК в заражаемую клетку.

Если клетка бактерии заражена одновременно частицами бактериофагов, различающимися между собой по ряду свойств, то среди потомства, кроме частиц, подобных родителям, будут и такие, у которых эти свойства встречаются в новой комбинации, так как при размножении бактериофагов наблюдается рекомбинация – обмен участками нитей нуклеиновой кислоты. Одни бактериофаги весьма специфичны и способны лизировать клетки только одного какого-либо вида бактерий (монофаги), другие клетки разных видов (полифаги).

Бактериофаги разделяют на вирулентные, вызывающие лизис клетки с образованием новых частиц, и умеренные (симбиотические), которые адсорбируются клетками и проникают в них, но лизиса не вызывают, а остаются в клетке в латентной (скрытой) неинфекционной форме (профаг). Культуры, содержащие латентный фаг, называют лизогенными. Лизогения передается потомству бактерии. По форме фаги делятся на 4 группы: 1 – фаги, имеющие кубическую головку и отросток; 2 – кубические фаги; 3 – нитевидные фаги; 4 – плеоморфные фаги.

Современная классификация бактериофагов включает 13 семейств, подразделенных более чем на 140 видов, которые содержат 5300 видов фагов.

Строение бактериофагов мы рассмотрим на примере фага серии Т-2 *E. Coli* (колифаг), который приведен на рис. 19.

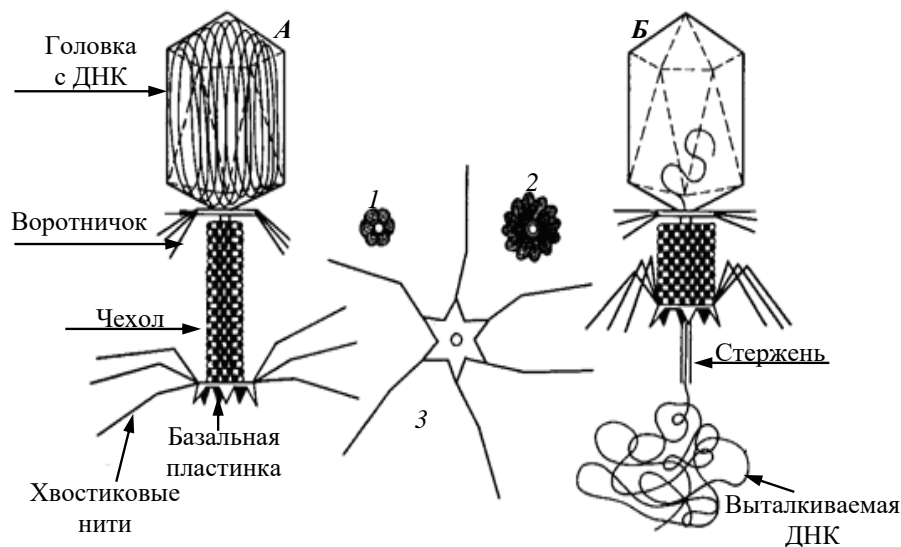


Рисунок 19 – Модель фага серии T-2:

*A* – Фаг с вытянутым чехлом до адсорбции;

*B* – Фаг с сократившимся чехлом после адсорбции и инъекции;

*1* – поперечный разрез вытянутого отростка: видны 6 белковых субъединиц чехла в одной плоскости; *2* – поперечный разрез

сократившегося чехла: видны 12 белковых субъединиц чехла в одной

плоскости; *3* – базальная пластинка готового к адсорбции фага со свободными нитями

Литический цикл фага складывается из нескольких этапов: адсорбция; внутриклеточное развитие фага; латентный период; созревание.

*Адсорбция* – процесс присоединения фаговой частицы к бактериальной клетке, которая происходит благодаря рецепторам, находящимся на клеточной мембране бактерий. Адсорбция является одним из факторов, которые определяют способность бактериофагов вызывать лизис бактериальной клетки. Существенное значение для процесса адсорбции имеет состав окружающей среды.

*Инъекция* – процесс введения ДНК фаговой частицы в бактериальную клетку. Процесс заключается в фиксации базальной пластины на клетке, сокращении хвостового чехла, в результате чего полый стержень входит в клетку, куда попадает нуклеиновая кислота; белковые структуры фага остаются вне клетки.

*Латентный период* – на этом этапе происходит перестройка метаболизма пораженной бактериальной клетки: останавливается синтез бактериальных ДНК, а затем прекращается синтез бактериальных белков и РНК.

*Созревание* – на этом этапе завершается процесс развития бактериофагов. При этом происходит объединение ДНК фагов с белком оболочки и образование инфекционных фаговых частиц. Первоначально образуются капсиды, наполненные белком. После растворения этих внутренних белков готовые головки наполняются ДНК и закрываются. После чего присоединяются компоненты хвоста. Далее клеточная стенка бактерии размягчается под действием лизоцима фага, а образовавшиеся фаги освобождаются для дальнейшего размножения.

Таким образом, каждый бактериофаг проникает в «свою бактерию» и начинают размножаться внутри бактерии. От бактерии остаются одни обломки, а на свет появляется не менее 100–200 новых фагов, готовых к нападению на бактериальные клетки. Цикл – время с момента заражения бактериофагом до выхода потомства – длится всего от 15 до 40 минут в зависимости от вида бактериофага.

*Преимуществами препаратов бактериофагов перед антибиотиками являются:*

- ✓ способность уничтожения бактерий, устойчивых к антибиотикам, т.к. фаги специфично лизируют определенные бактерии;
- ✓ проникновение в ткани организма человека и животных, не нарушая баланса высшего организма;
- ✓ постоянное эволюционирование;
- ✓ отсутствие побочных эффектов, и подавление нормальной микрофлоры, не ослабляют иммунитет;
- ✓ не приводят к устойчивости бактерий.

Бактериофаги строго избирательны по отношению к бактериям – им не стали давать собственные имена, а дают название по бактерии.

#### **Кишечные бактериофаги:**

▪ Бактериофаг брюшнотифозный (*Bacteriophagum salmonellae typhi*) – смесь бактериофагов, активных в отношении возбудителей брюшного тифа различных фаготипов. Применяют для лечения и профилактики брюшного тифа.

▪ Бактериофаг дизентерийный (*Bacteriophagum dysentericum*) – препарат, активный в отношении дизентерийных бактерий Флекснера, зоне и Ньюкасл. Применяют для лечения и профилактики дизентерии.

▪ Бактериофаг сальмонеллезный групп ABCDE (*Bacteriophagum Salmonella ABCDE*) – смесь фаголизатов сальмонелл: *S. paratyphi A* и *B*, *S. Newport*, *S. Dublin*, *S. anatum*, *S. typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. cholerae suis*, *S. oranienburg*, *S. newlands*. Сальмонеллезный бактериофаг применяют для лечения детей и взрослых больных сальмонеллезом, санации носителей сальмонелл, а также с профилактической целью по эпидемическим показаниям.

▪ Бактериофаг коли-протейный (*Bacteriophagum coli-protium*) – смесь бактериофагов, активных в отношении наиболее распространенных серологических групп энтеропатогенных кишечных палочек: O111, O55, O44, O20/145, O26, O124, o125 и протей. Препарат применяют для лечения детей, больных кишечными заболеваниями, обусловленных энтеропатогенными кишечными палочками, и дисбактериозов с преобладанием протей.

#### **Раневые бактериофаги:**

▪ Бактериофаг стафилококковый (*Bacteriophagum staphylococcicum*) – препарат активный в отношении штаммов стафилококка различного происхождения, выделенных с ожоговой и раневой поверхности, из крови, из носоглотки. Применяют для лечения и профилактики инфекций, вызванных стафилококком.

▪ Бактериофаг стрептококковый (*Bacteriophagum streptococcicum*) – препарат активный в отношении штаммов стрептококка различного происхождения. Применяют для лечения и профилактики кожных, хирургических стрептококковых инфекций при ангине, скарлатине.

▪ Бактериофаг коли (*Bacteriophagum coli*) – препарат, активный в отношении наиболее распространенных серологических групп энтеропато-

генных кишечных палочек. Применяют с лечебной и профилактической целью.

▪ Бактериофаг протейный (*Bacteriophagum protei*) – смесь фаголизатов, активных в отношении наиболее распространенных видов протей. Применяют в лечебных и профилактических целях.

▪ Бактериофаг пиоцианеус (*Bacteriophagum pyocyaneum*) – препарат, активный в отношении штаммов синегнойной палочки. Применяют с лечебной и профилактической целью.

#### **6.6.1. Технологические принципы получения бактериофагов**

Бактериофаги встречаются в кишечнике человека и животных, в растениях, почве, водоемах, сточных водах, навозе и т.д. Расы бактериофагов, применяемые в производстве, выделяют из сточных и речных вод. Литическую активность выделенных рас проверяют с набором соответствующих культур методом Аппельмана. Наиболее активные расы используют для приготовления инокулята фагов.

После выделения соответствующего штамма бактериофага проводится изучение основных биологических свойств фага: литическую активность, антигенные свойства, интенсивность адсорбции на бактериальной клетке, латентный период внутриклеточного развития, урожайность, диапазон литической активности, специфичность, морфологию негативных колоний, морфологию фаговых корпускул, тип и размер нуклеиновых кислот. После проведения указанных исследований и подтверждения пригодности бактериофага для создания лекарственного или диагностического препарата, возможно приступить к технологическим разработкам.

Производство бактериофагов проводят в ферментерах – емкостью от 100 до 500 литров. Поскольку основным этапом микробиологического производства бактериофагов является ферментация специфичной для фага бактериальной культуры и выращивание фага, то особое внимание необходимо уделять конструкции ферментеров их автоматизации и обеспечению надежности производственного процесса. Ферментеры должны быть оснащены электронными стойками автоматического управления процессом ферментации в автоматическом режиме и контролировать такие техноло-



гические параметры, как значение рН, уровень растворенного кислорода – рО<sub>2</sub>, температуру, давление, число оборотов мешалки, уровень пены (при её образовании), расход подаваемого на аэрацию воздуха. Также необходимо учитывать возможность последовательной передачи биологического материала из аппаратов меньшего объема в аппараты большего объема. Для обеспечения стерильных условий ферментации и защиты окружающей среды в составе обвязки ферментера должны присутствовать стерилизующие фильтры тонкой очистки (например, фирмы «PALL Millipore»), обеспечивающие подачу в ферментер стерильного воздуха и очистку отработанного воздуха, выбрасываемого в атмосферу.

В состав питательных сред для изготовления препаратов бактериофагов входят белковые основы в виде кислотных или ферментативных гидролизатов казеина и мяса (гидролизат Хоттингера, пептон Мартена, гидролизат Глузмана и др.). В качестве источника ростовых факторов в производственных питательных средах используют мясные экстракты, в основном, с добавлением глюкозы; рН среды в пределах 7,2–7,6 в зависимости от вида бактериофага. Стерилизацию питательных сред проводят при температуре 120–124 °С, время экспозиции после достижения заданной температуры 40–60 минут в зависимости от компонентного состава среды.

В реактор с питательной средой, охлажденной до 37 °С вносят инокулят штамма бактерий соответствующего фагу из расчета 50–150 млн. микробных тел на 1 мл среды (в зависимости от вида изготавливаемого препарата). Инокулят фага добавляют в количестве 0,01–0,1 % объема питательной среды, что определяется свойствами штамма бактерий и бактериофага. Содержимое реактора тщательно перемешивают стерильным воздухом. Воздух, подаваемый в реактор насосом, поступает через стерильный фильтр. Например, для производства препаратов дизентерийного фага *Sonne S* рекомендованы следующие технологические параметры: степень аэрации культуры  $75 \pm 5$  %, содержание глюкозы  $1,0 \pm 0,2$  мг/мл, содержание аминного азота  $60 \pm 7$  мг/% (необходимо наличие в гидролизате аминокислот: триптофана, тирозина, валина).

Концентрация водородных ионов (рН) – важный параметр, влияющий как на рост бактерий, так и на развитие конечного продукта – бакте-

риофагов. По разным причинам рН в ходе ферментации имеют тенденцию к изменению, поэтому необходима схема управления для поддержания рН на оптимальном уровне (6,8–7,4). Регулирование рН осуществляется автоматически добавлением корректирующих компонентов, например, при помощи перистальтического насоса.

Лизис проходит при температуре  $37 \pm 0,5$  °С. Продолжительность лизиса в реакторе 4–10 часов. По истечении указанного времени определяют (визуально) полноту лизиса. Полученную культуральную жидкость, содержащую бактериофаги фильтруют через фильтрующий картон, а затем через фильтры с размером 0,2 мкм. Стерильную культуральную жидкость, содержащую бактериофаги подвергают ультрафильтрации в тангенциальном потоке через мембраны с порогом отсека 200–300 кДа при температуре 6–10 °С. При этом, удаляются балластные компоненты с молекулярными массами менее 200–300 кДа. Так, например, при очистке препарата бактериофага *Serratia* (*S. marcescens*, *S. rubidaea*, *S. odorifera*) степень очистки составила около 94 %. Эффективность очистки была подтверждена в экспериментах по изучению острой и хронической токсичности очищенных и неочищенных фаголизатов. Установлено, что степень адсорбции бактериофагов *Serratia* на бактериальных клетках составляет 75–99 %, длительность латентного периода внутриклеточного размножения 20–30 минут. Урожайность 10–115 фаговых частиц на 1 бактериальную клетку. При ультрафильтрации дизентерийного фага *Sonne S* обнаружено также снижение пирогенных свойств очищенного препарата. Полученный концентрированный очищенный препарат бактериофага подвергают стерилизующей фильтрации через фильтры с размером 0,2 мкм. В случае производства жидких форм бактериофагов стерильный продукт разливают в стерильную первичную упаковку и проводят контроль готового препарата. Контроль готового препарата проводят по следующим показателям: специфическая стерильность, безвредность, литическая активность.

Первые три стадии технологического процесса производства сухих бактериофагов не отличаются от технологии изготовления жидких фагов. Получение серии сухого фага начинается с концентрации жидкого бактериофага путем его высаливания сульфатом аммония, который добавляют в количестве 69 % от объема фага. Высаливание продолжается 6–18 часов

без последующего диализа при температуре 2–4 °С и рН 6,9–7,0. К образовавшейся пастообразной массе добавляют в качестве стабилизатора глюконат кальция (9,0 %). Если защитным покрытием служит пектин, его добавляют одновременно с глюконатом кальция в количестве 3,0 % от массы. Массу наносят на кассеты (слоем толщиной 1 см) и высушивают из замороженного состояния в лифилизаторах, обеспечивающих рабочее давление в сублимационной камере до  $5 \cdot 10^{-2}$  мм рт. ст. и позволяющих достичь величины остаточной влажности продукта 2–4 %. Высушенную массу размельчают с помощью специального гранулятора и контролируют на специфическую стерильность, обсемененность посторонней микрофлорой и литическую активность. С учетом литической активности различных компонентов составляют смесь для таблетирования поливалентного препарата и определяют массу таблетки (в пределах 0,11–0,25 г).

*Контроль литической активности* (специфическая активность) проводят *по методу Анпельмана*. Используют 8–10 пробирок с 4,5 мл питательной среды, например, мясопептонным бульоном (рН 6,8–7,2). В первую пробирку прибавляют 0,5 мл исследуемого препарата бактериофага, перемешивают и переносят 0,5 мл смеси во вторую пробирку. Процесс повторяют со следующими пробирками, получая в каждой пробирке разведение 1:10. В каждую пробирку прибавляют по 0,1 мл культуры соответствующих бактерий, выращенных в течение 18 часов и содержащей  $10^9$  в 1 мл взвеси. Пробирки тщательно перемешивают и помещают на 18–20 часов при температуре  $37 \pm 0,5$  °С. Титр препарата бактериофага определяется по последней пробирке, в которой четко выраженный лизис.

*Для определения специфической активности* бактериофагов также широко используется *метод Грациа*.

Сегодня препараты бактериофагов выпускаются в нескольких лекарственных формах: жидкий препарат для внутреннего применения, таблетки, суппозитории, кремы, гель-спреи и др. В сравнении с жидкой формой бактериофагов мягкая лекарственная форма имеет ряд преимуществ: значительно больший и более длительный контакт с местом поражения; бактериофаги начинают действовать сразу при нанесении и действуют в течение длительного времени благодаря постепенному высвобождению; бактериофаги удобно использовать благодаря простоте нанесения на рану самим

пациентом; улучшение диффузии бактериофагов в кожу вследствие использования вспомогательных веществ.

Сегодня использование препаратов на основе бактериофагов переживает второе рождение, и они активно используются для профилактики и лечения бактериальных заболеваний, лечении гнойно-воспалительных заболеваний слизистой глаз и полости рта, профилактика гнойно-воспалительных осложнений при ожогах, ранениях, операционных вмешательствах. Особо необходимо отметить, что беременные женщины, которых лечат бактериофагами, выздоравливают быстрее, новорожденные не страдают от инфекционных заболеваний и быстрее прибавляют в весе.

Бактериофаги нашли широкое применение для диагностики бактериальных заболеваний. Так, например, использование фаголизиса сибирскоязвенных бацилл специфическим сибирскоязвенным бактериофагом Гамма А-26 позволяет поставить предварительный диагноз в достаточно короткие сроки. Основное преимущество метода: простота, высокая специфичность, возможность проведения исследования в полевых условиях.

По мнению специалистов, фаготерапия в скором времени станет прорывом в борьбе с инфекциями и займет ту нишу, где не состоятельна современная иммунотерапия. В течение 5 лет производство бактериофагов станет одной из перспективных отраслей фармацевтической промышленности.

Всесторонние исследования, направленные на изучение бактериофагов, выполненные за последние 40–45 лет позволили широко использовать их для решения задач микробиологии, вирусологии, генетики, биохимии и биотехнологии.



### Контрольные вопросы

1. Приведите систему классификации иммунобиологических препаратов.
2. Какие основные требования предъявляют к живым бактериальным и вирусным вакцинам?
3. Какую ценность представляют рекомбинантные бактерии для биотехнологического получения вакцин?
4. Дать характеристику вакцинам на основе пептидов и ДНК.
5. Какова роль адъювантов в вакцинах? Привести примеры использования адъювантов.
6. Каковы принципы конструирования полисахаридных вакцин?
7. Роль вакцинации в профилактике инфекционных заболеваний. Какие инфекции устранены благодаря вакцинации?
8. Описать классификацию цитокинов и определить их роль в организме человека.
9. Опишите технологическую схему получения лейкоцитарного интерферона.
10. Опишите технологическую схему получения рекомбинантного интерферона.
11. Укажите основные методы идентификации и контроля препаратов, содержащих интерфероны. Каким образом определяют антивирусную активность интерферона?
12. Опишите технологическую схему получения интерлейкина-2. Какие методы используются для очистки? Указать лекарственные формы препаратов.
13. Опишите технологическую схему получения интерлейкина-1 $\beta$ . Какие методы используются для очистки? Указать лекарственные формы препаратов.
14. Проведите анализ технологии получения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и укажите методы межоперационного контроля. Роль данного фактора.
15. Какова роль факторов свертывания крови? Описать методы получения факторов свертываемости крови: VII, VIII и IX.
16. Какова роль фактора некроза опухоли? Описать методы получения фактора некроза опухоли.
17. Описать структуру фагов и преимущества их использования по сравнению с антибактериальными препаратами.
18. Какие технологии применяют для получения препаратов фага? Описать методы контроля активности препаратов, содержащих фаги.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За XX столетие средняя продолжительность жизни людей увеличилась примерно на 30 лет с одновременным достижением активного долголетия, что в немалой степени обусловлено лекарственными препаратами, полученными методами биотехнологии: вакцинами, интерферонами, моноклональными антителами, биологическими факторами и другими. Так, например, в настоящее время только вакцины предотвращают ежегодно до 3 млн. смертей. В настоящее время большинство государств рассматривают проведение вакцино-профилактики как наиболее эффективный, экономически оправданный и доступный способ снижения смертности взрослых и детей при борьбе с инфекционными заболеваниями.

Разработка лекарственных препаратов осуществляется мировыми лидерами биотехнологического производства на базе передовой техники и технологии в объединении с опытом и квалификацией ученых и специалистов. Сегодня препараты таких фирм как «GlaxoSmithKline Biologicals» (Бельгия), «Aventis Pasteur» (Франция), «Heber Biotec» (Куба), «LG Chemical Ltd» (Корея), «Solvay Pharmaceuticals» (Нидерланды), «Chiron Behring GmbH & Co» (Германия) и многих других хорошо зарекомендовали себя на мировом рынке биотехнологических продуктов.

Что препятствует развитию фармацевтической биотехнологии в Украине сегодня? Скорее всего, главным препятствием является недопонимание и недооценка данного направления для нашей страны. Обращает на себя внимание тот факт, что в Украине ведущие фармацевтические предприятия производят биотехнологические препараты из экспортируемых активных фармацевтических ингредиентов (инсулины, витамины, вакцины *in bulk*, интерфероны и др.). В Украине на сегодняшний день практически отсутствует производство биотехнологической продукции по полному циклу. Исключением являются «ФармБиотек», «Биофарма», «Диапрофмед». Вакцины для применения в медицине производит только ЗАО «Биолек» (вакцины для профилактики дифтерии и столбняка). В то же время, в

Европейских странах биотехнология играет значительную роль (до 30 %) в диагностике, производстве вакцин и лекарственных препаратов. Необходимо отметить, что Украина сегодня не имеет ни современной производственной базы для выпуска продукции фармацевтической биотехнологии, ни научной школы по разработке оригинальных биотехнологических препаратов.

Для примера можно привести данные о том, что с компанией «GlaxoSmithKline Biologicals» (Бельгия) работают 35 академических институтов и ученые из разных стран. Бесспорно, разработка и производство вакцин дело дорогостоящее и создание препаратов против всех инфекций не только невозможно, но и не целесообразно. Однако создание и совершенствование вакцин против основных инфекций, входящих в Календарь прививок – дело необходимое. Это позволит украинскому государству своевременно проводить вакцинацию населения качественными и эффективными вакцинными препаратами и уменьшить зависимость Украины от иностранных производителей. Доказательством этому служит ситуация, которая сложилась в 2011 году, когда своевременное проведение вакцинации, в соответствии с Календарем прививок, было сорвано. Аналогичная ситуация сложилась и с факторами свертываемости крови, в том числе и для больных гемофилией.

Развитие фармацевтической биотехнологии основано на современных достижениях генной инженерии, микробиологии, иммунологии, развитии производства биофармацевтического оборудования. Исход конкуренции в значительной степени будет зависеть от того, каким образом будут использоваться новые знания в этой области. Причиной роста биотехнологической промышленности в ряде стран, выпускающей фармацевтическую продукцию, является увеличение объема финансирования из государственных и частных источников. В качестве примера, можно привести данные о том, что по итогам II квартала 2011 года объем венчурного инвестирования в сфере биотехнологии увеличился на 46 % по сравнению с предыдущим годом. Причем, венчурные компании привлекли к данным

разработкам около 1,24 млрд. дол. и заняли второе место по объему привлечения средств после разработок по программному обеспечению.

В Украине 22 июня 2011 года была принята Правительственная программа «О разработке новейших технологий и создании отечественных лекарственных средств», рассчитанная на 2011–2015 г.г. Общая сумма, предполагаемая на эту программу 2,7 млрд. гривен, из них 1,2 млрд. гривен из государственного бюджета и только 300 млн. гривен выделяется на фундаментальные исследования. Программой предусмотрено создание лекарственных и диагностических препаратов на основе биотехнологических процессов, а именно: новые диагностические препараты на основе ДНК- и РНК-технологий; диагностические препараты на основе рекомбинантных белков и иммунных подходов; терапевтические препараты на основе рекомбинантных белков, антител, ДНК- и РНК-технологий; лекарственные препараты на основе клеточных технологий. Непонятно, каким образом, предполагается за такой короткий срок и за указанные выделенные средства создать вышеперечисленные группы препаратов. Для сравнения, приводим данные зарубежных специалистов: для создания одного оригинального биотехнологического терапевтического препарата необходимо 10–15 лет и не менее 1 млрд. долларов. Нельзя не отметить, что *по ряду разработок Украина занимает ведущие позиции в исследованиях по созданию иммунобиологических препаратов на основе клеточных технологий.* Так, например, в институте криобиологии и криомедицины АН и АМН Украины (г. Харьков) под руководством академика В.И. Грищенко были проведены многолетние исследования, приведшие к разработке и промышленной реализации двух оригинальных препаратов: «Платекс» (2 формы) и «Криоцелл» (6 форм). Препараты получены из тканей, плаценты и кордовой крови человека в результате многостадийной технологии, и содержат биологически активные соединения белковой и пептидной природы тканей человека, замороженные при температуре до минус 196 °С. Препараты используются в комплексе поддерживающей терапии в качестве лечебно-профилактического иммуностимулирующего препарата

при аллергических состояниях, при нарушении кровообразования, анемии, иммунопатологии, сосудистых и эндокринных патологиях, хронических воспалительных заболеваниях, патологии печени, ишемической болезни сердца, патологии беременности, сахарном диабете и его осложнениях, при хронических и подострых заболеваниях ЦНС. Сегодня в Украине это единственный пример регистрации препарата, полученного из тканей человека и прошедшего весь комплекс доклинических и клинических исследований. *Вторым успешным направлением, получившим развитие в Украине, является нанобиотехнология*, в частности, препараты, полученные на основе искусственных мембран – липосом. Сегодня, в Украине – единственной стране в СНГ, выпускаются липосомальные препараты различной направленности: «Липин», «Липодокс», «Лиолив», «Липофлавон». Данное направление признано приоритетным во многих странах мира с развитой фармацевтической наукой и промышленностью, являясь, по нашему мнению, единственным реальным примером применения нанотехнологий в фармации и медицине в Украине.

В настоящее время созданы вакцины против патогенов, вызывающих остroteкущие инфекции. Для латентных и хронических заболеваний, вызываемых такими возбудителями как ВИЧ, герпес человека, вирус гепатита С, микобактерии туберкулеза и др. высокоэффективных вакцин еще не создано. Однако специалисты многих стран активно разрабатывают новые вакцины: пептидные, рекомбинантные, ДНК-вакцины и ряд других. Не останавливаются работы по совершенствованию традиционных вакцин.

Подтверждением этому может служить информация кубинских ученых, которые в 2008 году объявили о создании эффективной вакцины против гепатита С (в мире страдает от этой инфекции 200 млн. человек). Три генно-инженерных вакцины нашли широкое применение для массовых вакцинаций (гепатит В, боррелиоз, вирус бешенства). Только в США ежегодно производство вакцин увеличивается на 18 % (при общем росте фармацевтической промышленности около 4 %) и к 2011 году достигло

30 млрд. долларов. Сегодня на разных стадиях исследований находятся 20 вакцин только против ВИЧ-инфекции.

Важной группой биотехнологических препаратов являются моноклональные антитела, номенклатура которых увеличивается ежегодно. Моноклональные антитела открывают новый этап в химиотерапии различных заболеваний, так как позволяют осуществлять направленную биотерапию. Основные сферы применения: онкология, артриты, иммунные (включая иммуносупрессоры при трансплантации органов) и воспалительные процессы.

В среднем, после разработки идеи биотехнологического препарата на предклинические и клинические испытания уходит около 10 лет.

Учитывая направленность данной публикации, мы не могли остановиться на ряде препаратов, созданных и разрабатываемых в настоящее время: препаратах на основе растений; терапевтических вакцинах, направленных на лечение инсулинозависимого диабета, атеросклероза, инфаркта и др.; лекарственных средств на основе компонентов дрожжевых клеток; биотехнологии аминокислот и др. Этим вопросам будет посвящена вторая часть публикации.

Сегодня на фармацевтическом рынке присутствуют сотни наименований биофармацевтических препаратов, в том числе и полученных при помощи генной инженерии: интерфероны и интерлейкины, вакцины и моноклональные антитела, витамины и гормоны, факторы некроза опухолей и свертываемости крови, антибиотики, фаги и ряд других препаратов. Только простое перечисление биотехнологических фармацевтических продуктов, полученных с использованием различных методов, в том числе и генно-инженерных, может служить свидетельством успешности современной биотехнологии. Однако с другой стороны, несколько десятилетий работы в этом направлении, использовании десятков миллиардов долларов, участие известных ученых и институтов привели к появлению относительно «небольшого» количества препаратов. Как известно, из тех молекул, которые проходят скрининговые исследования, до доклинических исследо-

ваний доходит 0,1 % молекул, из которых только единицы выходят на клиническое изучение. Возникает закономерный вопрос. Почему? Постараемся ответить на этот вопрос.

Одной из причин, является тот факт, что эффекты препаратов, проявляющиеся *in vitro* и *in vivo*, могут не совпадать. В ряде случаев это обусловлено тем, что в целостном организме действует как изучаемое вещество, так и его метаболиты. В других случаях расхождение действия *in vitro* и *in vivo* обусловлены различиями в клеточных и молекулярных механизмах, приводящих к проявлению эффекта в целом организме и культуре клеток. В организме в ответ на действие препарата могут включаться дополнительные взаимосвязи и регуляторные механизмы, которые могут изменить эффект, вплоть до его реверсии.

Биотехнологическая революция является серьезным вызовом традиционным способам разработки лекарственных препаратов, требующим проведения адекватных и своевременных оценок, чтобы от указанных достижений можно было получить максимальную отдачу. В самом деле, успешная разработка биотехнологических лекарственных препаратов – это длительный процесс, которому многочисленные группы ученых и большое количество регуляторных организаций и производителей вынуждены посвящать годы.

Достижения XXI века в области создания лекарственных и диагностических препаратов на основе биотехнологии, основанные на научных достижениях, могут оказаться не менее впечатляющими, чем достижения XX века. У авторов данного учебного пособия существует надежда, что ВУ – студенты и аспиранты НТУ «ХПИ», заинтересуются представленными материалами и внесете свой достойный вклад в развитие фармацевтической биотехнологии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агеев Е.П. Мембранные процессы разделения. Критическая технология. Мембраны / Е.П. Агеев. – М., 2001. – С. 42–56.
2. Адамс М. Бактериофаги / М. Адамс. – М.: Иностранная литература, 1961. – 397 с.
3. Аладышева Ж.И. Основные принципы проведения валидации на фармацевтическом производстве / Ж.И. Аладышева, В.В. Береговых, А.П. Мешковский. – М., 2005. – 185 с.
4. Алексеев В.И. Прикладная молекулярная биология / В.И. Алексеев, В.А. Каминский. – М.: Комкнига, 2005. – 200 с.
5. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биотехнологической инженерии. В 2-х частях / Дж. Бейли, Д. Оллис. – М.: Мир, 1989. – 562 с.
6. Белозерский В.И. Экспериментальные подходы к созданию энтеральных форм противодифтерийных препаратов / В.И. Белозерский, Е.М. Бабич, Ю.М. Краснопольский. – Анналы Мечниковского Института, 2006, № 4. – С. 9–13.
7. Береговых В.В. Нормирование фармацевтического производства / В.В. Береговых, А.П. Мешковский. – М., 2001. – 527 с.
8. Брок Т. Мембранная фильтрация / Т. Брок. – М.: Мир, 1987. – 464 с.
9. Виестур У.З. Биотехнология, биотехнологические агенты, технология, аппаратура / У.З. Виестур, И.А. Шмите, А.В. Жилевич. – Рига, Знание, 1987. – 253 с.
10. Волкова Н.А. Изучение факторов, влияющих на эффективность создания соматических трансгенных сельскохозяйственных животных – продуцентов рекомбинантных белков человека с молоком / Н.А. Волкова, Н.А. Зиновьева, Л.К. Эрнст. – Биотехнология, 2006, № 4. – С. 36–44.
11. Воронин Е.С. Биотехнология / Е.С. Воронин. – С-Петербург, Гипорд, 2008. – 703 с.
12. Гавриков А.В. Зависимость процедуры выделения и очистки рекомбинантного интерферона- $\alpha$ -2b человека от условий его накопления в клетках штамма-продуцента в ходе регулируемого культивирования / А.В. Гавриков, И.А. Рязанов, В.Е. Калужский. – Биотехнология, 2006, № 5. – С. 23–31.

13. Галынкин В.А. Фармацевтическая микробиология / В.А. Галынкин, В.А. Заикина, В.И. Кочеровец. – М.: Арнебия, 2003.– 252 с.
14. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002.– 600 с.
15. Гусаров Д.А. Использование ОФ ВЭЖХ для очистки генно-инженерного инсулина человека / Д.А. Гусаров, В.В. Востриков, Е.А. Ручко. – Биотехнология, 2006, № 2.– С. 44–49.
16. Державна фармакопея України. Первое издание. – Харьков, 2001.– 530 с.
17. Державна фармакопея України. Первое издание. Дополнение 2. – Харьков, 2008.– 617 с.
18. Дзегиленко Н.Б. Тромболитики и антикоагулянты, получаемые методом биотехнологии за рубежом. Обзорная информация / Н.Б. Дзегиленко, Е.М. Властихина. – М.: Хим. фарм. пром., 1989, Вып.2.– 43 с.
19. Дудниченко А.С. Липосомальные лекарственные препараты в эксперименте и клинике / А.С. Дудниченко, Ю.М. Краснополяский, В.И. Швец. – Харьков, РА-Каравелла, 2001.– 143 с.
20. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учебное пособие / Н.С. Егоров. – М.: Изд-во МГУ, 1994.– 512 с.
21. Егорова Т.А. Основы биотехнологии / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2003.– 208 с.
22. Ефимов Б.А. Плазмиды бифидобактерий и их использование в генетической инженерии / Б.А. Ефимов, А.Н. Шкопоров, Е.В. Хохлова. – Вестник Российской АМН, 2008, № 3.– С. 16–21.
23. Жибурт Е.Б. Трансфузиология / Е.Б. Жибурт. – С-Петербург, Питер, 2002.– 732 с.
24. Зуев Б.Г. Фильтры для жидкостей микробиологической промышленности / Б.Г. Зуев, Ю.М. Филатов. – М.: Высшая школа, 1985.– 430 с.
25. Кононова Н.В. Опыт-промышленная технология получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантного гормона роста человека / Н.В. Кононова, А.И. Бобрускин, И.А. Пучков. – Биотехнология, 2008, № 5.– С. 33–42.

26. Кононова Н.В. Разработка и оптимизация ряда стадий технологического процесса получения субстанции филграстима / Н.В. Кононова, А.И. Бобрускин, Т.И. Костромина. – Биотехнология, 2009, № 5.– С. 24–32.
27. Краснополяский Ю.М. Пробиотики в составе биологических диетических добавок / Ю.М. Краснополяский. – БАД-эксперт, 2009, № 1.– С. 18–22.
28. Краснополяский Ю.М. Биотехнология иммунобиологических препаратов / Ю.М. Краснополяский, М.И. Борщевская. – Харьков, Издательство «Фармитэк», 2008. – 312 с.
29. Краснополяский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов: Учебное пособие / Ю.М. Краснополяский, М.И. Борщевская. – Харьков, НТУ «ХПИ», 2009. – 351 с.
30. Краснополяский Ю.М. К вопросу стандартизации и контроля иммуноглобулинов для внутривенного введения, полученных из плазмы крови человека / Ю.М. Краснополяский, В.В. Прохоров, И.В. Волчик. – Провизор, 2008, № 10.– С. 24–28.
31. Краснополяский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Бионанотехнология в фармации и медицине: Учебное пособие / Ю.М. Краснополяский, А.С. Дудниченко, В.И. Швец. – Харьков, НТУ «ХПИ», 2011.– 228 с.
32. Купцов В.Н., Байдусь В.Н., Шматченко Н.А. Оптимизация условий ферментативного гидролиза при производстве генно-инженерного инсулина человека / В.Н. Купцов, В.Н. Байдусь, Н.А. Шматченко. – Биотехнология, 2006, № 4.– С. 56–63.
33. Купцов В.Н. Оптимизация процесса производства отечественного генно-инженерного инсулина человека / В.Н. Купцов. – М.: Авт. дис. на соиск. уч. степ. к.биол.н., 2007.– 28 с.
34. Малыгина В.С. Изучение свойств культуры клеток CHO $\alpha$  – продуцента эритропоэтина человека / В.С. Малыгина, И.Ф. Радаева, Е.А. Нечаева. – Биотехнология, 2010, № 2.– С. 31–35.

35. Мацкевич В.А. Поиск низкомолекулярного лиганда для аффинной хроматографической очистки фактора сыворотки крови VIII человека молекулярным допингом *in silico* / В.А. Мацкевич, Н.А. Орлова, И.И. Воробьев. – Математическая биология и биоинформатика, 2011, Т. 6, № 1.– С. 14– 22.

36. Медуницы Н.В. Вакцинология / Н.В. Медуницы. – М.: Триада-Х, 1999.– 272 с.

37. Мертвецов Н.П. Газовихревые биореакторы «Биок». Использование в современной биотехнологии / Н.П. Мертвецов. – Новосибирск, Наука, 2002.– 118 с.

38. Мирошников П.Н. Получение интерферона-гамма и его аналога дельтаферона / П.Н. Мирошников, Л.Р. Лебедев, Т.А. Терещенко. – Биотехнология, 2005, № 1.– С. 11–18.

39. Мулдекр М. Введение в мембранную технологию / М. Мулдекр. – М.: Мир, 1999.– 513 с.

40. Некипелова В.О. Образование фибрилл генно-инженерного инсулина человека в условиях хроматографической очистки / В.О. Некипелова, Д.А. Гусаров, В.А. Ласман. – Биотехнология, 2009, № 3.– С. 49–53.

41. Нолтинг Б. Новейшие методы исследования биомембран / Б. Нолтинг. – М.: Техносфера, 2005.– 256 с.

42. Опарин Ю.Г. Подходы к определению оптимального режима лиофилизации биопрепаратов / Ю.Г. Опарин. – Биотехнология, 1997.– С. 69–75.

43. Папаян Л.П. Современная модель гемостаза и механизм действия препарата «НовоСэвен» / Л.П. Папаян. – Проблемы гематологии, 2004, №1.– С. 11–17.

44. Плейфэр Дж. Наглядная иммунология / Дж. Плейфэр. – М.: Медицина, 1999.– 95 с.

45. Полянская Т.Ю. Применение рекомбинантного активированного фактора VII при хирургических вмешательствах у больных с ингибиторной формой гемофилии / Т.Ю. Полянская, В.Ю. Зоренко, Е.Е. Карпов. – Гематология и трансфузиология, 2008, Т. 53, № 3.– С. 3–6.

46. Прищеп Т.П. Основы фармацевтической биотехнологии / Т.П. Прищеп, В.С. Чучалин, К.Л. Зайков. – Ростов-на-Дону, Феникс, 2006.– 252 с.

47. Русанов В.М. Лечебные препараты крови / В.М. Русанов, И. Левин. – М.: ИД-медпрактика, 2004.– 283 с.

48. Сverdлов Е.Д. Очерки современной молекулярной генетики / Е.Д. Сverdлов. – Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 1997, Т. 2.– С. 3–28.

49. Сорокулова И.Б. Рекомбинантные пробиотики: проблемы и перспективы использования в медицине и ветеринарии / И.Б. Сорокулова, В.А. Белявская. – Вест. Рос. АМН, 1997, №3.– С. 17–19.

50. Степанов А.Е. Физиологически активные липиды / А.Е. Степанов, Ю.М. Краснопольский, В.И. Швец. – М.: Наука, 1991.– 136 с.

51. Уайт В. Технология чистых помещений. Основы проектирования, испытаний и эксплуатации / В. Уайт. – М.: 2002.– 296 с.

52. Федотов А.Е. Чистые помещения / А.Е. Федотов. – М.: «Асинком», 2003.– 575 с.

53. Шапхаев Э.Г. Дезинтеграция клеток в биотехнологии / Э.Г. Шапхаев, В.Ш. Цыренов, Е.И. Чебукина. – Улан-Уде, Изд. ВСГТУ, 2005.– 94 с.

54. Шматченко В.В. Рекомбинантная плазмидная ДНК рHINS11, кодирующая гибридный белок-предшественник инсулина человека / В.В. Шматченко, Н.А. Шматченко, А.Н. Байдусь. – Патент РФ № 2354702, 2009.– 12 с.

55. Шмелев В.А. Способ получения гибридного белка  $\alpha_1$ -тимозин-фактор некроза опухолей- $\alpha$  / В.А. Шмелев, Л.Ю. Носова, З.Ф. Бунина. – Патент РФ № 2055897, 1996.– 8 с.

56. Grandi G. Genomics, proteomics and vaccines / G. Grandi, J. Willey. – England, 2004.– 313 p.

57. Granovsri N. Recombinant hepatitis B vaccine: the usage of yeast *Saccharomyces cerevisiae* expression system / N. Granovsri. – Rev. Farm. Bioq. Univ. S. Paulo, 1997.– P. 61–70.

58. Hanlon G.W. / G.W. Hanlon. – Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infection. Antimicrobial agents and chemotherapy – 2007, V. 30, N 2.– P. 118–128.

59. Jennings H.J. Capsular polysaccharides as human vaccines / H.J. Jennings. – Adv. Carbohydr. Chem. Biochem, 1983.– P. 155–208.

60. Just M. Reactogenicity and immunogenicity of a recombinant hepatitis B vaccine compared with plasma-derived vaccine in young adults / M. Just, R. Berger, V. Just. – Postgrad, Med., J. 1987.– P 121–123.

61. Krasnopolsky Yu.M. Analysis of Risk Factors Under Production of Preparation Based on Biotechnology / Yu.M. Krasnopolsky, A.E. Stepanov, V.I. Shvets. – Third Russian Symposium with International Participation BIOPHARMA-2011: from science to industry, May 16–20, Tel Aviv, Israel, 2011.– P. 12–13.

62. Lepow M.L. Safety and immunogenicity of Haemophilus influenzae type b polysaccharide – diphtheria toxoid conjugate vaccine in adults / M.L. Lepow, J.S. Samuelson, L.K. Gordon. – J. Infect., Dis., 1984.– P 402–406.

63. Ludewig B. In vivo antigen loading and activation of dendritic cell via a liposomal peptide vaccine mediates protective antiviral and anti-tumour immunity / B. Ludewig, F. Barchiesi, M. Pericin. – Vaccine, 2000.– P. 23–32.

64. McDonnell W.M. Molecular Medicine. DNA Vaccines / W.M. McDonnell, F.K. Askari. – The New England, J. of Medicine, 1996.– P. 42–45.

65. Metz B. Physicochemical and immunochemical techniques predict the quality of diphtheria toxoid vaccines / B. Metz, W. Jiskoot, W.E. Hennink. – Vaccine, 2003.– P. 156–167.

66. Kaufmann S.H. Novel vaccination strategies / S.H. Kaufmann. – Weinheim, 2004.– 626 p.

67. Recommendations for the production and control of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines. In: WHO Expert Committee on biological standardization. Forty-ninth Report – Geneva, World Health Organization, Annex 1 (WHO Technical Report Series, No. 897), 2000.– P. 27–60.

68. Recommendations for the production and control of poliomyelitis vaccine (inactivated). In: WHO Expert Committee on biological standardization. Fifty-first Report – Geneva, World Health Organization, Annex 2 (WHO Technical Report Series, No. 910), 2002.– P. 32–66.

69. Recommendations for the production and control of poliomyelitis vaccine (oral). In: WHO Expert Committee on biological standardization. Fiftieth Report – Geneva, World Health Organization, Annex 1 (WHO Technical Report Series, No. 904), 2002.– P. 31–93.

70. Requirements for dried BCG vaccine. WHO Expert Committee on Biological Standardization. 43 Report. Technical report Series 745 – Geneva, 1987 and 771 Geneva, 1988.

71. Requirements for measles, mumps and rubella vaccines and combined vaccine (live). WHO Expert Committee on Biological Standardization. 43 Report. Technical report Series 840 – Geneva, 1994.– P. 100–202.

72. Recommendations for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccine. In WHO Expert Committee on Biological Standardization. 54 Report. Technical report Series 927 – Geneva, 2005.– P. 138–148.

73. Robinson A. Methods in Molecular Medicine / A. Robinson, G. Farrar, C. Wiblin. – Humana Press Inc, Totowa Inc. NJ, 2000.– P. 311.

74. Stein K.E. Glycoconjugate vaccines. What next? / K.E. Stein. – Int. J. Technol, Assess, Health Care, 1994.– P. 167–176.

75. Swart R.L. Measles vaccination of macaques by dry powder inhalation / R.L. Swart, A.V. Quirk, V. Nadelman. – Vaccine, 2007.– P. 1183–1190.

76. Vanstraelen G. Pegfilgrastim compared with Filgrastim after autologous hematopoietic peripheral blood stem cell transplantation / G. Vanstraelen, P. Frere, M.C. Ngirabacu. – Experimental hematology, 2006, V. 34. N. 3.– P. 382–388.

77. Wilchek M. Affinity chromatography / M. Wilchek, T. Miron, J. Kohn. – Meth. Enzymol, 1984.– P. 3–55.

Навчальне видання

КРАСНОПОЛЬСЬКИЙ Юрій Михайлович  
КЛЕЩЕВ Микола Федосович

**ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ:  
ВИРОБНИЦТВО БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН**

Навчальний посібник  
для студентів (у т. ч. іноземних)  
біотехнологічного напрямку

Російською мовою

У двох частинах

**ЧАСТИНА I**

Роботу до видання рекомендувала *М. Г. Зінченко*  
В авторській редакції  
Комп'ютерне верстання *Л. В. Северіна*

План 2011 р., поз. 43/4-12

Підп. до друку 25.01.2012. Формат 60 × 84 1/16. Папір офісний.  
Riso-друк. Гарнітура Таймс. Ум. друк. арк. 17,7. Наклад 100 прим.  
Зам. № 52. Ціна договірна.

---

Видавничий центр НТУ „ХПР”.  
Свідоцтво про державну реєстрацію ДК № 3657 від 24.12.2009 р.  
61002, Харків, вул. Фрунзе, 21

---

Друкарня НТУ “ХПР”, 61002, Харків, вул. Фрунзе, 21