**СЛАГАЕМЫЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

Иерархическая структура биотехнологического производства. Первая ступень построения. Подсистемы типа: биообъект - биореакторы, биомасса - сепараторы, экстракторы и т.п.

Вторая ступень построения. Объединение подсистем в функционально единую цепь (участок, цех). Технологические основы создания блочно-модульных типовых решений. Третья ступень построения: последовательность блоков и модулей функциональных участков. Опытно-промышленная установка, предприятие законченного цикла. Основные и вспомогательные (общеинженерные) подсистемы.[3]

Схема последовательно реализуемых стадий превращения исходного сырья в лекарственное средство. Оптимизация биообъекта, процессов и аппаратов как единое целое в биотехнологическом производстве.

Подготовительные операции при использовании в производстве биообъектов микроуровня. Многоэтапность подготовки посевного материала. Инокуляторы. Кинетические кривые роста микроорганизмов в закрытых системах. Связь скорости изменения количества микроорганизмов в экспоненциальной фазе роста с концентрацией клеток в системе.[4]

Комплексные и синтетические питательные среды. Их компоненты. Концентрация отдельного расходуемого компонента питательной среды и скорость размножения биообъекта в техногенной нише. Уравнение Моно.

Методы стерилизации питательных сред. Критерий Дейндорфера- , Хэмфри. Сохранение биологической полноценности сред при их стерилизации.Стерилизация ферментационного оборудования. "Слабые точки" внутри стерилизуемых емкостей. Проблемы герметизации оборудования и коммуникаций.[4]

Очистка и стерилизация технологического воздуха. Схема подготовки потока воздуха, подаваемого в ферментатор. Предварительная очистка. Стерилизующая фильтрация. Предел размера пропускаемых частиц. Эффективность работы фильтров. Коэффициент проскока.

**Критерии подбора ферментаторов** при реализации конкретных целей. Классификация биосинтеза по технологическим параметрам. Принципы организации материальных потоков: периодический, полупериодический, отьемно-доливной, непрерывный. Глубинная ферментация. Массообмен. Поверхностная ферментация.

Требования к ферментационному процессу в зависимости от физиологического значения целевых продуктов для продуцента - первичные метаболиты, вторичные метаболиты, высокомолекулярные вещества. Биомасса как целевой продукт. Требования к ферментационному процессу при использовании рекомбинантных штаммов, образующих чужеродные для биообъекта целевые продукты.[6]

**Выделение, концентрирование и очистка** биотехнологических продуктов. Специфические особенности первых стадий. Седиментация биомассы. Уравнение скорости осаждения. Коагулянты. Флокулянты. Центрифугирование. Выделение из культуральной жидкости клеток высших растений, микроорганизмов. Отделение целевых продуктов, превращенных в твердую фазу. Сепарирование эмульсий. Фильтрование. Предварительная обработка культуральной жидкости для более полного разделения фаз. Кислотная коагуляция. Тепловая коагуляция. Внесение электролитов.

Методы извлечения внутриклеточных продуктов. Разрушение клеточной стенки биообъектов и экстрагирование целевых продуктов.

Сорбционная и ионообменная хроматография. Аффинная хроматография применительно к выделению ферментов. Мембранная технология. Классификация методов мембранного разделения. Общность методов очистки продуктов биосинтеза и оргсинтеза на конечных стадиях их получения (из концентратов). Сушка.[6]

Стандартизация лекарственных средств, получаемых методами биотехнологии. Фасовка.

**2. Получение антибиотиков**

Антибиотики — это специфические продукты жизнедеятельности, обладающие высокой физиологической актив­ностью по отношению к определенным группам микроорганизмов и к злокачественным опухолям, избирательно задерживающих их рост или полностью подавляющих развитие (Н. С. Егоров, 1979). Далеко не все из этих соединений, число которых прибли­жается к 5000, допущены для применения в медицине. К важней­шим антибиотикам терапевтического назначения принадлежат следующие их классы (табл. 1).[5]

Приведенные классы антибиотиков не исчерпывают их много­образия, список их пополняется с каждым годом. Причины неос­лабевающего внимания к поиску новых антибиотиков, как видно из табл. 10, связаны с токсичностью существующих антибиоти­ков, аллергическими реакциями, вызываемыми ими, нарастанием устойчивости патогенных микроорганизмов к применяемым пре­паратам и, помимо этого, с необходимостью изыскания средств борьбы с возбудителями, против которых недостаточно эффектив­ны известные ныне антибиотики. Основные пути поиска вклю­чают:

1.Испытание новых продуцентов. Так, с начала 80-х годов исследуют миксобактерии, продуцирующие большое количество антимикробных агентов.

2.   Химическая модификация антибиотиков. Противомикроб-ные макролиды токсичны для человека. Например, гептаен амфо-терицин В, используемый по жизненным показаниям при тяже­лых микозах, вызывает необратимые поражения почек. Получены метиловые эфиры амфотерицина, менее токсичные и сохра­няющие противогрибковую активность. При модификации пенициллинов и цефалоспоринов ис­пользуют иммобилизованные ферменты.

3.  Мутасинтез. Применяют мутантные штаммы, у которых блокирован синтез отдельных фрагментов молекулы антибиотика. В среду культивирования вносят аналоги этих фрагментов. Мик­роорганизм использует эти аналоги для биосинтеза, в результате чего получают модифицированный антибиотик.

4.  Клеточная инженерия. Получают гибридные антибиотики, например, с новыми комбинациями агликона и Сахаров.

5.  Генетическая инженерия — введение в геном микроорганиз­ма информации о ферменте, необходимом для модификации про­дуцируемого антибиотика, например его метилирования при по­мощи метилаз.[6]

Таблица 1- **Важнейшие классы антибиотиков терапевтического назначения** (по И  Г..  Егорову,  1979; Д.Ланчини, Ф   Паренти,  1985)

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Класс | Типичные антибиотики | Продуценты | На  кого действует | Механизм  действии | Трудности терапевтического применения |
| b-Лактамные | Пенициллины, цефалоспорины | Грибы   родов   *Реnicillium,   Cephalosporum* | Грамположительные и грамотрицательные  бактерии | Нарушение синте­за клеточной стенки | Аллергические   реакции |
| Аминогликозидные | Стрептомицин, гентамицин,  канамицин, тобрамицин, амикацин | Актиномицеты ро­да *Streptomyces,* бактерии родов *Micromonospora. Bacil­lus* | В  основном   грамотрицательные   бак­терии | Необратимое   подавление   синтеза белка | Токсическое дейст­вие на слуховой нерв и почки |
| Тетрациклины | Одноименные  антибиотики | Актиномицеты ро­да *Streptomyces* | Грамположительные   играмотрицательныебактерии, риккетсии, хламидии, простейшие | Обратимое подав­ление синтеза белка | Распространение устойчивых штаммов |
| Макролиды | Антибактериаль­ные: эритромицин Противогрибковые и антипротозойные: полиены | Актиномицеты ро­да *Streptomyces*То же | Грамположительные бактерии Грибы,   некоторые простейшие | То же  Нарушение  плаз­матической   мемб­раны | Токсичность |
| Полипептидные и   депсипептидные | Полимиксины, грамицидины, бацитрацины | Различные микро-организмы | В  основном   грамотрицательные   бак­терии | Механизм   дейст­вия различен | Высокая   токсичность |

Важной задачей является повышение эффективности биосин­теза известных антибиотиков. Значительных результатов удалось добиться за десятилетия селекции штаммов-продуцентов с приме­нением индуцированного мутагенеза и ступенчатого отбора. На­пример, продуктивность штаммов Penicilliumпо синтезу пеницил­лина увеличена в 300—350 раз. Определенные перспективы от­крываются в связи с возможностью клонирования генов «узких мест» биосинтеза антибиотика или в случае, если все био­синтетические ферменты кодируются единым опероном.[7]

Многообещающим подходом служит инкапсулирование анти­биотиков, в частности их включение в лигюсомы, что позволяет прицельно доставлять препарат только к определенным органам и тканям, повышает его эффективность и снижает побочное действие. Этот подход применим и для других лекарственных препаратов. Например, кала-азар, болезнь, вызываемая лейгшма-нией, поддается лечению препаратами сурьмы. Однако лечебная доза этих препаратов токсична для человека. В составе липосом препараты сурьмы избирательно доставляются к органам, пора­женным лейшманией, — селезенке и печени.

Вместо антибиотика в организм человека может вводиться его продуцент, антагонист возбудителя заболевания. Этот подход берет начало с работ И. И.Мечникова о подавлении гнилостной микрофлоры в толстом кишечнике человека посредством молоч­нокислых бактерий. Важную роль в возникновении кариеса зу­бов, по-видимому, играет обитающая во рту бактерия Streptococ­cusmutans,которая выделяет кислоты, разрушающие зубную эмаль и дентин. Получен мутант Strept. mutans,который при введении в ротовую полость почти не образует коррозивных кислот, вытесняет дикий патогенный штамм и выделяет леталь­ный для него белковый продукт.[10]

**3. Получение гормонов**

Биотехнология предоставляет медицине новые пути получения ценных гормональных препаратов. Особенно большие сдвиги произошли в последние годы в направлении синтеза пептидных гормонов.[13]

**Получение гормона роста в биотехнологии**

Раньше гормоны получали из органов и тканей животных и человека (крови доноров, удаленных при операциях органов, трупного материала). Требовалось много материала для получе­ния небольшого количества продукта. Так, человеческий гормон роста (соматотропин) получали из гипофиза человека, каждый гипофиз содержит его не более 4 мг. В то же время для лечения одного ребенка, страдающего карликовостью, требуется около 7 мг соматотропина в неделю; курс лечения должен продолжать­ся несколько лет. С применением генноинже-нерного штамма *Е. coli*в настоящее время получают до 100 мг гормона роста на 1 л среды культивирования. Открываются пер­спективы борьбы не только с карликовостью, но и с низкорослостью — более слабой степенью дефицита соматотропина. Сома­тотропин способствует заживлению ран и ожогов, наряду с кальцитонином (гормоном щитовидной железы) регулирует обмен Са2+ в костной ткани.[14]

Гормон роста или соматотропин принадлежит к семейству гипофизарных белковых гормонов. Этот регуляторный белок, имеющий молекулярную массу около 22000 дальтон, выполняет в организме важную функцию стимулятора соматического роста.

Впервые гормон был выделен и очищен в 1963 году из гипофиза, полученного из трупного материала. Гормон видеоспецифичен и является единственным средством лечения детей, страдающих от его недостатка [2].

Действие соматотропного гормона на костный рост опосредовано через соматомедины - инсулиноподобные ростовые факторы полипептидной природы. Главным источником соматомединов в циркуляции является печень, где их синтез стимулируется соматотропным гормоном. В регуляции гепатической продукции соматомединов участвуют и другие гормоны - инсулин, пролактин, тиреоидные гормоны. Помимо печени, соматомедины синтезируются в других клетках и тканях, в частности в хрящевой ткани, где они могут действовать локально.[3]

Химический синтез гормона сложен и дорог. Именно поэтому соматотропин оказался одним из первых продуктов, полученных методами генной инженерии. Фирмой Genentech Inc.(CШA) был сконструирован "квазисинтетический" ген соматотропина, построенный из синтетического фрагмента ДНК, кодирующего 23 аминокислоты N-концевой части гормона и фрагмента к ДНК, несущего информацию об остальной части молекулы соматотропина. Введение его в плазмиду, содержащую бактериальный промотор (регуляторный элемент, контролирующий транскрипцию гена) и сигнал инициации трансляции, обеспечивало эффективную экспрессию гена и приводило к синтезу гормона роста.

Соматотропины разной видовой принадлежности, обладая различиями в химической структуре, иногда довольно значительными, тем не менее проявляют четкую структурную гомологию. Все изученные соматотропины млекопитающих, в том числе человека, построены из одной полипептидной цепи, состоящей из 191 аминокислотного остатка. Они содержат по одному остатку триптофана и четыре остатка полуцистина. Два дисульфидных мостика (в соматотропине человека между остатками Цис54-Цис165 и ЦИС182-ЦИС189) формируют две петли полипептидной цепи - большую, включающую центральный участок аминокислотной последовательности, и малую на С-концевом участке.[4]

Пространственная структура соматотропинов характеризуется высокой степенью упорядоченности. Высокое содержание в составе соматотропинов нелолярных аминокислот обуславливает их большую склонность к образованию в растворе димеров и более крупных агрегатов [5].

Отмечая в целом эволюционную консервативность соматотропина в ряду млекопитающих, которая сочетается с консервативностью его биологической функции, следует сказать, однако, что в этом ряду несколько особняком стоит соматотропин человека. Сохраняя схему строения, общую для других млекопитающих, гормон человека отличается аминокислотной последовательностью от изученных соматотропинов животных на 34-35%. Этим может объясняться неэффективность соматотропинов животного происхождения как стимуляторов роста при введении людям.

Вместе с тем при сравнении аминокислотных последовательностей соматотропинов человека и различных животных во всех этих белках легко выявляются участки, почти идентичные по структуре. Высокая эволюционная консервативность отдельных участков полипептидной цепи может свидетельствовать об их принципиально важной функциональной роли как носителей информации о специфической функции гормонального белка.[5]

Гормон роста, или соматотропный гормон (СТГ), продуцируется специализированными клетками гипофиза - соматотрофами. Содержание соматотропного гормона в одном гипофизе человека составляет около 5 мг и по крайней мере на порядок превышает содержание других гормонов.

Биосинтез и секреция соматотропного гормона находятся под сложным контролем, включающим регуляцию в первую очередь гипоталамическими факторами: ингибирующую регуляцию соматостатином и стимулирующую СТГ-рилизинг фактором, а также гормонами - трийодтиронином и глюкокортикоидами, опиоидными пептидами и т.д.

Секреция соматотропного гормона зависит также от концентрации в плазме крови метаболитов, в регуляции обмена которых участвует СТГ, увеличивается в условиях дефицита энергетических субстратов, а также во время сна и в стрессовых ситуациях.[7]

Продуцируемый гипофизом соматотропный гормон отличается высокой гетерогенностью, являющейся результатом как альтернативного сплайсинга мРНК соматотропного гормона, так и посттрансляционных модификаций - протеолиза, фосфорилирования, гликозилирования, димеризации и олигомеризации. При стимуляции секреции гормона все эти формы высвобождаются из гипофиза в циркуляцию и через 30 мин более 50% соматотропного гормона присутствует в плазме крови в мономерной форме, 27% - в димерной и менее 20% - в олигомерной.

Среди мономерных форм соматотропного гормона доминирует 22 кдальтон СТГ (83%), в меньших количествах присутствует 20 кдальтон СТГ (11%) и около 6% составляют различные кислые формы гормона. Таким образом, реакция организма на соматотропный гормонаявляется результатом суммарного действия белков, несколько различающихся по физико-химическим, биологическим и иммунологическим свойствам [1].

Несмотря на большой прогресс, достигнутый в исследовании соматотропных гормонов человека и животных, механизм их действия на молекулярном уровне изучен недостаточно. Отсутствие данных о точной пространственной структуре гормонов этой группы затрудняет исследования их взаимодействия с рецепторами, ограничивает возможности изучения структурно-функциональных взаимоотношений различных участков полипептидной цепи, не позволяет в полной мере использовать достижения белковой инженерии для создания аналогов соматотропинов.

Рекомбинантный соматотропин, получивший название соматрем, стал вторым биосинтетическим фармацевтическим препаратом. СТГ, биологически чистый и свободный от вирусных загрязнений, впервые был получен в 1980 году фирмой «Genentech». Гормон, синтезированный в генетически сконструированных клетках кишечной палочки, отличается от гормона, выделенного из гипофиза, дополнительным остатком метионина на NН2 – конце молекулы [3].

На первом этапе клонировали двунитевую ДНК-копию мРНК и расщеплением рестрикционными эндонуклеазами получили последовательность, которая кодирует всю аминокислотную последовательность гормона, за исключением первых 23 аминокислот. Затем клонировали синтетический полипептид, соответствующий аминокислотам от 1-й до 23-й. Далее два фрагмента объединяли, затем «подстроили» к паре промоторов (промотор – специфическая последовательность в ДНК, необходимая для инициации транскрипции РНК-полимеразы) и участку связывания рибосом. Конечный выход гормона составил 2,4 млг на 1 мл культуры E.cjli (100000 молекул гормона на клетку). СТГ, синтезированный в бактериях, обладал нужной м.м. и не связан с каким-либо бактериальным белком, от которого его необходимо было отщеплять.

Изменяя аминокислотную последовательность СТГ посредством модификации кодирующего его гена, в бактериальных клетках можно синтезировать аналоги гормона, очень важные для изучения активных участков молекулы и этиологии карликовости на молекулярном уровне.

Используя методы рекомбинантных ДНК, можно синтезировать и другие факторы роста и факторы дифференцировки тканей, выделив вначале их мРНК, затем получив соответствующие гены. Это относится к соматомедину А, стимулирующему фиксацию серы в хряще, образование которого индуцируется соматотропином.[7]

В 1982 году выделен и синтезирован полипептид, содержащий из 44 аминокислотных остатков, обладающий полной биологической активностью гипоталамического ризилинг-фактора соматотропина (СТГ-РФ). Введение СТГ-РФ способно компенсировать недостаток соматотропина. Примнение 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.

Весь технологический цикл состоит из пяти функционально различных этапов:

1) ферментация;

2) первичная очистка белка;

3) хроматографическая очистка;

4) изготовление лекарственной формы;

5) анализ качества субстанции и лекарственной формы соматогена.

Важной особенностью технологического процесса является обеспечение апирогенности при проведении хроматографической очистки белка.

Неотъемлемой составной частью каждого технологического цикла промышленного производства является проведение сложного комплекса анализов качества продукта. В основе объема и номенклатуры этих анализов лежат соответствующие рекомендации ВОЗ.[10]

В настоящее время разработан более совершенный препарат СТГч из ГТЧ, лишенный агрегированных форм и консерванта, - аусоматин. При производстве мономерных препаратов СТГч (например, аусоматина) получаются значительные количества агрегированных форм соматотропина в виде отходов производства. Разработан оригинальный способ превращения нековалентно связанного димера и полимера в мономер. Кроме того, во время этого процесса получаетсяковалентно связанный димер и полимер СТГч - мало изученные компоненты.

Интересны разработки по получению 20К варианта СТГч. Перспективной задачей является получение и изучение не только различных форм СТГ, но и иммобилизованного СТГ с целью получения пролонгированного действия гормона. Разработан оригинальный способ получения иммобилизованного СТГч, обладающего пролонгированным действием [4].

Параллельно с получением СТГч была создана оригинальная комплексная технология получения гормонов аденогипофиза, в том числе всех видоспецифических, и некоторых их модификаций из ГТЧ. Важное значение имеет реализация целевой программы по созданию лечебного препарата СТГ (соматогена), полученного методом генной инженерии.

Клинический опыт показал, что, оптимизируя лечение низкорослости, целесообразно иметь в арсенале несколько аналогичных фармацевтических препаратов, получаемых различными технологиями или даже методами (СЧ, аусоматин, соматоген). Длительное лечение (годами) одним препаратом СТГч вызывает в организме уменьшение чувствительности в нему. Частично это может быть результатом образования антител, однако основную причину надо искать на уровне рецепторов и процессинга гормона.[2]

Работа с ГТЧ, а также комплексные исследования выделяемых гормонов и их различных форм дают возможность изучать созданные природой системы и лучше их понять. Существование различных нативных форм СТГч в организме свидетельствует об их целесообразности и о возможном применении, например, в клинике.

При создании новых препаратов СТГч необходимо в первую очередь ориентироваться на нативные природные формы гормона и в случае целесообразности масштабировать их методом генной инженерии, как это делается с мономером СТГч.

При производстве препаратов СТГч из ГТЧ успешно реализуется комплексная промышленная технология получения и других гормонов аденогипофиза (ЛГч, ФСГч, ТТГч и др.). Необходимо оптимизировать производство, внедряя новые прогрессивные методы (аффинную хроматографию и др.); получать особочистые гормоны по комплексной технологии. Надо расширить производство и применение наборов иммуномикроанализа гормонов аденогипофиза для диагностики и биотехнологии, осуществить регламентированное производство стандартизированных антител различной гаммы, создавать новые препараты СТГч, в том числе иммобилизованные.[2]

Тот факт, что СТГ влияет на белковый, жировой, минеральный обмен, действует на уровне клетки, не имея органа-мишени, и является анаболиком, дает большие перспективы его применения для стимуляции репарационных процессов и лечения различных заболеваний. Более широкое изучение этих вопросов, как и возможности применения различных модифицированных форм и вариантов СТГч, - актуальная и перспективная задача.[2]