

Сучасні тенденції розвитку біотехнологій в біології та фармації

Навчально-методичний посібник

Київ
Талком
2019

УДК 615.1+573.6]: 60:330.341.1 (075.8)
С 89

Рекомендовано до друку
Науково-методичною радою Відкритого міжнародного
університету розвитку людини «Україна»
(протокол № 3 від 25.06.2019 р.)

Укладачі :

Тугай Т. І., Поєдинок Н.Л., Сергійчук Н. М., Катинська М. Г.

Рецензент: Малишев В.В., д.т.н., професор, зав.кафедри сучасної інженерії і нанотехнологій, директор інженерно-технологічного Інституту Відкритого міжнародного університету розвитку людини «Україна».

Сучасні тенденції розвитку біотехнологій в біології та фармації: навч.-методич. посіб. / укл. Тугай Т. І., Поєдинок Н.Л., Сергійчук Н. М., Катинська М. Г. – К. : «Талком», 2019. – 125 с.

Навчально-методичний посібник описує сучасне значення біотехнології як напрямку науково-технічного прогресу з використанням біологічних процесів і біооб'єктів з метою цілеспрямованого впливу на природу в інтересах промислового отримання корисних продуктів для людини; одного з головних напрямків розвитку науки та суспільства, виробництва лікарських засобів, біорегуляторів та вакцин.

Буде корисними для використання у навчальному процесі для студентів бакалаврату та магістратури спеціальностей 091 «Біологія» та 226 «Фармація, промислова фармація» Факультету біомедичних технологій Відкритого міжнародного університету розвитку людини "Україна".

УДК 615.1+573.6]: 60:330.341.1 (075.8)

© Тугай Т. І., Поєдинок Н.Л.,
Сергійчук Н. М., Катинська М. Г., 2019

ЗМІСТ

ВСТУП	4
1.Основні напрямки та сучасні тенденції розвитку біотехнологій	6
2.Історія розвитку та предмет біотехнології	17
3.Біологічні об'єкти і методи біотехнології	26
4.Мета і завдання біотехнології	32
5.Використання біотехнологічних препаратів в лікувальній практиці	34
6.Біотехнологічні способи отримання сиропів фруктози	50
7.Біотехнологічні способи отримання глюкози й етанолу з целюлози	56
8.Біотехнологічні способи отримання L-яблучної кислоти	59
9.Біотехнологія виробництва антибіотиків	61
9.1 Теоретичні аспекти біотехнології антибіотиків	61
9.2 Одержання пеніцилінів	66
9.3 Отримання антибіотиків цефалоспоринового ряду	67
9.4 Модифікація β -лактамних антибіотиків	68
10.Біотехнологічні способи виробництва гормонів	75
10.1 Загальний підхід	75
10.2 Отримання інсуліну	80
10.3Отримання соматотропіну	85
11.Біотехнологічні способи отримання інтерферонів	90
12.Виробництво біотехнологічних препаратів в Україні	104
ЗАКЛЮЧЕННЯ	116
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	120

ВСТУП

У XXI ст. біологія стала лідером природознавства. Це зумовлено насамперед зростанням її практичних можливостей, її програмує роллю в аграрній, медичній, екологічній та інших сферах діяльності, здатністю вирішувати найважливіші проблеми життєдіяльності людини, в кінцевому рахунку навіть визначати долі людства (у зв'язку з перспективами біотехнологій, генної інженерії) тощо. Однією з найважливіших форм зв'язку сучасної біології з практикою є біотехнології.

Біотехнології – технологічні процеси, реалізовані з використанням біологічних систем - живих організмів і компонентів живої клітини. Біотехнології пов'язані з тим, що виникло біогенним шляхом, засновані на останніх досягненнях багатьох галузей сучасної науки: біохімії і біофізики, вірусології, фізико-хімії ферментів, мікробіології, молекулярної біології, генетичної інженерії, селекційної генетики, хімії антибіотиків, імунології та ін.

Сам термін «біотехнологія» набув поширення в 1970-ті рр. XX ст., Але людина мала справу з біотехнологіями і в далекому минулому. Деякі біотехнологічні процеси, засновані на застосуванні мікроорганізмів, людина використовує ще з найдавніших часів: в хлібопеченні, в приготуванні вина і пива, оцту,

сиру, різних способах переробки шкір, рослинних волокон і т.д.

Сучасні біотехнології засновані головним чином на культивуванні мікроорганізмів (бактерій і мікроскопічних грибів), тварин і рослинних клітин, методах генної інженерії.

1. ОСНОВНІ НАПРЯМКИ ТА СУЧАСНІ ТЕНДЕНЦІЇ РОЗВИТКУ БІОТЕХНОЛОГІЙ

Основними напрямками розвитку сучасних біотехнологій є медичні біотехнології, агробіотехнології та екологічні біотехнології. Новітнім і найважливішим відгалуженням біотехнології є генна інженерія.

Медичні біотехнології включають діагностичні та лікувальні. Діагностичні медичні біотехнології поділяють на хімічні (визначення діагностичних речовин і параметрів їх обміну) і фізичні (визначення особливостей фізичних процесів організму).

Хімічні діагностичні біотехнології використовуються в медицині здавна. Але якщо раніше вони зводилися до визначення в тканинах і органах речовин, що мають діагностичне значення (статичний підхід), то зараз розвивається і динамічний підхід, що дозволяє визначати швидкості утворення і розпаду представляють інтерес речовин, активність ферментів, що здійснюють синтез або деградацію цих речовин. Крім того, сучасна діагностика розробляє методи функціонального підходу, за допомогою якого можна оцінювати вплив функціональних впливів на зміну діагностичних речовин, а отже, виявляти резервні можливості організму.

У майбутньому зросте роль фізичної діагностики, яка дешевше і швидше, ніж хімічна, і полягає у визначенні фізико-хімічних процесів, що лежать в основі життєдіяльності клітини, а також фізичних процесів (теплових, акустичних, електромагнітних) на тканинному рівні, рівні органів і організму в цілому. На базі такого роду аналізу в рамках біофізики складних біологічних систем будуть розвиватися нові методи фізіотерапії.

Біотехнології широко використовуються у фармації. У давнину для лікування хворих застосовували тваринні, рослинні і мінеральні речовини. Починаючи з XIX ст. у фармакології набувають поширення синтетичні хімічні препарати, а з середини XX ст. і антибіотики – особливі хімічні речовини, які утворюються мікроорганізмами і здатні надавати вибірково токсичний вплив на інші мікроорганізми. Наприкінці XX ст. фармакологи звернулися до індивідуальних біологічно активним сполукам і стали складати їх оптимальні композиції, а також використовувати специфічні активатори та інгібітори певних ферментів, суть дії яких – у витісненні патогенної мікрофлори нешкідливою для здоров'я людей мікрофлорою (використання мікробного антагонізму).

Біотехнології допомагають у боротьбі сучасної медицини з серцево-судинними захворюваннями (насамперед з атеросклерозом), з онкологічними захворюваннями, з алергіями як патологічним порушенням імунітету (здатність

організму захищати свою цілісність і біологічну індивідуальність), старінням та вірусними інфекціями (у тому числі зі СНІД).

Так, розвиток імунології (науки, що вивчає захисні властивості організму) сприяє лікуванню алергії. При алергії організм відповідає на вплив деякого специфічного алергену надмірною реакцією, що руйнує його власні клітини і тканини в результаті набряку, запалення, спазму, порушень мікроциркуляції, гемодинаміки. Імунологія, вивчаючи клітини, що здійснюють імунну відповідь (імуноцити), дозволяє створювати нові підходи до лікування імунологічних, онкологічних та інфекційних захворювань.

Людина поки не вміє лікувати СНІД і погано лікує вірусні інфекції. Хіміотерапія та антибіотики, ефективні в боротьбі з бактеріальною інфекцією, неефективні щодо вірусів (наприклад, збудників атипової пневмонії). Передбачається, що тут істотний прогрес буде досягнутий завдяки розвитку імунології, молекулярної біології вірусів, зокрема вивчення взаємодії вірусів із специфічними для них клітинними рецепторами.

Біотехнологічними способами виробляють вітаміни, діагностичні засоби для клінічних досліджень (тест-системи на наркотики, ліки, гормони тощо), біорозкладанні пластмаси, антибіотики, біосумісні матеріали, харчові добавки.

«Зелена революція» відбулася за рахунок використання мінеральних добрив, пестицидів та інсектицидів. З їх допомогою вдалося домогтися

різкого підвищення продуктивності рослинництва. Але зараз зрозумілі і її негативні наслідки, наприклад насичення продуктів харчування нітратами та отрутохімікатами. Тому основне завдання сучасних агробіотехнологій - подолання негативних наслідків «зеленої революції», мікробіологічний синтез засобів захисту рослин, виробництва кормів і ферментів для кормовиробництва та ін. При цьому наголос робиться на біологічні методи відновлення родючості ґрунту, біологічні методи боротьби з шкідниками сільськогосподарських культур, на перехід від монокультур до полікультур (що підвищує вихід біомаси з одиниці площі сільгоспугідь), виведення нових високопродуктивних і володіють іншими корисними властивостями (наприклад, посухостійкістю або стійкістю до засолення) сортів культурних рослин.

Продовольчі сільськогосподарські культури служать сировиною для харчової промисловості. Біотехнології використовуються при виготовленні харчових продуктів з рослинної і тваринної сировини, їх зберіганні і кулінарній обробці, при виробництві штучної їжі (штучної ікри, штучного м'яса з сої, боби якої багаті повноцінним білком), при виробництві корму для худоби з продуктів, отриманих з водоростей і мікробної біомаси (наприклад, отримання кормової біомаси з мікробів, що ростуть на нафті).

Оскільки мікроорганізми надзвичайно різноманітні, мікробіологічна промисловість на їх

основі виробляє самі різні продукти, наприклад ферментні препарати, що знаходять широке застосування у виробництві пива, спирту.

Біотехнології є одним з найважливіших способів вирішення екологічних проблем. Вони застосовуються для знищення забруднень навколишнього середовища (наприклад, очищення води або очищення від нафтових забруднень), для відновлення зруйнованих біоценозів (тропічних лісів, північній тундри), відновлення популяцій зникаючих видів або акліматизації рослин і тварин у нових місцях проживання.

Так, за допомогою біотехнологій вирішується проблема освоєння забруднених територій стійкими до цих забруднень видами рослин. Наприклад, взимку в містах для боротьби зі сніговими заметами використовуються мінеральні солі, від яких гинуть багато видів рослин. Однак деякі рослини стійкі до засолення, здатні поглинати цинк, кобальт, кадмій, нікель та інші метали з забруднених ґрунтів; звичайно, вони краще в умовах великих міст. Виведення сортів рослин з новими властивостями – один з напрямків екологічної біотехнології.

Важливі напрямки екологічних біотехнологій – ресурсна біотехнологія (використання біосистем для розробки корисних копалин), біотехнологічна (з використанням бактеріальних штамів) переробка промислових і побутових відходів, очищення стічних вод, знезараження повітря, генно-інженерні екологічні біотехнології.

Біотехнології успішно застосовуються в деяких «екзотичних» галузях. Так, у багатьох країнах мікробна біотехнологія використовується для підвищення нафтовіддачі. Мікробіологічні технології виключно ефективні і при отриманні кольорових і благородних металів. Якщо традиційна технологія включає в себе випал, при якому в атмосферу викидається велика кількість шкідливих сірковмісних газів, то при мікробної технології руда переводиться в розчин (мікробне окислення), а потім шляхом електролізу з нього отримують цінні метали.

Використання метанотрофних бактерій дозволяє знизити концентрацію метану в шахтах. А для вітчизняної галузі вуглевидобутку проблема шахтного метану завжди була однією з найгостріших: за статистикою, через вибухи метану в шахтах кожен видобутий 1 млн. т. вугілля забирає життя одного шахтаря.

Створені біотехнологічними методами ферментні препарати знаходять широке застосування у виробництві пральних порошків, в текстильній і шкіряній промисловості.

Космічна біологія і медицина вивчають закономірності функціонування живих організмів, насамперед людського, в умовах космосу, космічного польоту, перебування на інших планетах і тілах Сонячної системи. Одним з важливих напрямків у цій галузі є розробка космічних біотехнологій - замкнутих біосистем, призначених для функціонування в умовах тривалого космічного польоту.

Таким чином, сучасні біотехнології виключно різноманітні. Не випадково ХХІ ст. нерідко називають століттям біотехнології.

Найважливішим відгалуженням біотехнології, що відкриває самі приголомшливі перспективи перед людством, є генна інженерія.

Генна інженерія виникла в 1970-і рр.. як розділ молекулярної біології, пов'язаний з цілеспрямованим створенням нових комбінацій генетичного матеріалу, здатного розмножуватися (у клітині) і синтезувати кінцеві продукти.

Методами генної інженерії спочатку були отримані трансгенні мікроорганізми, які мають гени бактерії і гени онкогенного вірусу мавпи, а потім - мікроорганізми, що несуть у собі гени мушки дрозофіли, кролика, людини. Згодом вдалося здійснити мікробний синтез багатьох біологічно активних речовин, присутніх в тканинах тварин і рослин у низьких концентраціях: інсуліну, інтерферону людини, гормону росту людини, вакцини проти гепатиту, а також ферментів, гормональних препаратів, клітинних гібридів, що синтезують антитіла бажаної специфічності.

Генна інженерія відкрила перспективи конструювання нових біологічних організмів – трансгенних рослин і тварин із заздалегідь запланованими властивостями. За суттю, непереборних природних обмежень для синтезу генів немає (так, існують програми зі створення трансгенної вівці, покритої замість вовни шовком; трансгенної кози, молоко якої містить цінний для

людини інтерферон; трансгенного шпинату, який виробляє білок, що пригнічує ВІЛ-інфекції тощо). Виникла нова галузь промисловості – трансгенна біотехнологія, що займається конструюванням і застосуванням трансгенних організмів.

У нерозривному зв'язку з розробкою технологій генної інженерії розвиваються фундаментальні дослідження в молекулярній біології. Одним з найважливіших напрямків молекулярної біології та генної інженерії є вивчення геномів рослинних і тваринних видів і розробка способів їх реконструкції. Геном – це сукупність генів, характерних для гаплоїдного, тобто одинарного набору хромосом даного виду організмів. На відміну від генотипу геном являє собою характеристику виду, а не окремої особини. Загальна логіка дослідження веде молекулярну біологію від з'ясування способів відтворення генома виду до розробки способів відтворення генотипу особини.

Величезне значення має вивчення генома людини. В рамках одного з найбільш трудомістких і дорогих в історії науки міжнародного проекту «Геном людини» задіяно декілька тисяч вчених з понад 20 країн; вартість - до 9 млрд. дол. завданням з'ясувати послідовність нуклеотидних підстав у всіх молекулах ДНК людини і локалізувати їх, тобто повністю картувати всі гени людини. Очікується, що потім дослідники за функціями генів розроблятимуть технологічні способи використання цих даних.

У ході виконання проекту «Геном людини» розроблено багато нових методів дослідження, більшість з яких останнім часом автоматизовано. Це значно прискорює і здешевлює розшифровку ДНК, що є найважливішою умовою для їх широкого використання в медичній практиці, фармакології, криміналістиці. Серед цих методів є й такі, які дозволяють розшифровувати генотип окремої людини і створювати генні портрети людей. Це дає можливість ефективніше лікувати хвороби, оцінювати здібності і можливості кожної людини, виявляти різницю між популяціями, оцінювати ступінь пристосованості конкретної людини до тієї чи іншої екологічної обстановки. За послідовністю ДНК можна встановлювати ступінь спорідненості людей. Розроблено метод «генетичної дактилоскопії», який з успіхом застосовується в криміналістиці. Подібні підходи можна використовувати в антропології, палеонтології, етнографії, археології.

Молекулярна генетика відкриває широкі перспективи для генної інженерії. Одне з таких перспективних напрямків – створення трансгенних рослин, тварин, мікроорганізмів, тобто таких організмів, у власний генетичний матеріал яких «вмонтовані» чужорідні гени. Площа посівів трансгенних гербіцидостійких сої, бавовни, кукурудзи займають багато млн га в усьому світі.

Розвинена та індустрія трансгенних тварин. Вони широко використовуються для наукових цілей як джерело органів для трансплантації, як

виробники терапевтичних білків, для тестування вакцин.

Наприклад, в Німеччині трансгенний бик (по кличці Герман) містить у своєму геномі людський ген лактоферину, який кодує синтез особливого білка жіночого молока, від якого немовлята солодко сплять.

Складовою частиною проектів створення трансгенних організмів є дослідження і розробки в галузі генної терапії – лікувальні процедури, такі, як введення потрібних трансгенів у клітини хворого організму, заміна хворих генів здоровими, адресна доставка ліків в уражені клітини. Трансгени, потрапляючи у клітину, компенсують її генетичні дефекти, послаблюючи або посилюючи синтез того чи іншого білка.

Надалі трансгенні технології передбачається використовувати для вирішення широкого кола проблем. Так, для вирішення ряду екологічних проблем розробляється програма конструювання трансгенних мікробів, які можуть: активно поглинати CO₂ з атмосфери, а отже, знижувати парниковий ефект; активно поглинати воду з атмосфери, перетворювати пустелі на родючі землі; конструювати трансгенні мікроорганізми, що підвищують родючість ґрунтів.

Для підвищення ефективності сільського господарства передбачається створювати трансгенні рослини з підвищеною харчовою і кормовою цінністю, трансгенні дерева для виробництва паперу, для нарощування деревини, трансгенних тварин з підвищеною продуктивністю

біомаси та молока, трансгенні види цінних порід риб, зокрема лососевих.

Підвищення ефективності охорони здоров'я за допомогою трансгенних технологій припускає, зокрема, рішення проблем контролю над спадковими захворюваннями (трансгенні віруси для генної терапії, трансгенні мікроби як живі вакцини).

Світовий ринок фармацевтичної продукції, отриманої біотехнологічними методами, становить понад 60% всього біотехнологічного ринку.

2. ІСТОРІЯ РОЗВИТКУ ТА ПРЕДМЕТ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Біотехнологія – наука про використання хіміко-біологічних процесів і біологічних об'єктів (мікроорганізмів, культур клітин і тканин рослинного і тваринного походження, ферментних препаратів та інших біологічно активних речовин) у промисловому виробництві. Назва її походить від грецьких слів *bios* — життя, *teken* — мистецтво, *logos* — наука.

Відповідно до визначення Європейської федерації біотехнологів у 1984 році біотехнологія базується на інтегральному використанні біохімії, мікробіології, молекулярної біології, клітинної та генетичної інженерії з метою промислової реалізації властивостей мікроорганізмів, культур клітин і тканин. Уже у самому визначенні предмета відображено його місцерозташування як прикордонного, завдяки чому результати фундаментальних досліджень у сфері біологічних, хімічних і технічних дисциплін набувають прикладного значення.

Біотехнологія – одна з найдавніших і водночас одна з наймолодших наук і галузей промисловості.

Людство здавна опанувало на практиці різні процеси біотехнології. Ще з біблейських часів було відоме виноробство, випікання хліба, а дещо пізніше – одержання кисломолочних продуктів,

квашеної капусти, медових алкогольних напоїв, силосування кормів. Стародавні народи інтуїтивно використовували прийоми і способи виготовлення продуктів, які сьогодні ми відносимо до біотехнологічних.

Значний поштовх у розвитку біотехнології пов'язаний з видатними дослідженнями великого французького вченого Луї Пастера (1822–1895) — основоположника наукової мікробіології. Він розкрив мікробну природу бродіння, довів можливість життя у безкисневих умовах, експериментально спростував уявлення про самовільне зародження живих істот, створив наукові основи вакцинопрофілактики і вакцинотерапії, запропонував метод стерилізації, названий його ім'ям, — пастеризацією.

Починаючи з другої третини ХХ ст. розпочалось впровадження масштабного герметизованого обладнання, яке забезпечує проведення процесів у стерильних умовах. Особливо потужний поштовх у розвитку промислового біотехнологічного обладнання був відмічений у період становлення і розвитку виробництва антибіотиків (період Другої світової війни 1939–1945 рр., коли виникла гостра необхідність у протимікробних препаратах для лікування хворих з інфікованими ранами). У цей час були вирішені основні завдання з конструювання, створення і впровадження у практику біореакторів, які використовуються й нині.

Однак термін «біотехнологія» прижився лише з середини 70-х років ХХ ст., коли біотехнологія

пережила своє друге народження у зв'язку з появою генетичної інженерії. Власне становлення біотехнології як самостійної науки розпочалося з 1972 р., коли П. Берг зі співробітниками у США створили першу рекомбінантну молекулу ДНК.

Звичайно, без фундаментальної роботи Ф. Кріка та Дж. Уотсона (1953 р.) щодо встановлення структури ДНК було б неможливо досягнути сучасних результатів у сфері біотехнології. З'ясування механізмів функціонування і регуляції ДНК, виділення і вивчення специфічних ферментів призвело до формування чіткого наукового підходу, до розробки біотехнологічних процесів на основі генно-інженерних робіт.

Вже у 1982 р. надійшов у продаж людський інсулін, синтезований кишковими паличками, які містили штучно вмонтовану інформацію про цей гормон. Згодом з'явилися інші генно-інженерні препарати: інтерферони, соматотропний гормон людини, інтерлейкін-2.

У цей період були отримані суперпродуценти антибіотиків, ферментів, амінокислот, вітамінів; розроблені та впроваджені екологічно чисті безвідходні технології. Розроблена та впроваджена у практику спеціальна апаратура; здійснена автоматизація і комп'ютеризація біотехнологічних процесів.

Протягом останніх 10–15 років минулого століття проходив бурхливий розвиток біотехнології, визначались сфери пріоритетного впровадження конкретних результатів технологічних розробок.

Саме у 80-ті роки ХХ ст. біотехнологія й отримала поштовх до розвитку як перспективний напрямок фармацевтичної технології.

Розвиток біотехнологічного напрямку є яскравим прикладом поступового динамічного розвитку фармацевтичної технології минулого століття як науки, що ставить усе нові й нові завдання не тільки подальшого удосконалення теоретичних основ існуючих методів виготовлення фармацевтичної продукції, але й створення нових фармацевтичних субстанцій, препаратів і терапевтичних систем, інтеграції нових наукових розробок у виробництво ліків та впровадження їх у медичну практику системи охорони здоров'я з метою подальшого покращання фармацевтичної допомоги.

Виникнення, становлення та розвиток біотехнології умовно можна поділити на такі періоди: емпіричний, етіологічний, біотехнічний і генотехнічний.

Емпіричний, або доісторичний період – найтриваліший, охоплює майже 8000 років, коли люди застосовували ліки в тому вигляді, в якому вони зустрічалися в природі, або незначно використовували найпростіші методи обробки, наприклад, лікарської рослинної сировини. Однак не зважаючи на це, саме тоді були отримані оцет, вино (ХІІ ст.), горілка (ХVІ ст.), абсолютний етанол (ХVІ ст.), кисломолочні продукти, медові алкогольні напої тощо.

Етіологічний період (друга половина ХІХ ст. — перші 30 років ХХ ст.), пов'язаний з

дослідженнями французького ученого Луї Пастера (розкрив природу бродіння, довів можливість життя в умовах відсутності кисню, створив наукові основи вакцинопрофілактики та вакцинотерапії, запропонував метод стерилізації (пастеризації) та розробками його учнів та послідовників Е. Дюкло, Е. Ру, І.І. Мечнікова та інших. У цей період було доведено індивідуальність мікробів, їх існування в чистих культурах і використано для бродіння, окиснювальних процесів, отримання дріжджів, деяких продуктів обміну (метаболізму).

Біотехнічний період розвитку біотехнології розпочався в 1933 р. з моменту опублікування праці А. Клейвера та Л.Х.Ц. Перкіна «Методы изучения обмена веществ у плесневых грибов», яка дала поштовх розвитку промислового герметизованого обладнання та механізації біопроцесів, створення умов виробництва антибіотиків (1936–1945 рр.). Майже за 40 років були вирішені основні завдання з конструювання, створення та впровадження в практику промислового обладнання (біореакторів) та проведення біопроцесів у стерильних умовах.

Вважається, що *генотехнічний* період біотехнології розпочався в 1972 р., коли П. Берг (США) з колегами створили першу рекомбінантну молекулу дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК). Однак це було неможливо зробити без фундаментальної роботи Ф. Крика і Дж. Уотсона (1953 р.) з встановлення структури ДНК. Формування основ нового напрямку з розвитку біотехнології характеризується такими етапами:

- у 1980 р. стартувало перше комерційне виробництво рекомбінантного людського інсуліну (на ринок надійшов у 1982 р.);
- у 1982 р. розроблена рекомбінантна ДНК-вакцина для тварин;
- у 1983 р. була проведена полімеразна ланцюгова реакція, що стала початковою методикою медичної ДНК-діагностики, яка дозволяла визначати всі хвороби та їх збудників;
- у 1986 р. побачив світ перший біотехнологічний препарат γ -інтерферон, який пізніше був з успіхом використаний для лікування раку;
- важливою віхою в розвитку біотехнології був проект «Геном людини», в дослідженнях якого було використано 100 тис. генів людської ДНК з метою розроблення основ генної терапії. У 1997 р. була клонована перша тварина (вівця Долі);
- у 1999 р. були культивовані людські стовбурові клітини в лабораторних умовах (почали використовуватись у медицині в 2003 р.).

Майже одночасно з розвитком генотехнічного напрямку почався бурхливий розвиток фармакогенетики; визначалися сфери пріоритетного впровадження конкретних біотехнологічних розробок і, як наслідок, формувалися основні напрямки розвитку біотехнології та використання її продукції.

До сфери *медичної біотехнології* (виробництво фармацевтичної продукції для медичного призначення, тобто для цілей діагностики, профілактики, лікування хвороб) можна віднести напрям *імунобіотехнології*, зокрема виробництво вакцин, імуноглобулінів крові, імуномодуляторів, моноклональних антитіл та профілактичної лікувальної продукції, а також виробництво антибіотиків, деяких вітамінів, коферментів і ферментів, окремих мікробних полісахаридів і допоміжних речовин, що використовуються у виробництві фармацевтичних препаратів, амінокислот нуклеозидів тощо (хоча значна частка продуктів за цим напрямком – ферменти, амінокислот – використовується поза межами системи охорони здоров'я).

Існує також *космічна біотехнологія*, яка освоює специфічні неземні умови. Можна з певністю стверджувати, що космос створює не тільки великі труднощі, але й має великі переваги: це, перш за все, невагомість та відсутність стінок контейнерів, що суттєво змінює властивості рідин та перебіг фізико-хімічних процесів, на яких базується більшість біотехнологій.

Здійснюються інтенсивні дослідження з нанотехнологій, що сприяє формуванню напряму *нанобіотехнології*. Практичні розробки цього напряму реалізуються в отриманні ліпосом, нанокапсул, наноплівок, наносфер, наносенсорів тощо. Біонаночастинки в інтервалі 0,1–100 нм при створенні нових нанофармацевтичних препаратів можуть виступати як переносники активних

субстанцій або для створення комплексів, що сприяє значному підвищенню ефективності фармакотерапії багатьох захворювань. Це водночас вимагає поглибленого вивчення впливу нанооб'єктів на фізіологічні процеси макроорганізму.

Інженерна ензимологія – напрямок біотехнології, що використовує каталітичну функцію ферментів або ферментні системи в ізольованому стані або у складі живих клітин з метою отримання відповідних цільових продуктів. Біооб'єктами є ферменти, переважно іммобілізовані, що значно підвищує стабільність і пролонгує їх ферментативну активність.

Сьогодні біотехнологію можна вважати найбільш успішним напрямком фармацевтичної промисловості. У біологічні технології спрямовують найбільше інвестицій, що помітно збільшує номенклатуру біотехнологічних препаратів на світовому фармацевтичному ринку.

Компанії все більше уваги приділяють розробкам у напрямку генетики з метою створення так званих малих молекул. Найперспективнішими вважаються моноклональні антитіла. Нині асортимент біотехнологічних препаратів помітно розширився.

Для розробки нового біопрепарату компанії витрачають у середньому близько 10–15 років та понад 1 млрд.дол.США. Слід відмітити дуже складний процес тестування безпеки та ефективності біопрепаратів, які проходять той самий шлях лабораторних і клінічних досліджень

та дозвільних процедур. При реєстрації враховуються їх реактогенність, імуногенність, клініко-епідеміологічна ефективність, біологічна та біотехнологічна специфічність та багато інших. З цих причин генеричні біопрепарати не можуть реєструватися за скороченою процедурою.

Слід наголосити, що тільки біотехнологія відкрила перед фармацевтичною промисловістю можливість виробляти антибіотики, низку незамінних амінокислот, окремі вітаміни, ферменти, антиферменти, гормони, інгібітори гормонів, окремі кровозамісники, імуногени, біорадіопротектори, імуномодулятори, імунодіагностикуми, біосенсиори та багато інших. При виробництві ліків біотехнології успішно конкурують з тонкими хімічними технологіями, використовуються на всьому технологічному ланцюгу (наприклад синтезі вітаміну В₁₂) або на окремих виробничих етапах.

Сучасну біотехнологію часто характеризують як біологію на основі *генетичної інженерії* (використання знань, методів і техніки фізико-хімічної біології та молекулярної генетики з метою конструювання організмів із заданою спадковістю або вмінням реалізовувати генноінженерне завдання – отримувати рекомбінантну ДНК (рДНК) з наступним включенням її в реципієнтну клітину або здійснювати перенесення цілих хромосом від клітин-донорів до клітин-реципієнтів).

3. БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ БІОТЕХНОЛОГІЇ

До хіміко-біологічних процесів належать ті з них, в яких використовують біологічні об'єкти різної природи (мікробної, рослинної або тваринної), наприклад, при виробництві продукції різноманітного призначення — антибіотиків, вакцин, ферментів, кормового і харчового білка, гормонів, амінокислот, біогазу, органічних добрив.

Об'єкти біотехнології дуже різноманітні й діапазон їх розповсюджується від організованих частин (вірусів) до людини (Рис. 1).

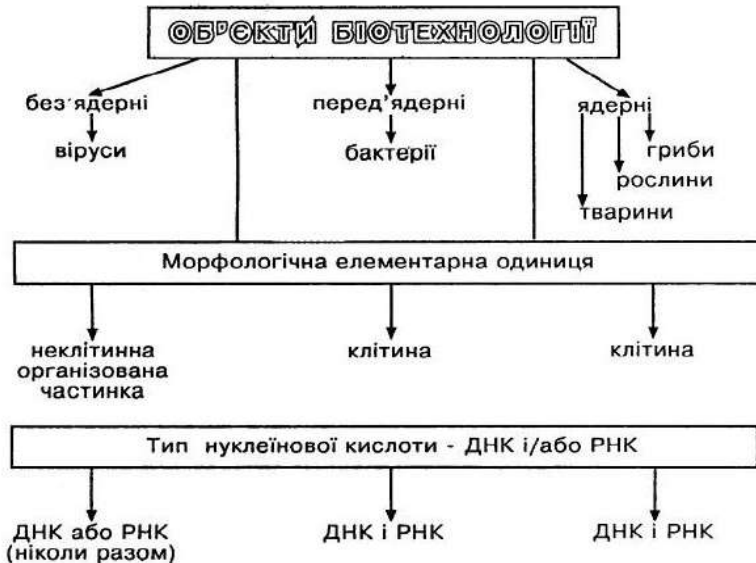


Рис.1. Класифікація об'єктів біотехнології

Біооб'єкти характеризуються такими показниками, як рівень структурної організації, здатність до розмноження (або репродукції), наявність або відсутність власного метаболізму при культивуванні у належних умовах.

Що стосується характеру біооб'єктів, то під цим слід розуміти їх структурну організацію. В такому випадку біооб'єкти можуть бути молекулами (ферменти, імуномодулятори, нуклеозиди, оліго- та поліпептиди), організованими частинами (віруси, фаги), одноклітинними (бактерії, дріжджі) і багатоклітинними особинами (нитчасті вищі гриби, рослинні тканини, одношарові культури клітин ссавців), цілими організмами рослин і тварин. Але навіть при використанні біомолекули як об'єкта біотехнології її початковий біосинтез здійснюється у більшості випадків відповідними клітинами.

Отже, можна стверджувати, що об'єкти біотехнології належать або до мікробів, або до рослинних і тваринних організмів.

Таким чином, незалежно від систематичного положення біооб'єкта на практиці використовують або природні організовані частинки (фаги, віруси) і клітини з природною генетичною інформацією, або клітини з штучно заданою генетичною інформацією, тобто у будь-якому випадку використовують клітини – чи то мікроорганізм, рослина, тварина або людина.

Нині більшість об'єктів біотехнології становлять мікроби, світ яких дуже великий і різноманітний. До них належать усі прокариоти –

бактерії, актиноміцети, рикетсії, синьозелені водорості й частина еукаріот – дріжджі, нитчасті гриби, простіші й водорості (Рис. 2). Мікробами серед рослин є мікроскопічні водорості, а серед тварин – мікроскопічні найпростіші.



Рис. 2 Класифікація мікроорганізмів

Основою сучасного біотехнологічного виробництва є мікробіологічний синтез, тобто синтез різноманітних речовин за допомогою мікроорганізмів. Об'єкти рослинного і тваринного походження ще не знайшли широкого розповсюдження через їх високу вимогливість до умов культивування, що значно здорожчує виробництво.

Для реалізації біотехнологічних процесів важливими параметрами біооб'єктів є: чистота, швидкість розмноження клітин і репродукції вірусних частин, активність і стабільність біомолекул або біосистем.

При використанні ферментів (в ізольованому або іммобілізованому стані) як біокатализаторів виникає необхідність охорони їх від деструкції банальною сапрофітною мікрофлорою, яка може проникати у сферу біотехнологічного процесу ззовні внаслідок нестерильності системи, наприклад, через негерметичність обладнання.

Швидкість розмноження клітин і репродукція вірусних частин прямо пропорційно відбиваються на збільшенні біомаси і утворенні метаболітів.

Активність і стабільність перебування біооб'єктів в активному стані – найважливіші показники їх придатності для тривалого використання в біотехнології.

Головною ланкою біотехнологічного процесу, який визначає його сутність, є клітина. Саме в ній синтезується цільовий продукт. За влучним висловом Овчіннікова Ю.А. (1985 р.), клітина – це мініатюрний хімічний завод, який працює з колосальною продуктивністю, з граничною узгодженістю і за заданою програмою. В ній щохвилино синтезуються сотні найскладніших сполук, включаючи гігантські біополімери, у першу чергу, білки.

Узагальнена схема одержання біотехнологічної продукції наведена на Рис. 3.

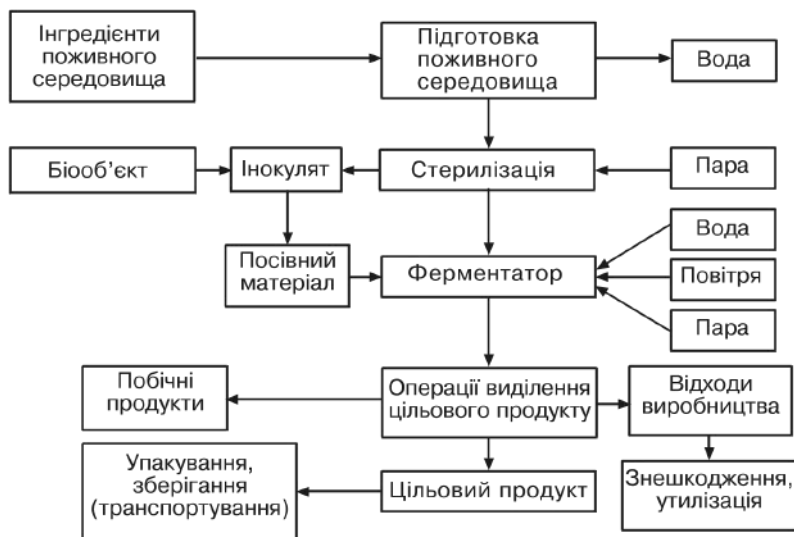


Рис. 3. Приблизна узагальнена схема процесів у біотехнології

Методи біотехнології. Біотехнології притаманні свої специфічні методи. Це крупномасштабне глибинне культивування біоб'єктів у періодичному, напівбезперервному або без перервному режимі та вирощування клітин рослинних і тваринних тканин в особливих умовах. Біотехнологічні методи культивування біоб'єктів виконуються у спеціальному обладнанні, наприклад, у ферментерах вирощують бактерії і гриби при одержанні антибіотиків, ферментів, органічних кислот, деяких вітамінів тощо.

У подібних ферментерах вирощують деякі клітини людини (бласти) для одержання білка

інтерферону, а також деякі види рослинних клітин. Однак останні частіше вирощують у стаціонарних умовах на середовищі з ущільненою (наприклад, агаризованою) підкладкою у скляних або поліетиленових ємностях.

Інші методи, які використовують у біотехнології, є спільними, наприклад з методами в мікробіології, біохімії, органічній хімії й інших науках. Особливо потрібно виділити методи клітинної і генетичної інженерії, які покладено в основу сучасної біотехнології.

Відмінністю методів, які використовуються у біотехнології, є те, що вони повинні виконуватись, як правило, в асептичних умовах (від грецького *a* – ні, *septicus* – гнилісний), тобто з уникнення можливості потрапляння у середовище, де культивується біооб'єкт, патогенних і сапрофітних мікроорганізмів.

Патогенні види становлять безпосередню небезпеку для за діяних у виробництві людей і для споживачів кінцевих продуктів; сапрофітні види можуть виступати конкурентами за поживні субстрати, антагоністами, продуцентами токсичних речовин, включаючи пірогени.

4. МЕТА І ЗАВДАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Першочерговими завданнями біотехнології є створення:

✓ нових біологічно активних речовин і лікарських препаратів для гуманної і ветеринарної медицини (інтерферонів, інсуліну, гормонів росту людини, моноклональних антитіл, вакцин тощо) для ефективної профілактики, діагностики і лікування людей і тварин;

- засобів захисту рослин від хвороб і шкідників; бактеріальних добрив і регуляторів росту рослин; нових високопродуктивних і стійких до несприятливих факторів зовнішнього середовища сортів і гібридів сільськогосподарських рослин, одержаних методами генетичної і клітинної інженерії;

✓ цінних кормових добавок і біологічно активних речовин (кормового білка, амінокислот, ферментів, вітамінів тощо) для застосування у тваринництві з метою підвищення продуктивності тварин;

✓ нових технологій одержання цінних продуктів для використання у харчовій, хімічній, мікробіологічній та інших галузях промисловості;

✓ безвідходних і екологічно безпечних технологій утилізації і біоконверсії сільськогосподарських, промислових, побутових відходів для одержання енергоносіїв (біогазу), високоякісного органічного добрива, білкових та вітамінних кормових добавок;

- ✓ удосконалення і оптимізація апаратури для біотехнологічних процесів з метою досягнення максимальних виходів кінцевих продуктів;
- ✓ підвищення техніко-економічних показників біотехнологічних процесів порівняно з існуючими.

На шляху вирішення поставлених завдань біотехнологію чекають немалі труднощі, пов'язані з виключною складністю організації живого. Будь-який біооб'єкт — це цілісна система, в якій не можна змінити жоден з елементів, не змінюючи інших, не можна довільно перекомбінувати їх. Будь-який вплив на об'єкт викликає не тільки бажані, але й побічні ефекти. Перебудова геному відразу відбивається на багатьох ознаках організму. Окрім цього, екосистема — це свого роду цілісна система, і зміна одного з її компонентів позначається на інших компонентах.

Успіхи, досягнуті у сфері генетичної і клітинної інженерії на найпростіших біологічних системах (прокаріотних організмах), дають надію на подолання цих труднощів.

5. ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ В ЛІКУВАЛЬНІЙ ПРАКТИЦІ

Застосування ферментів та інших біологічно активних речовин (БАР) білкової природи в терапії має давні традиції. Сучасна медицина широко використовує високоочищені препарати БАР білкової природи як перспективні засоби медикаментозного лікування завдяки їхній високій активності і специфічності.

Так, у теперішній час визначилися такі основні напрями ензимотерапії:

- 1) усунення дефіциту ферментів з метою компенсації вродженої або набутої функціональної недостатності;
- 2) видалення нежиттєздатних, денатурованих структур, клітинних і тканинних уламків;
- 3) лізис тромбів;
- 4) комплексна терапія злоякісних новоутворень;
- 5) детоксикація організму.

Як лікувальні препарати ферменти застосовуються з метою поповнення відсутніх в організмі каталізаторів, що виникає внаслідок генетичних чи інших патологічних порушень, а також для специфічного руйнування шкідливих продуктів обміну, що накопичуються в організмі хворого.

На сьогодні дуже важливою проблемою є лікування уроджених ензимопатій. Нині досліджено майже 150 уроджених «лізосомних» хвороб

накопичення, за яких через генетично обумовлену відсутність того чи іншого ферменту в клітині відбувається летальне нагромадження субстрату.

Сюди ж варто віднести і захворювання, що виникають через відсутність ферменту, який каталізує певну стадію обміну. Наприклад, фенілкетонурія (хвороба, яка призводить до затримки розумового розвитку) викликається нестачею ферменту, що перетворює фенілаланін у тирозин. Відсутність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в еритроцитах призводить до виникнення невиліковного захворювання – фавізму. Захворювання печінки і нирок супроводжується нагромадженням в організмі токсичних продуктів життєдіяльності.

Теоретично з лікувальною метою у таких випадках потрібно ввести хворому відсутній фермент із чужорідного джерела. Але спроби лікувати внутрішньовенним введенням відповідних нативних ферментів, виділених з біологічних рідин і тканин, не дали бажаних результатів, особливо при лікуванні лізосомних хвороб.

Причиною неефективності терапії нативними ферментами є швидке виведення чужорідного білка-ферменту з кровотоку і захоплення його печінкою ще до його дії, а також зумовлення ними як чужорідними білками різних побічних реакцій (антигенність, алергенність, токсичність тощо), що може стати причиною летального наслідку.

В живому організмі ферменти і фізіологічно важливі білки майже завжди містяться всередині клітини. При цьому фермент знаходиться в оточенні, яке здатне підтримувати його нативну структуру, і

часто локалізований у безпосередній близькості до інших ферментів, які переробляють продукт реакції першого. Ферментативні системи взаємодіють із субстратами через мембрану клітини за допомогою різних транспортних механізмів.

При безпосередньому введенні ферменту в організм, він може потрапити в умови, які сприяють його денатурації, і активність ферменту буде стрімко знижуватись одразу ж після ін'єкції. Небезпечними для ферментів є протеїнази організму, які розщеплюють введений білок на неактивні пептиди, а також інгібітори, які зв'язуються з ферментом через активний центр. В результаті вони будуть утилізовані лейкоцитами і фагоцитами.

Крім того, введений у нативному стані фермент, як речовина високої молекулярної маси, дифундуватиме дуже повільно у потрібне місце (хворий орган), а введений безпосередньо у хвору ділянку буде швидко вимиватися кровотоком або іншими рідинами. Крім того, широке щоденне застосування ферментів обмежене й економічними факторами — їх високою вартістю, а цьому можна запобігти за рахунок іммобілізації ферменту, що сприяє його стабілізації і захищає певною мірою від реакції імунної системи, а також збільшує час його дії у кровотоці.

Модифікація лікарської речовини дозволяє пролонгувати її дію в організмі, знизити токсичність препарату, що використовується, та уникнути його протеолізу.

Поряд з проблемою імуногенності одним з головних завдань при виготовленні лікарських

препаратів на основі ферментів (білкових речовин) є виведення препарату з організму повністю. Наразі шляхи виведення ферменту в цілому з'ясовані і основною проблемою є виведення з організму носія.

Тому носії, які використовуються для іммобілізації білкових лікарських препаратів, мають відповідати певним вимогам, які залежать від способу їх застосування. Вони не повинні негативно впливати на організм і мають сприяти проникненню препарату до бажаної цілі (до хворого органу). І носії, і зшивка повинні бути нетоксичними, без антигенних властивостей. При безпосередньому введенні носій повинен з часом руйнуватися в тканинах і виводитися з організму або метаболізуватися. У зв'язку з цим молекулярна маса носія не має перевищувати 60 000, щоб він міг виводитися нирками. Речовини з високою молекулярною масою забиватимуть ниркові каналці. Винятком можуть бути полімери, що деградуються, які руйнуються в організмі до нормальних метаболітів. До таких полімерів, наприклад, належить D, L-полімолочна кислота, декстрини.

Якщо ж іммобілізований фермент буде використовуватись у позаорганізмовому шунті, то кращий носій – вініловий полімер. Стабілізація терапевтичних ферментів у деяких випадках може здійснюватися без використання полімерних носіїв за рахунок хімічної модифікації білкової глобули низькомолекулярними реагентами, або введенням у глобулу внутрішньомолекулярних зшивок з біфункціональних реагентів, що ускладнює денатураційне розгортання молекули білка. Цей підхід важливий тоді, коли для здійснення функції ферменту

має відбутися його взаємодія з рецептором клітинної мембрани (наприклад, паратромбін–тромбоцит), або проникнути всередину клітини.

У деяких випадках використовується міжмолекулярне зшивання ферментів біфункціональними реагентами типу глутарового альдегіду, що можна також розглядати як іммобілізацію однієї молекули ферменту на іншій. Така модифікація ферменту призводить до підвищення його стабільності й ефективності. Наприклад, таким чином вдалося стабілізувати б-галактозидазу, яка використовується для лікування хвороби Фабрі.

Зв'язування ферментів з іншими білками також дає виражений ефект — кон'югати урикази або гемоглобіну з альбуміном здатні в декілька разів довше циркулювати в активному стані у кровотоці, ніж відповідні нативні білки.

Найкращими носіями є поліцукри, зокрема декстрини, завдяки високій біосумісності. Для іммобілізації терапевтичних ферментів можуть використовуватись і деякі нетоксичні та неімуногенні синтетичні полімери, наприклад, реакційноздатні похідні поліетиленгліколю, полівінілпіролідону, полівінілового спирту.

Певну перспективу відкриває використання як носіїв природних сполук, які самі по собі мають корисну фізіологічну активність або здатні посилювати дію зв'язаного з ним ферменту. Так, для іммобілізації тромболітичних ферментів може використовуватись антикоагулянт гепарин.

Можливість регуляції імунної відповіді організму на введення терапевтичного ферменту є дуже важливим моментом.

Багато перспективних ферментних препаратів не можуть використовуватися через те, що викликають, як чужорідні білки, негативні реакції організму. В той же час іммобілізація таких ферментів на природних або синтетичних полімерах, наприклад, на поліцукрах або поліетиленгліколі, різко знижує імунологічні й алергічні реакції, можливо, за рахунок стеричних перешкод взаємодії антиген–антитіло, які створюються матрицею.

Іммобілізація терапевтичних ферментів та інших білкових препаратів може проводитися різноманітними методами ковалентної і нековалентної фіксації ферментів на нерозчинних і розчинних носіях різної природи. Вибір методу залежить від призначення препарату та способу його введення.

Існують два принципово різних підходи до одержання і застосування іммобілізованих терапевтичних ферментів:

- 1) введення в організм;
- 2) використання у реакторах за допомогою по заорганізового шунта (штучної нирки) чи імплантації реактора з іммобілізованим ферментом як протеза кровоносної судини.

Перший підхід обумовлюється різновидами, що залежать від патологічних уражень організму. При різних системних ураженнях, коли необхідна присутність терапевтичного ферменту в різних органах і тканинах, доцільно використовувати тим чи іншим методом іммобілізований водорозчинний препарат,

який має підвищену стабільність та уповільнене виведення з організму. До нього належать різні ферментовмісні «штучні клітини» типу мікрокапсул, ліпосом, «тіней» еритроцитів.

З іншого боку, для терапії локальних уражень, коли присутність ферменту потрібна лише у місці ураження, доцільно створювати біосумісні ферментовмісні полімерні частини (які біодеградуються чи просто тимчасово імплантуються), що можуть бути локалізовані в певному місці і залишатися там деякий час, виділяючи безперервно в оточуюче середовище терапевтичний фермент.

Препарати іммобілізованих ферментів для локального застосування можуть бути одержані як на основі нерозчинних полімерів, так і носіїв, які біодеградуються. У першому випадку носій після закінчення дії ферменту механічно видаляється з вогнища ураження, а в другому — самостійно руйнується у тканинах.

З використанням мікрогранул зшитого декстрану сефадексу були одержані препарати тромболітичних ферментів з заданою швидкістю біодеградації — фібролізін, стрептокіназа і урокіназа. Вони можуть створювати локальне депо при терапії тромбозів.

Другий підхід в одержанні і застосуванні іммобілізованих ферментів — це використання їх у різних екстракорпоральних апаратах для перфузійного очищення різних біологічних рідин.

Екстракорпоральна перфузія з використанням ферментів широко застосовується для виведення токсинів з організму. Носіями є сферичні частинки з полімерів, скла, кераміки, силікатів. Вимоги до цих

носіїв такі: вони мають бути з мінімальною неспецифічною сорбцією, не повинні викликати деформацію формених елементів крові і не мають бути дорогими, тому що колонки для гемодіалізу і детоксикації одноразового використання.

Окремим випадком цього підходу є створення ферментних реакторів, які використовуються як тромбобезпечні протези кровоносних судин. Сюди належить також перев'язувальний матеріал, який містить зазвичай протеолітичні ферменти, що використовуються для очищення гнійних ран.

При лікуванні системних уражень розчинні препарати іммобілізованих ферментів можуть використовуватися для традиційного внутрішньовенного введення. Але краще їх вводити у черевну порожнину, де каталітична активність зберігається протягом 8 місяців. Так, модифіковані декстраном карбоксипептидаза G і аргіназа при внутрішньочеревному введенні мишам з прищепленою мастоцитомою мають здатність створювати більш високу і тривало діючу концентрацію активності у кровотоці, ніж нативні ферменти.

Іммобілізація на розчинних полімерних носіях дає можливість одержати більш стабільні, активні і безпечні терапевтичні препарати. Таким методом можна з успіхом іммобілізувати інші препарати білкової природи – різні фізіологічно активні поліпептиди типу панкреатичного інгібітора трипсину і, що надто важливо, гормону інсуліну.

Перспективним методом іммобілізації і застосування модифікованих форм ферментів для лікування є створення різного типу «штучних клітин».

Лікарські препарати, в яких співвідношення білок: полімер за масою дуже високе і досягає сотень тисяч і вище, можуть бути виготовлені за допомогою методу так званої «штучної клітини», а також ліпосом. Ці препарати є свого роду мікросферами з більш-менш твердою і проникною оболонкою. Їхнє призначення різне.

Першим типом «штучних клітин» є мікрокапсули, які були одержані Чангом Т.М. у 1965 році. Мікрокапсульовані препарати ферментів – це крихітні реактори діаметром від 10^3 до 510^4 нм, тонка полімерна оболонка яких (200–400 нм) проникна для низькомолекулярних сполук, тобто для низькомолекулярних субстратів і продуктів їх перетворення. Фермент, який знаходиться всередині оболонки, надійно утримується, не контактує з біологічними рідинами і тканинами організму, не руйнується протеїназами, не інгібується та не викликає імунної реакції. В мікрокапсулу можуть бути включені відносно високі концентрації ферменту, досягти яких у кровотоці при використанні нативного ферменту неможливо, а також різні ферменти одночасно.

Основною перевагою мікрокапсул є можливість імплантувати їх у потрібне місце, наприклад у безпосередній близькості до пухлини. Фермент, включений у капсулу, може бути попередньо стабілізованим, або поряд з ним можуть бути включені сполуки, також високомолекулярні, які сприяють його стабілізації.

Капсули можуть містити мікроскопічні ділянки тканин. Наприклад, ще у 1987 році були експериментальні дані зі створення депо інсуліну в

організмі шляхом імплантації мікрокапсул, що містять острівки Лангерганса, які синтезують у підшлунковій залозі інсулін.

Всередину мікрокапсул можуть бути включені поліферментні системи і їх кофактори, модифіковані з метою збільшення молекулярної маси та утримання всередині мікросфери.

Полімерна стінка мікрокапсул зазвичай виготовляється із міцних синтетичних полімерів (поліамідів, поліуретанів), або з природних (полімолочної кислоти). Полімолочна кислота біодеградується з достатньою швидкістю і тому зникає проблема утилізації матеріалу оболонки мікрокапсул в організмі, а такі ферментні препарати є дуже перспективними.

Однак застосування мікрокапсул із синтетичних полімерів дуже ефективно при позаорганізмовому їх використанні: у вигляді колонок для діалізу в апараті «штучна нирка». Це дає можливість зменшити об'єм препарату і відповідно кількість необхідних дорогих розчинів.

Наприклад, для мікрокапсульованої «штучної нирки» потрібна колонка об'ємом усього 30 мл, яка працює майже у 100 разів швидше за звичайний апарат.

Уреазу з носієм (іонообмінною смолою чи активованим вугіллям) поміщують в одну мікрокапсулу. Аміак, який утворюється в процесі розкладу сечовини, адсорбується всередині мікрокапсули.

У деяких випадках для виготовлення мікрокапсул використовуються високомолекулярні

сполуки, розчинні за одних умов і зберігають високу міцність оболонок – за інших. Таким чином поводить себе ацетилфталілцелюлоза, мікрокапсули з якої інтактні у шлунковому соці і розчиняються у кишечнику, звільнюючи вміст.

Всерезину мікрокапсул можуть включатися магнітні частинки. У цьому випадку ззовні підводять магнітне поле і препарат утримують поблизу органу-мішені (хворого органу).

Перші успішні експерименти із застосування мікрокапсульованих ферментів на тваринах були проведені з використанням уреазу для зниження сечовини в крові, каталази для лікування тварин з каталазною недостатністю і аспарагінази для пригнічення росту аспарагінозалежних пухлин.

Наступним після мікрокапсулювання методом створення штучних клітин є включення ферментів у ліпосоми – штучні фосфоліпідні мікробульбашки, які ще називають контейнера міпереносниками.

Ліпосоми – це бішарові сферичні утворення діаметром від 20 до 10^3 нм, які одержують найчастіше при механічних впливах на дисперсії фосфоліпідів.

Ліпосоми цілком біосумісні, не викликають імунологічних реакцій, а фосфоліпіди ліпосом при їхній деградації можуть бути використані для синтезу клітинних мембран. На відміну від мікрокапсул ліпосоми мають здатність доставляти включений у них препарат безпосередньо до клітин, з якими ліпосоми взаємодіють, та сприяти надходженню відсутнього ферменту в ліпосоми. Однак уже через 15–30 хвилин після введення 50–80 % ліпосом поглинаються клітинами ретикулоендотеліальної системи,

насамперед печінки і селезінки. Отже, є проблема специфічного поглинання ферменту, укладеного в ліпосомах, певними тканинами.

Існують ідеї, реалізація яких дозволить ліпосомам доставляти фермент за адресою, тобто до хворого органу. Для цього передбачається на поверхню ліпосом включати антитіла до антигенних структур, що знаходиться на поверхні тих клітин, для яких призначений фермент.

З великої кількості ферментів, уже включених у ліпосоми, викликає інтерес аспарагіназа, що використовується для лікування деяких форм лейкозу.

Встановлено, що деякі лейкозні клітини не можуть синтезувати амідаспарагін, а отже, не можуть рости без використання екзогенного аспарагіну. Введення в кров'яне русло іммобілізованої за допомогою включення в ліпосоми чи капсули з полімолочної кислоти аспарагінази призводить до зниження концентрації цього амиду в крові до мінімального рівня. Загибель лейкозних клітин настає від аспарагінового голодування.

Враховуючи те, що клітини ретикулоендотеліальної системи, зокрема печінки, являють собою природну мішень для ліпосом, то включені у ліпосоми ферменти можуть виявитися дуже ефективними для лікування різних ферментних нестач печінки.

Як контейнери для включення ферментів можуть використовуватися і оболонки клітин крові, зокрема мембрани або «тіні» еритроцитів. Одержують їх шляхом часткового гемолізу еритроцитів з подальшим заповненням ферментом та повним відновленням

цілісності мембрани. Таким методом одержали «тіні» еритроцитів, які заповнені в-глюкозидазою, в-галактозидазою, в-глюкуронідазою, аспарагіназою.

Крім еритроцитів, використовуються і оболонки інших клітин. Так, одержані лікарські препарати, які включені в оболонки макрофагів.

Макрофаги мають тенденцію накопичуватись у вогнищах запалення, а значить і можуть транспортувати туди як низько-, так і високомолекулярний лікарський препарат. Позитивним щодо «тіней» клітин як носіїв є їх повна сумісність з організмом людини чи тварини, оскільки цей носій готують на основі клітин, виділених із організму пацієнта.

Певний інтерес становлять міцели – утворення, які менші за діаметром від ліпосом. Вони дуже перспективні як носії ферментів для виготовлення складних мазевих композицій, в яких ферменти нестійкі.

Завдяки перевагам, яких набувають іммобілізовані ферменти порівняно з нативними (стабільність, неімуногенність, не піддаються протеолізу, дії мікроорганізмів, можуть мати властивість концентруватись у бажаному органі), вони є дуже перспективними для застосування у клінічній практиці. Найбільших успіхів досягнуто у двох напрямках: лікуванні гострої серцевої недостатності і терапії процесів, викликаних ранами.

Найбільш широко використовуються в клінічній практиці протеолітичні ферменти. Одержані іммобілізовані протеази – субтилізін, трипсин, б-хімотрипсин, терилітин.

У колишньому СРСР вперше в світі у лікувальну практику була введена іммобілізована на поліцукристовому носії стрептокіназа, яка з успіхом і зараз використовується для лікування різних тромболітичних захворювань. Препарат «Стрептодекіназа» не має антигенних властивостей, нетоксичний і стабільний.

Відомо, що протеїнази, розщеплюючи денатуровані білки, сприяють очищенню ран і, відповідно, їх загоюванню. Як носії для іммобілізації протеолітичних ферментів з цією метою найчастіше використовуються волокнисті матеріали на основі целюлози, полівінілового спирту, солей альгінової кислоти, поліамідні і колагенові волокна. Готують також препарати, іммобілізовані на гранульованих носіях – целюлозних кульках, гранулах декстрину. Готують нитки, в які при формуванні включають фермент і використовують їх як шовний матеріал.

Порівняльний аналіз дії нативних та іммобілізованих протеїназ (в основному б-хімотрипсину, трипсину, терилітину, субтилізину, колагенази) показав, що уже на 2–4-й день рана очищається від некротичних мас і вдвічі швидше настає грануляція. Іммобілізовані протеолітичні ферменти з великим успіхом використовуються у лікуванні гнійних захворювань легень і плеври. Природний полімер колаген ефективний як носій при використанні протеїназ для введення у черевну порожнину, лікування емпієм, абсцесів.

Для створення протезів судин зі зниженою або виключеною можливістю тромбоутворення

використовуються біосумісні полімерні трубки, на внутрішній поверхні яких іммобілізують протеїнази.

Іммобілізовані протеолітичні ферменти ефективно використовуються для лікування гнійних захворювань та опіків у людей та тварин.

Такі протеолітичні ферменти як профезим і процель, іммобілізовані на гемоцелюлозі методом ковалентного зв'язування, застосовують при лікуванні гнійних ендометритів, гнійних маститів та гнійних ран кінцівок тварин. Перевага цих ферментів ще й у тому, що вони не всмоктуються в кров і не впливають на якість продукції.

Дуже важливими при лікуванні різних патологій є білки-інгібітори ферментів, і, зокрема, основний полівалентний інгібітор протеїназ. Його іммобілізували на поліцукрі карбоксіметилдекстрані, який, у свою чергу, модифікували залишками галактози.

Білкові інгібітори протеїназ застосовуються при лікуванні сепсису, бактеріального (ендотоксичного) шоку, алергічних захворювань, артрозоартритів. При інфаркті міокарда інгібітори протеїназ мають антиішемічну дію, зменшуючи некротичну зону і покращуючи колатеральний кровообіг.

На основі іммобілізованих білкових інгібіторів протеїназ синтезовані біоспецифічні сорбенти, які використовуються для лікування таких патологій як сепсис, гнійний перитоніт, опікова хвороба, нирковопечінкова недостатність.

Одержаний іммобілізований на органічному носії поліетиленоксиді протеолітичний фермент протосубтилін, який застосовується у виробництві біопрепаратів, гуманній і ветеринарній медицині.

Препарат має підвищену активність і термостабільність і активний в більш широкому діапазоні рН.

Одержаний також комплексний вітамінний препарат, іммобілізований на колагені і призначений для профілактики порушень обміну речовин. Іммобілізація вітамінних комплексів (аскорбінової кислоти, тіаміну, броміду пірідоксину) на колагеновому носії проводилася методом включення вітамінів у гель. Дослідами на лабораторних тваринах встановлено, що використання іммобілізованого комплексу вітамінів більшою мірою впливає позитивно при порушенні обміну речовин, ніж застосування водного розчину цих же вітамінів окремо.

6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ СПОСОБИ ОТРИМАННЯ СИРОПІВ ФРУКТОЗИ

Фруктоза (фруктовий, плодовий чи медовий цукор) широко розповсюджена в природі, міститься у багатьох фруктах і плодах. Особливо багаті на неї яблука, а також бджолиний мед, який майже наполовину складається із фруктози. Порівняно зі звичайним цукром (до складу молекул якого фруктоза теж входить, але у вигляді хімічної сполуки з менш солодкою глюкозою) фруктоза має більш приємний смак.

Фруктоза в 1,65 раза солодша за сахарозу і більш ніж у 2,2 раза солодша за глюкозу, що відповідно зменшує її споживання, а це, в свою чергу, призводить до зниження калорійності продукту. Це дуже важливо з точки зору дієтології харчування. Крім того, фруктозу на відміну від глюкози чи цукру можуть споживати хворі на діабет. Фруктоза в суміші з глюкозою не кристалізується (не зацукрується), що важливо для виробництва морозива, кондитерських виробів.

Сироп з високим умістом фруктози застосовується для виготовлення тонізуючих і ацидофільних напоїв, морозива, кондитерських виробів, консервованих фруктів та інших продуктів. Отже, підвищення солодкості сиропів за рахунок збільшення в них фруктози, потенційним джерелом якої може бути глюкоза, має практичне значення. У

світі були розпочаті спроби пошуку ефективних методів одержання цього продукту.

Солодкі фруктозні сиропи можна отримувати із цукрози шляхом кислотного гідролізу (сірчаною, лимонною кислотами, рідше соляною при підвищеній температурі), або більш ефективним ферментативним способом – інверсією за допомогою ферменту інвертази (сахарази). Під дією інвертази із цукрози утворюється суміш D-глюкози і D-фруктози.

Здатність до біосинтезу інвертази мають багато мікроорганізмів, але найбільш вивченою групою серед них є дріжджі і зокрема *Sacharomyces cerevisiae*.

Наводимо практичні приклади біотехнологічного процесу одержання такого інверту, з використанням інвертази, іммобілізованої на різноманітних носіях органічної і неорганічної природи.

Так, біокатализатором для безперервного процесу інверсії сахарози є дріжджова інвертаза, яка іммобілізована шляхом включення у порожнисті нитки триацетату целюлози. Біокатализатор має високу стабільність.

Включення інвертази у поліакриламідний гель дає можливість отримати біокатализатор, який має високу стабільність при температурі 30° – за 450 діб безперервної роботи активність інвертази зменшилася лише на 10 %.

Індійська національна корпорація NRDC розробила та використовувала промисловий процес інверсії цукру, біокатализатором якого є дріжджові клітини, іммобілізовані на неорганічному носії.

Можна одержувати високостабільний гетерогенний біокаталізатор для процесу інверсії цукру шляхом адсорбційної іммобілізації інвертази на керамічних носіях, вкритих каталітичним волокнистим вуглецем.

Інвертний цукор кристалізується порівняно з сахарозою повільніше, тому його використовують при виготовленні продуктів, в яких кристалізація цукру є небажаною, наприклад, при виробництві напіврідких начинок цукерок, а також лікерів, штучного меду, сиропів.

Більш перспективним є шлях одержання фруктози з глюкози, яка утворюється в результаті гідролізу крохмалю.

Відомо, що глюкозу можна перетворити на фруктозу ферментативним шляхом за участю ферменту глюкоїзомерази як розчинної, так і іммобілізованої. У промисловості глюкоїзомеразу використовують винятково в іммобілізованій формі. Комерційні препарати іммобілізованої глюкоїзомерази отримують різноманітними способами іммобілізації: адсорбцією ферменту на різних носіях (іонообмінних смолах і пористих неорганічних носіях); висушуванням цілих клітин продуценту, коли внутрішньоклітинний фермент залишався зв'язаним з клітиною; ковалентним зв'язуванням глюкоїзомерази на органічних і неорганічних носіях; включенням в гель і нитки; включенням в гель з подальшою зшивкою. В Таблиці 1 наведені способи найбільш розповсюджених промислових препаратів іммобілізованої глюкозоїзомерази.

Таблиця 1

Способи найбільш розповсюджених промислових препаратів іммобілізованої глюкозоізомерази

<i>Фірма (країна)</i>	<i>Назва препарату</i>	<i>Продуцент</i>	<i>Метод іммобілізації</i>
Novo Industri (Данія)	Sweet-zyme	Bacillus coagulans	Руйнування клітин, зшивка глутаровим альдегідом
Gist Brocades (Нідерланди)	Maха-zyme	Actinoplanes missouriensis	Зшивка глутаровим альдегідом клітин, змішаних з желатином
Miles Kali-Chemie (США – Німеччина)	Optis-weet 22	Streptomyces rubiginosus	Ковалентне зв'язування з кремнеземним носієм розчинного ферменту
ICI (Великобританія)	Immobilase	Arthrobacter species	Включення цілих клітин у сітку із полікатионів і аніонів
Nagase (Японія)	Sweetase	Streptomyces phaeochromogenes	Висушування цілих клітин
Roquette Freres (Франція)	Lysase	Streptomyces violaceoniger	Зшивка глутаровим альдегідом клітин, змішаних з желатином
Suomen Sokeri (Фінляндія)	Spezyme	Streptomyces rubiginosus	Зв'язування розчинного ферменту іонообмінною адсорбцією на композиційному носії із ДЕАЕ-целюлози, полістиролу і двоокису титану

Незважаючи на всі переваги фруктози над цукром, її виробництво у світі практично було відсутнє до середини 60-х років минулого століття.

У 1966 році в Японії вперше застосували розчинний препарат глюкозоізомерази для виробництва сиропу з високим вмістом фруктози.

Отриманий продукт містив 42% фруктози, 50% глюкози та 8% інших цукрів.

У 1973 році в США компанією «Клітон Корн» вперше було розпочато промислове виробництво сиропів з високим вмістом фруктози, але використовували для цієї мети не розчинну глюкоїзомеразу, як японці, а іммобілізований на целюлозному іонообміннику фермент у реакторі з плоским шаром.

Наукові основи процесу наступні. Фермент глюкоїзомераза каталізує перетворення (ізомеризацію) глюкози до фруктози за одну стадію, і реакція відбувається дотоді, доки в реакційній системі кількість глюкози і фруктози не стане майже однаковою. Після цього реакція припиняється і одержану суміш можна використовувати у вигляді глюкозофруктозного сиропу або відділити фруктозу, а глюкозу, яка залишилася, знову піддати ізомеризації.

Біотехнологічний процес ізомеризації глюкози здійснюється в реакторах, що мають форму колон висотою до 5 м, які попередньо заповнюють іммобілізованим ферментом у вигляді гранул, порожнистих ниток, кусочків гелю. В колону безперервним потоком зверху вниз подають розчин глюкози (попередньо отриманий при гідролізі кукурудзяного або картопляного крохмалю), а з колони витікає глюкозофруктозний сироп.

Про ефективність такої технології свідчать такі дані: на 1 кг іммобілізованого ферменту за 100 днів роботи одержують 4 т фруктози (у перерахунку на сухий продукт). Час напівінактивації ферменту (час, за який активність ферменту зменшується удвічі)

становить від 20 до 50 днів. Каталізатор (іммобілізований фермент) підлягає заміні тільки один раз у 2–3 міс., завдяки чому процес є економічно вигідним. Вартість продукту з іммобілізованим ферментом складає лише 61 % від вартості продукту з розчинним ферментом.

Для підтримки високої продуктивності установки протягом більш тривалого часу рекомендується використовувати чисту вихідну сировину.

Японська компанія «Кійова Хакко» для одержання сиропу з високим вмістом фруктози використовує глюковізомераза, іммобілізовану адсорбцією на фенолформальдегідній смолі Дуоліт А7. Вихідною сировиною є 40 % розчин глюкози при температурі 60 °С (рН 8,2), який пропускають через колону з Дуолітом А7, а готовий продукт для видалення солей пропускають послідовно через катіонообмінник і аніонообмінник. При безперервній роботі такого реактора протягом 40 днів не було встановлено мікробного забруднення системи через високу температуру (60°C). Напівінактивується іммобілізована глюковізомераза протягом 6 днів. Вартість виробництва при застосуванні іммобілізованого ферменту становила 61,5% вартості продукту, виготовленого із застосуванням розчинної глюковізомери.

7. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ СПОСОБИ ОТРИМАННЯ ГЛЮКОЗИ Й ЕТАНОЛУ З ЦЕЛЮЛОЗИ

Розробка цієї технології в масштабах крупнотоннажного виробництва має виняткове народногосподарське значення. Інтенсивна дослідницька робота з вивчення ферментативного гідролізу целюлози багато років проводиться в США, Японії, Швеції, Фінляндії, Італії; у менших обсягах – у Польщі, Чехії, Словаччині та Болгарії.

Провідним напрямом є пошук економічно вигідних шляхів одержання, в першу чергу, етанолу як джерела енергії, а не харчової глюкози, що пов'язано зі сформованою енергетичною ситуацією. Розробка високорентабельної технології одержання етилового спирту з поновлюваних ресурсів (рослинної біомаси, відходів сільського і лісового господарств, а також промисловості) дозволить зменшити енергетичний голод.

При розробці технології виробництва харчової глюкози нездоланні поки що труднощі, пов'язані з вибором джерел, якістю целюлозовмісної сировини і ферментних препаратів, що входять до целюлозного комплексу. Їх співвідношення й активність повинні бути в такий спосіб збалансованими, щоб кінцевим продуктом гідролізу була харчова глюкоза, а не суміш глюкози з іншими ді- та олігоцукрами, непридатними для використання у харчовій промисловості.

Гідролітична деградація целюлози здійснюється не менш ніж чотирма ферментами, що складають так званий целюлозний комплекс. Слід зазначити факт

існування у природних умовах іммобілізації ферментів або автоіммобілізації. Міцно адсорбувавшись на субстраті, ферменти целюлозного комплексу здійснюють свою каталітичну функцію. Продуктами гідролітичної реакції є глюкоза (20–40 %), дисахарид целобіоза і певна кількість більш складних олігоцукрів.

Склад кінцевих продуктів визначається видом целюлозовмісної сировини, складом і співвідношенням ферментів у целюлозному комплексі.

Цукри, що утворюються при гідролізі целюлози, можуть у реакційній суміші зброджуватись ферментами дріжджових клітин з утворенням етанолу. Через те, що целюлозні комплекси, які каталізують утворення з целюлози глюкози, ще не отримані, практичні зусилля спрямовані на створення технологій виробництва етанолу, який використовується як енергетичне джерело.

Усі виробники етанолу використовують целюлозний комплекс мікробного походження.

Одна з установок з переробки целюлозної сировини розроблена в США і працює у пілотному режимі. Тут одержують целюлозний комплекс ферментів і потім використовують його для переробки паперової макулатури у вуглеводи, які за допомогою целюлозного комплексу мікробного походження зброджуються з утворенням етанолу. На другій пілотній установці (у її створенні брали участь компанія «Голф Ойл», університети Пітсбурга і Канзаса (США) та японська компанія «Ниппон Майнінг») відпрацьовано біотехнологію виробництва етанолу з паперової макулатури і відходів сільськогосподарського виробництва.

Гідроліз целюлози у глюкозу можна провести за допомогою продуцента *Trichoderma reesii*, целюлаза якої руйнує кристалічну і нерозчинну целюлозу. У США одержали мутант *T. reesii*, який продукує у 2–4 рази більше целюлази, ніж штам дикого типу. Процес гідролізу целюлози дуже простий. Гриб вирощують у середовищі, яке містить відходи деревини і мінеральні солі. Потім культура фільтрується. До фільтрату з ферментом додається подрібнений папір. Усе поміщають в реакційний чан та інкубують за температури 50 °С й певного атмосферного тиску. Під час реакції гідролізу утворюється неочищений глюкозний сироп, а негідролізована целюлоза і фермент використовуються повторно. Вихід глюкози складає 50 % вихідної целюлози. На думку американських фахівців, процес перетворення відходів целюлози на спирт більш перспективний ніж одержання спирту із крохмалю кукурудзи.

8. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ СПОСОБИ ОТРИМАННЯ L-ЯБЛУЧНОЇ КИСЛОТИ

L-яблучна кислота має попит на світовому ринку як замітник лимонної кислоти в харчовій і фармацевтичній промисловості. Хімічним методом (гідролізом ангідриду яблучної кислоти) одержують тільки рацемічну суміш оптичних D-, L-ізомерів яблучної кислоти, а мікробіологічний синтез L-яблучної кислоти є непридатним для промислового виробництва через його високу вартість.

Однак L-яблучну кислоту можна одержати шляхом ферментації з тієї самої fumarової кислоти, з якої одержують L-аспарагінову кислоту. За участю ферменту fumarази проходить гідратація fumarової кислоти (приєднання за подвійним зв'язком води) з утворенням L-яблучної кислоти. Як біокатализатор використовують клітини, які містять фермент fumarазу.

Для одержання L-яблучної кислоти у великих кількостях японська фірма «Танабе Сейяку» використовує іммобілізовані мікробні клітини в поліакриламідному гелі. Однак вони, окрім основного процесу утворення L-яблучної кислоти, каталізують небажаний, побічний у данному випадку процес утворення янтарної кислоти. Для гальмування цієї реакції іммобілізовані мікробні клітини додатково обробляють. Іммобілізація підвищує стабільність клітинної fumarази. Час її напівінактивації при температурі 37°C складає 55 днів, тоді коли цей

показник для інтактних (необроблених) клітин сягає 6 днів.

Італійська компанія «Снам Проджетті» для виробництва L-яблучної кислоти використовує фермент фумаразу, яку іммобілізують шляхом включення у порожнисті нитки триацетату целюлози.

Окрім цього, компанія використовує для іммобілізації цілих мікробних клітин замість поліакриламідного гелю інший гель на основі карагінану (поліцукру із морських водоростей). Це збільшило час напівінактивації ферменту до 160 днів.

9. БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА АНТИБІОТИКІВ

9.1 Теоретичні аспекти біотехнології антибіотиків

Відкриття основних груп антибіотиків і весь комплекс генетичних і біохімічних досліджень їх продуцентів у 40–50 рр. минулого століття, які дозволили створити масштабне виробництво принципово нових лікарських препаратів, можна віднести до найважливіших досягнень біотехнології.

Демографічний вибух в одних країнах і різке збільшення тривалості життя в інших на той час були обумовлені значною мірою антибіотиками. Серед продукції фармацевтичної промисловості розвинених країн антибіотики посідають перше місце за всіма показниками.

Незважаючи на знання структури практично всіх відомих речовин з антибіотичною дією, їхній хімічний синтез громіздкий і неефективний. У промисловості одержують антибіотики медичного чи ветеринарного призначення, використовуючи здатність відповідних штамівпродуцентів генерувати даний антибіотик у певній фазі росту і заданому режимі культивування.

Антибіотики – це низькомолекулярні речовини, які розрізняються за хімічною структурою. Загальне в цих сполуках є те, що, залишаючись продуктами життєдіяльності мікроорганізмів, вони в дуже малих концентраціях порушують ріст мікроорганізмів.

Більшість антибіотиків належать до вторинних метаболітів, так званих ідіолітів.

Мікроорганізми, які виробляють вторинні метаболіти, спочатку проходять стадію швидкого росту – трофофазу, під час якої синтез вторинних метаболітів незначний. У міру сповільнення або припинення росту через виснаження однієї або декількох необхідних поживних речовин у культуральному середовищі мікроорганізми переходять в ідіофазу. У цей період синтезуються ідіоліти (антибіотики). Більшість мікроорганізмів у процесі трофофази чутливі до власних антибіотиків, однак у період ідіофази вони втрачають цю властивість. Щоб зберегти мікроорганізми, продукуючі антибіотики, від самознищення, потрібно швидко досягти ідіофази і потім культивувати мікроорганізми у цій фазі.

На сьогодні відомо близько 6 000 антибіотиків та антибіотичних речовин природного походження, продуцентами яких в основному є шість родів нитчастих грибів, три роди актиноміцетів (майже 4 000 різних антибіотиків) і два роди справжніх бактерій (майже 500 антибіотиків).

Із нитчастих грибів плісняві гриби родів *Cephalosporium* і *Penicillium* є продуцентами в-лактамних антибіотиків – пеніцилінів і цефалоспоринів. Більша частина синтезованих актиноміцетами антибіотичних речовин, включаючи тетрацикліни, належить до роду *Streptomyces* (один тільки вид *Streptomyces griseus* синтезує понад п'ятдесят антибіотиків).

Крім пеніцилінів і цефалоспоринів, до в-лактамних антибіотиків належать цефаміцини,

продуцентами яких є нитчасті бактерії актиноміцети, які належать до роду стрептоміцетів *Streptomyces*.

У 1945 р. Бротзу з Інституту гігієни в Кальарі (Сардинія) виділив із проби морської води плісень *Cephalosporium acremonium*, яка синтезує декілька антибіотиків, у тому числі цефалоспорин С, який особливо ефективний проти стійких до пеніциліну грампозитивних бактерій.

У період 40 – 70 років ХХ ст. кількість щорічно винайдених антибіотиків збільшувалася лінійно: щорічно відкривали приблизно 200 нових сполук. Наприкінці 70 років ХХ ст. антибіотики виявляли зі швидкістю 300 сполук на рік, з них 150 продукувались актиноміцетами.

Серед відомих тепер 5 000–6 000 природних антибіотиків і антибіотичних речовин для реалізації споживачам виробляється близько 100, більшість яких одержана зі стрептоміцетів. До найважливіших антибіотиків терапевтичного призначення, які використовувались донедавна і використовуються тепер належать наступні їх класи (Табл. 2).

Перелік наведених класів антибіотиків поповнюється щороку. Причини такої уваги до пошуку нових антибіотиків пояснюються токсичністю існуючих антибіотиків, алергічними реакціями на їх введення, підвищенням стійкості до них патогенних мікроорганізмів, а також необхідністю пошуку засобів боротьби зі збудниками, проти яких недостатньо ефективні відомі препарати.

Починаючи з середини ХХ ст. у зв'язку зі зростаючою складністю виділення ефективних антибіотиків і розповсюдження стійкості до широко

вживаних антибіотиків у значній кількості патогенних бактерій, дослідники перейшли від пошуку нових препаратів до модифікації структури вже отриманих.

Таблиця 2

Найважливіші антибіотики терапевтичного призначення

Клас	Типові антибіотики	Продукенти	На кого діє	Механізм дії	Труднощі терапевтичного застосування
β-лактами	Пеніциліни, цефалоспорины	Гриби роду <i>Penicillium</i> , <i>Cephalosporium</i>	Грам-позитивні й грамнегативні бактерії	Порушення синтезу клітинної стінки	Алергичні реакції
Аминоглікозиди	Стрептоміцин, гентаміцин, канаміцин, тобраміцин, амкаціон	Актиноміцети роду <i>Streptomyces</i> , бактерії роду <i>Micromonospora</i> , <i>Bacillus</i>	В основному грамнегативні бактерії	Незворотне припинення синтезу білка	Токсичне дія на слуховий нерв і нирки
Тетрацикліни	Одноменні антибіотики	Актиноміцети роду <i>Streptomyces</i>	Грам-позитивні й грамнегативні бактерії, рикетсії, хламідії, найпростіші	Заторис: подальше синтезу білка	Розвиток стійких штамів
Макроліди	Антибактеріальні: еритроміцин Противіробові і антипротозойні: поліміксин	Актиноміцети роду <i>Streptomyces</i> Те ж саме	Грам-позитивні бактерії Гриби, деякі найпростіші	Те ж саме Порушення плазматичної мембрани	Токсичність
Поліпептиди	Поламіксин, ваніцилін, бацитрацин	Різні мікроорганізми	В основному грамнегативні бактерії	Механізм дії різний	Висока токсичність

Вони прагнули підвищити ефективність антибіотиків, знайти захист їх від інактивації ферментами стійких бактерій і покращити фармакологічні властивості препаратів.

Більшість досліджень було зосереджено на пеніцилінах і цефалоспоринох, структура яких включає чотиричленне β-лактамне кільце, що складається з

трьох атомів вуглецю і одного атома азоту і яке є зручним для модифікації.



9.2 Одержання пеніцилінів

Вперше антибактеріальну дію пеніциліну і можливість його використання як лікувального препарату встановили у 1940 р. А. Флемінг, Х. Флорі і Е. Чейн зі співробітниками Оксфордського університету. Продуктивність лабораторного штаму плісені була на той час 2 мг препарату на 1 л культуральної рідини, що було недостатнім для налагодження промислового виробництва антибіотика.

Продуктивність гриба вдалося збільшити шляхом багаторазового систематичного впливу на нього такими мутагенами, як рентгенівське й ультрафіолетове опромінювання, азотистий іприт у сполученні зі спонтанними мутаціями й відбором найкращих продуцентів. Завдяки цьому концентрація пеніциліну в культуральній рідині була доведена до 2 %, тобто збільшена в 10 тис. разів (20 г/л культуральної рідини).

Метод підвищення продуктивності штамів продуцентів антибіотиків, який ґрунтується на безладних мутаціях, незважаю чи на великі затрати праці й часу, використовується й нині. Це є наслідком того, що біосинтез антибіотика відбувається в

результати сумісної дії 10–30 різних ферментів, кодованих відповідною кількістю генів.

Полігенний механізм, покладений в основу біосинтезу антибіотика, є причиною того, що зміни окремих генів не дають бажаних результатів. Крім того, для багатьох антибіотиків, мікробіологічне виробництво яких налагоджено, молекулярні механізми їх біосинтезу дотепер не з'ясовані.

Для масштабного виробництва пеніциліну G використовують високопродуктивний промисловий штам *Penicillium chrysogenum*, який був одержаний у результаті послідовних циклів мутагенезу і селекції. Вирощують його глибинним методом у ферментерах за допомогою фенілоцтової кислоти, яка є попередником бензильного бокового ланцюга молекули антибіотика.

Інтенсивний синтез пеніциліну розпочинається за наявності великої кількості біомаси міцелію при повному використанні глюкози і молочної кислоти в середовищі, при рН, наближеному до нейтрального. Мікробіологічна стадія при виробництві пеніциліну триває близько 200 год. Після закінчення ферментації культуральну рідину фільтрують, а клітини плісені промивають. З фільтрату і промивок за допомогою бутанолу й іонів калію у спеціальних установках – кристалізаторах одержують кристалічну калієву сіль пеніциліну G (чистота – 99,5 %), яка є вихідним матеріалом для наступних хімічних модифікацій.

У теперішній час пеніцилінові антибіотики становлять найважливішу групу хіміотерапевтичних засобів. Ядром пеніцилінів є 6-амінопеніциланова кислота, або 6-АПК, яку використовують для отримання напівсинтетичних пеніцилінів (Рис. 4).

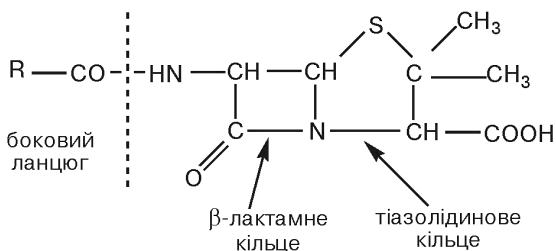


Рис.4 Будова молекули пеніциліну

9.3 Отримання антибіотиків цефалоспоринового ряду

Цефалоспори́ни – друга велика група екстрацелюлярних в-лактамних антибіотиків, у яких шестичленне дигідротіазинове кільце з'єднане з в-лактамним кільцем. Завдяки цьому ядром цефалоспоринів є 7-б-аміноцефалоспоринова кислота або 7-АЦК (цефемове ядро), вперше виділене у процесі очищення цефалоспори́ну С (Рис.5).

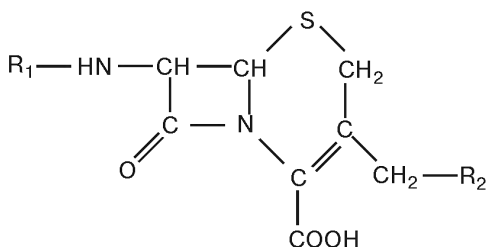


Рис. 5 7-б-аміноцефалоспоринова кислота (7-АЦК)

При виробництві цефалоспоринової С поєднують мікробіологічний метод з подальшою хімічною модифікацією. Як продуцент антибіотика використовується *Cephalosporium acremonium*.

У цього антибіотика поєднується антибактеріальна активність як проти грам-позитивних, так і грам-негативних мікроорганізмів. Проте для досягнення лікувального ефекту потрібні високі концентрації цефалоспоринової С. Він є матеріалом для подальших хімічних модифікацій.

9.4 Модифікація β-лактамних антибіотиків

За декілька десятиліть використання антибіотиків з лікувальною метою нагромадилась велика кількість патогенних мікроорганізмів, які набули спадкової стійкості до препаратів, що раніше викликали їх загибель. Вихід зі складного становища був знайдений завдяки хімічній і ферментативній трансформації природних антибіотиків.

В результаті одержали так звані напівсинтетичні антибіотики, в структуру яких внесені деякі зміни, які не займають основного угруповання атомів, відповідальних за антибіотичний ефект. Таким чином модифікували природні пеніциліни і цефалоспоринової за допомогою іммобілізованого ферменту пеніцилінамідази.

Одержання нових, більш ефективних аналогів пеніцилінової пов'язане зі зміною його бічного ланцюга при збереженні цілісності решти частини, так званого «ядра» антибіотика – 6-амінопеніциланової кислоти.

Це відкрило доступ до широкомасштабного виробництва напівсинтетичних пеніцилінів, стійких в кислому середовищі, які володіють високою активністю по відношенню до великої кількості мікробів, низькою токсичністю, а також стійкістю до ферменту в-лактамази, яка гідролізує лактамне кільце, що призводить до повної втрати антибіотичної активності. Остання властивість дуже важлива, тому що багато мікроорганізмів, які містять в-лактамазу, стійкі до дії бензилпеніциліну і деяких інших пеніцилінів.

Одержання 6-амінопеніциланової кислоти (6-АПК).
Це ключовий продукт синтезу нових пеніцилінів. Похідними 6-АПК є напівсинтетичні пеніциліни. Одержують їх шляхом гідролізу бензилпеніциліну (пеніциліну G).

Оброблений ферментом пеніцилінамідазою, продуцентом якого є спеціальний бактеріальний штам *E. coli*, пеніцилін G в результаті вибіркового видалення з молекули бензильної групи при 37°C у водному середовищі перетворюється на 6-амінопеніциланову кислоту. Другим компонентом, який утворюється в процесі гідролізу, є фенілоцтова кислота:

пеніцилінамідаза

Бензилпеніцилін + H₂O ————— 6АПК + фенілоцтова кислота

На ранніх етапах (1976 р.) 6-АПК одержували шляхом обробки бензилпеніциліну бактеріальною масою *E. coli*, тобто інтактними клітинами, які містять фермент пеніцилінамідазу, що без побічних реакцій розщеплював саме той амідний зв'язок, необхідний для утворення 6-АПК.

В результаті використання іммобілізованих бактеріальних клітин (*E.coli*), які містять пеніцилінамідазу, а потім і самої іммобілізованої пеніцилінамідази, значно підвищилася продуктивність і економічність промислового процесу одержання 6-АПК.

У 1975 р. процес одержання 6-АПК з використанням іммобілізованої пеніцилінамідази впроваджено у тодішньому Радянському Союзі, і це було першим процесом інженерної ензимології.

В кожній країні іммобілізацію проводять різними шляхами. Італійська компанія використовує іммобілізовану пеніцилінамідазу шляхом включення ферменту в порожнисті нитки триацетату целюлози, що забезпечує загальний вихід 6-АПК на рівні 85 % з чистотою 96 %.

За технологією японської компанії «Танабе Сейяку» використовуються іммобілізовані в поліакриламідному гелі цілі бактеріальні клітини (з часом напівінактивації 42 доби при 30 °С або 17 діб при 40 °С). Загальний вихід 6-АПК – приблизно 80 %.

У колишньому СРСР весь об'єм 6-АПК вироблявся за допомогою пеніцилінамідази, іммобілізованої включенням у поліакриламідний гель, модифікований глутаровим альдегідом.

Отримана 6-АПК має слабку антибактеріальну активність і не використовується самостійно як лікувальний засіб.

Однак ядро 6-АПК є зручною основою для модифікацій, в результаті яких при приєднанні бічних груп антибактеріальна активність препарату значно підвищується. Наприклад, при заміні бічних груп

отримали метицилін, стійкий проти інактиваційної дії бактеріальних ферментів, а також ампіцилін, який діє на грампозитивні бактерії.

На сьогодні в різних країнах виробляють біосинтетичні антибіотики і на їх основі-напівсинтетичні антибіотики β -лактами.

З пеніциліну G можна одержати 6-АПК і хімічним шляхом, вдаючись до багатостадійних хімічних перетворень при досить жорстких умовах (низька температура, наявність певних розчинників і видалення із середовища, де відбувається реакція, навіть слідів вологи). Через складність хімічного методу перевагу надають ферментативному, який, крім того, має менше етапів.

Одержання 7-б-аміноцефалоспоринової кислоти (7-АЦК).

Пеніцилінамідازی властива унікальна субстратна специфічність, яка дозволяє здійснювати гідроліз не тільки пеніциліну, але й цефалоспорину, причому відщеплюється тільки бічна група (R_1 або R_2), в-лактаманний цикл лишається незмінним.

Із виробленого мікробіологічним шляхом цефалоспорину С під дією пеніцилінамідازی проводиться елімінація бічного амідного ланцюга і отримується 7-АЦК, яка є ключовою сполукою для синтезу нових цефалоспоринів. Приєднуючи до неї різні бічні ланцюги, отримують активні антибактеріальні напівсинтетичні препарати цефалоспоринового ряду. Відомо більше 20 цефалоспоринів, створених методом напівсинтезу з АЦК: цефалоспоридін (цепорин), цефуроксим,

цефокситин, цефалотин, цефакетрил, цефалексин, цефазолін, цефаридин, цефотаксим тощо.

Нові біотехнології зі створення антибіотиків ґрунтуються на досягненнях молекулярної біології, молекулярної генетики і генетичної інженерії. Розробляються перспективні напрями, що ґрунтуються на знаннях шляхів біосинтезу антибіотиків або їхніх окремих ключових структур. Для створення нової біотехнології масштабного виробництва антибіотиків передбачається використання різних прийомів або напрямів:

1. Генноінженерний напрям передбачає конструювання продуцентів з використанням плазмід *E.coli* як вектора для створення рекомбінантних ДНК. Вони містять гени, які контролюють біосинтез ферментів, які каталізують лімітуючі етапи біосинтезу антибіотика.

2. Виділення лімітуючих реакцій і за допомогою генетичної інженерії конструювання генів «вузьких місць» та одержання відповідного штаму продуцента, який виробляє достатню кількість первинного метаболіту, що раніше лімітував швидкість біосинтезу антибіотика. Реалізація цього прийому дала змогу підвищити продуктивність продуцента цефалоспорину.

3. Введення в геном мікроорганізму інформації про фермент, який необхідний для модифікації продукованого антибіотика, наприклад, його метилювання за допомогою метилаз.

4. Використання сильних індукторів біосинтезу нуклеїнових кислот і білків-ферментів для збільшення концентрації первинних метаболітів, з яких за наявності відповідних ферментів утворюються антибіотики.

5. Збільшення продуктивності продуцентів шляхом використання специфічних ферментів, які визначають перехід мікробної культури із стадії трофофази до ідіофази, а також пригнічують процеси ретроінгібування.
6. Мутаційний біосинтез (мутасинтез). За допомогою мутацій мікроорганізмів одержують штами мутанти, у яких блоковано утворення окремих фрагментів молекули антибіотика. При мутасинтезі відповідні мутантні штами використовують для завершення синтезу антибіотичної молекули. В результаті отримують модифіковані або так звані гібридні антибіотики.
7. Нова технологія, за якої використовуються штами суперпродуцентів антибіотиків, у яких передбачено вдосконалення захисту продуцента від синтезованого ним антибіотика.
8. Використання при виробництві антибіотиків іммобілізованих ферментів, що каталізують як реакції гідролізу, так і синтезу на деяких стадіях виробництва нових пеніцилінів і цефалоспоринів. Перспективним є використання іммобілізованих на полімерному носії цілих клітин продуцентів, що дає змогу здійснити повний синтез антибіотичних препаратів.
9. Багатообіцяючим підходом є інкапсулювання антибіотиків і, зокрема, їх включення в ліпосоми, що дає можливість забезпечити цільову доставку препарату в органи-мішені (хворі органи) і знижує їх побічну дію.
10. Замість антибіотика в організм може вводитися його продуцент, який є антагоністом збудника захворювання. Цей підхід бере початок з робіт І.І. Мечникова про пригнічення гнильної мікрофлори в товстому

кишечнику людини за допомогою молочнокислих бактерій.

Так, виникненню карієсу зубів сприяє дикий патогенний штам бактерії *Streptococcus mutans*, який знаходиться в ротовій порожнині. Він виділяє кислоти, які руйнують зубну емаль і дентин. Одержаний мутантний штам цього виду бактерії, який при введенні в ротову порожнину не утворює корозивних кислот, витісняє дикий патогенний штам і виділяє летальний для нього білковий продукт.

10. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ СПОСОБИ ВИРОБНИЦТВА ГОРМОНІВ

10.1 Загальний підхід

Біотехнологія сприяє розвитку нових шляхів у медицині щодо одержання таких цінних біологічно активних речовин, як гормональні препарати. В організмі людини і тварини виробляються десятки різних сполук, які беруть участь в гормональній регуляції росту, розвитку й обміну речовин. Неабиякий розвиток відбувся в напрямі синтезу пептидних гормонів, побудованих із порівняно невеликої кількості ланок – від кількох амінокислотних залишків до декількох десятків.

До них належать гіпоталамічні фактори, деякі гіпофізарні гормони, гормони щитовидної залози, гормони підшлункової залози і кишечника, нейропептиди. В ендокринних клітинах гормони даної групи утворюються зі значно більших попередників шляхом специфічного ферментативного розщеплення чітко визначених пептидних зв'язків.

Гормони росту і пролактин побудовані з більшої кількості амінокислотних залишків (приблизно 190–195) і утворюються в результаті відщеплення від їх попередників – прегормонів N-кінцевого пептиду, який називають «сигнальним», розміром близько 25 амінокислотних залишків.

Раніше пептидні гормони, необхідні для медицини, виділяли в основному з органів і тканин тварини та людини (крові донорів, видалених при операціях органів, трупного матеріалу, органів після

забою тварин тощо). Із органів тварин одержували гормони для застосування у випадках, коли гормон не має вираженої видової специфічності.

Єдиним джерелом одержання гормонів з надто вираженою видовою специфічністю, наприклад соматотропіну людини (гормону росту), був трупний матеріал. Для одержання невеликої кількості гормонального препарату необхідно багато матеріалу (сировини).

Перші успіхи генетичної інженерії дали надію на те, що з часом можна буде використовувати клітини мікроорганізмів для виробництва будь-яких продуктів білкової природи шляхом введення в їх геном генів, які кодують ці білки, і створення умов для їх експресії.

Розробляючи нові технології виробництва гормонів з використанням плазмід, головною метою було створити (сконструювати) рекомбінантні молекули ДНК, які містять нуклеотидні послідовності, що програмують синтез певних гормонів, ввести їх у бактерію і змусити продукувати ці гормони.

Технологія одержання гормонів за допомогою рекомбінантних ДНК включає такі етапи:

- 1) одержання генетичного матеріалу (генів);
- 2) введення генетичного матеріалу в генетичний апарат бактеріальної клітини і створення умов для його експресії.

Одержання генів. Необхідний генетичний матеріал (ген або групу генів) для їх подальшого примноження методами генетичної інженерії з метою синтезу біологічно активних білків, що кодуються цими генами, можна досягнути трьома різними методами:

- 1) виділенням його з ДНК;
- 2) хіміко-ферментативним синтезом;
- 3) ферментативним або матричним синтезом на основі виділеної з клітини матричної РНК (мРНК).

Перший метод полягає в тому, що з природного генетичного матеріалу – ДНК – за допомогою відповідних ферментів (рестрикційних ендонуклеаз) «вирізають» потрібний ген. Цей підхід має суттєві недоліки.

По-перше, важко підібрати дію ферментів таким чином, щоб вирізати з ДНК необхідний ген. Як правило, разом з геном залишаються «по боках» зайві нуклеотидні послідовності, що заважає наступному використанню одержаного гена, або, навпаки, ферменти відрізають частину гена, що робить його функціонально неповноцінним.

По-друге, гени еукаріотичних організмів мають складну «мозаїчну» (екзонінтронну) будову, що в подальшому при розмноженні в мікроорганізмах може перешкоджати їх нормальному функціонуванню, тому що в бактеріях не відбувається видалення зайвих частин (інтронів). Тому цей прийом виділення генів краще спрацьовує стосовно вірусів і бактерій, але не еукаріот.

По-третє, якщо ген становить незначну частку від цієї ДНК, з якої його виділяють, то можуть виникнути серйозні труднощі щодо його ізоляції та ідентифікації.

Другий метод полягає у хіміко-ферментативному синтезі гена, якщо відома первинна структура того білка або поліпептида, який кодується синтезованим геном. Він є важливою альтернативою «вирізанню»

генів за допомогою рестриктаз із нативної ДНК. Метод включає хімічний синтез коротких (8–16 нуклеотидних) одноланцюгових фрагментів ДНК за рахунок поетапного утворення ефірних зв'язків між нуклеотидами і зшивання олігонуклеотидів між собою за допомогою ДНК-лігازی з утворенням дволанцюгових полінуклеотидів.

Хіміко-ферментативний синтез дає змогу точно відтворити мінімально необхідну послідовність нуклеотидів і уникнути проблем, пов'язаних з елімінуванням зайвих нуклеотидних по слідовностей у фрагментах ДНК, в т. ч. інтронів. Метод трудомісткий і дорогий. Методом хіміко-ферментативного синтезу одержані гени соматостатину, А і В-ланцюгів інсуліну, проінсуліну, lac-оперон *E.coli* тощо.

Третій метод одержання генів матричним синтезом найбільш розповсюджений і є основним джерелом генів, які потім розмножуються у формі рекомбінантних ДНК в одноклітинних організмах, а інколи і в багатоклітинних. Суть методу полягає в одержанні генів шляхом їх ферментативного синтезу і коротко зводиться до наступного.

Спочатку із клітин виділяють матричні (інформаційні) РНК (мРНК), серед яких присутня мРНК, що кодується геном, який потрібно виділити. Потім у спеціальних умовах здійснюють РНК-направляючий синтез ДНК (одноланцюгової), який каталізується ферментом зворотною транскриптазою (ревертазою). Після завершення реакції синтезовану одноланцюгову ДНК (яку називають комплементарною ДНК, кДНК) очищують і використовують як матрицю

для другої реакції – ДНК-залежного синтезу другої нитки ДНК.

Це стало можливо завдяки відкриттю у 1970 році (США) ферменту зворотної транскриптази, головною властивістю якої є здатність здійснювати синтез, зворотний тому, який проходить при транскрипції – синтез мРНК на матриці ДНК. Це стало науковою сенсацією і спростувало «центральною догмою» молекулярної біології, яка стверджувала, що передача генетичної інформації три ває тільки в одному напрямі: ДНК → РНК → білок.

Ступінь копіювання мРНК в ДНК, тобто повнота синтезу однієї з ниток гена, що синтезується, залежить від відсутності у препаратах мРНК і ферменту домішок, які могли б руйнувати мРНК або ДНК – продукт синтезу. Тому успішне проведення реакції синтезу залежить від ідеального очищення усіх компонентів.

Введення гена в бактеріальну клітину. В подальшому клонування генів відбувається за наступною схемою. Кільцеподібну молекулу вектора (частіше плазмиду *E. coli*) розрізають ферментами рестриктазами у специфічній ділянці в обох ланцюгах ДНК, перетворюючи його із кільцевої на лінійну форму. До лінійної ДНК за допомогою ферменту ДНК-лігази (ligation – зшивання) «пришивають» ген (або гени) і потім знову замикають її у кільце за допомогою тієї ж ДНК-лігази. Одержану рекомбінантну ДНК вводять у клітину *E. coli*, котра розмножуючись, утворює клон, усі клітини якого містять рекомбінантну ДНК (плазмиду), а тому і чужорідний ген. Останній,

тепер клонований у клітинах кишкової палички, індукує в них біосинтез відповідного білка (продукту).

10.2 Отримання інсуліну

Інсулін – гормон острівків Лангерганса підшлункової залози, який регулює процеси вуглеводного обміну і підтримки нормального рівня цукру в крові. Недостатня кількість цього гормону в організмі зумовлює виникнення одного з найважчих захворювань – цукрового діабету. У світі понад мільйони людей страждають на цей недуг, який знаходиться на третьому місці після серцево-судинних та онкологічних захворювань.

Інсулін – це невеликий глобулярний білок, що містить 51 амінокислотних залишків, послідовність яких була встановлена Сенгером у 1955 р. Він складається з двох поліпептидних ланцюгів А і В (відповідно 21 і 30 амінокислот), зв'язаних між собою двома дисульфідними мітками. Синтезується інсулін на рибосомах в в-клітинах острівків Лангерганса підшлункової залози у вигляді одноланцюгового попередника – препроінсуліну довжиною в 109 амінокислот.

Перші 23 амінокислоти є сигналом для проходження молекули інсуліну крізь мембрану клітини. Вони відщеплюються, в результаті чого утворюється проінсулін довжиною 86 амінокислотних залишків. Молекула проінсуліну обертається таким чином, що початковий і кінцевий її сегменти зближуються, а центральна частина молекули відділяється під дією ферментів. Роль останньої

полягає у правильному взаємному розміщенні двох ланцюгів інсуліну.

Традиційні шляхи отримання інсуліну.

Вперше в 1921 р. Бантінг і Бест у Торонто виділили з підшлункової залози собаки гормон, який виявляв антидіабетичний ефект, а вже в 1922 р. інсулін, виділений з тварин, був введений людині (дев'ятирічному хлопчику, хворому на діабет) і мав надзвичайний ефект. Вже через рік американська компанія «Елі Ліллі» випустила перший препарат тваринного інсуліну.

В 1935 р. датський дослідник Хагедорн досягнув оптимізації дії інсуліну в організмі, розробивши препарат інсуліну пролонгованої дії. Його поглинання було сповільнено додаванням протаміну, а потім і цинку. В 1946 р. датські дослідники одержали нейтральний інсулін (NPH), який почали широко використовувати в інсулінотерапії. Перші кристали інсуліну були одержані в 1952 р., а розвиток методів очищення гормону (імуно-електрофорезу і рідинної хроматографії) від інших гормональних речовин та різних продуктів деградації інсуліну дозволив одержати гомогенний інсулін, який називають однокомпонентним.

Гормон не має чіткої видової специфічності, і тому тваринний інсулін може використовуватися для лікування людей. Сировиною для одержання тваринного інсуліну є підшлункова залоза великої рогатої худоби і свиней, яка не використовується в м'ясній і консервній промисловості і постачається м'ясокомбінатами. Підшлункова залоза корови має

масу 200–250 г, а для одержання 100 г кристалічного інсуліну потрібно 800–1 000 кг вихідної сировини.

Враховуючи те, що кількість інсулінозалежних людей постійно збільшується, інсуліну, одержаного від вищезазначених тварин, недостатньо. Крім цього, тваринний інсулін відрізняється від людського на 1–3 амінокислотних залишки і може викликати різні алергічні реакції, а при тривалому використанні викликає порушення роботи нирок і розлади зору. Найбільш прийнятним до людського є інсулін свині.

Широкомасштабне терапевтичне використання інсуліну стримувалось його високою вартістю, обмеженістю ресурсів і різноманітними ускладненнями. Тому й виникла необхідність у виробництві бактеріально продукованого людського інсуліну.

Сучасні технології одержання інсуліну

Невелику молекулу інсуліну можна синтезувати штучно, приєднуючи одну амінокислоту за іншою. Але це дуже дорогий і складний синтез, з майже 170 хімічними реакціями. Він був проведений у 1963 і 1965 роках у США, Китаї і Німеччині (ФРН).

Простіше було одержувати інсулін людини шляхом модифікації інсуліну свині, хімічно замінивши в ньому 30-ту амінокислоту (ланцюга В) аланін на треонін. Цей метод був розроблено у Данії компанією «Ново індастрі» у 1980 р. В результаті був отриманий однокомпонентний інсулін людини 99 % чистоти. Порівняльне дослідження обох інсулінів (людського і свиного) показали, що вони не відрізнялися між собою за активністю і тривалістю дії. І в 1982 р. цей інсулін

промислово виробляли в основному дві компанії: «Елі Ліллі» (збут у США) і «Ново індастрі» (збут у Європі).

Роботи щодо генно-інженерного методу одержання інсуліну розвивалися швидкими темпами. В 1978 р. у США з'явилося повідомлення про одержання штама *E. coli*, який продукує щурячий інсулін. В тому ж таки 1978 р. компанія «Генентек» (США) одержала інсулін людини у спеціально сконструйованому штамі кишкової палички. Виробництво інсуліну в бактеріальних клітинах не залежить від постачання сировини, а одержаний інсулін при тривалому використанні не викликає негативних наслідків (порушення роботи нирок, розладів зору та алергічних реакцій).

Було випробувано декілька методів генетичної інженерії для одержання інсуліну. В деяких країнах (США) пішли шляхом синтезу ДНК (гена) на матриці іРНК інсуліну, тобто одержання копії ДНК (кДНК). В інших (Канада, СРСР) – шляхом хімічного синтезу двох коротких ДНК (генів), які кодують обидва ланцюги (А та В) готового інсуліну, з подальшим синтезом кишковою паличкою (*E. coli*) його А і В-ланцюгів.

У 1980 р. в США з людських тканин була виділена мРНК інсуліну, з якої шляхом зворотної транскрипції була синтезована її ДНК – копія (кДНК) і в клітинах *E. coli* був клонований ген людського проінсуліну. Поряд з цим у Канаді здійснено повний хіміко-ферментативний синтез гена проінсуліну.

У 1979 р. Креа, Крашевські, Хіроуз і Ітакура з Національно гомедичного центру «Хоуп» (Каліфорнія) і Геддель зі співробітниками компанії «Генентек»

здійснили синтез генів, які кодують А і В-ланцюги інсуліну. Кожен ген був зібраний відповідно із 18 і 11 олігонуклеотидів. Однак виявилось, що коли короткі ланцюжки чужорідного білка синтезуються в бактерії *E.coli*, вони руйнуються її протеолітичними ферментами. Щоб уникнути цього, ДНК (ген), який кодує кожний ланцюг інсуліну, пришивали за допомогою лігази до гена бактеріального ферменту галактозидази, розділивши їх кодоном, який кодує метіонін. В результаті в бактерії синтезувався великий білок, який складався із бактеріального ферменту і гормону. Їх розділяли один від одного хімічно, розрізаючи білок по метіоніну, відщеплювали від ферменту, проводили очищення, а ланцюги з'єднували *in vitro* для одержання повної молекули інсуліну.

У Радянському Союзі в Інституті біоорганічної хімії ген проінсуліну був одержаний методом тотального хіміко-ферментативного синтезу (Рис. 6). Цей підхід мав певні переваги: по-перше, можна безпосередньо одержати необхідну послідовність ДНК; по-друге, хімічний синтез виключає найважчу частину роботи при одержанні гена із природного джерела – виділення відповідної мРНК або геномної ДНК; по-третє, він спрощує модифікацію гена і одержаного з нього білка.

Цей метод одержання гена проінсуліну проходить у два етапи. На першому етапі відбувається хімічний синтез понад 40 олігонуклеотидів – сегментів, з яких складається весь ген. На другому етапі проходить збір хімічно синтезованих сегментів за допомогою ДНК-лігази. Потім ген вводиться у

плазмиду кишкової палички, яка продукує проінсулін, що конверсується в активний інсулін.

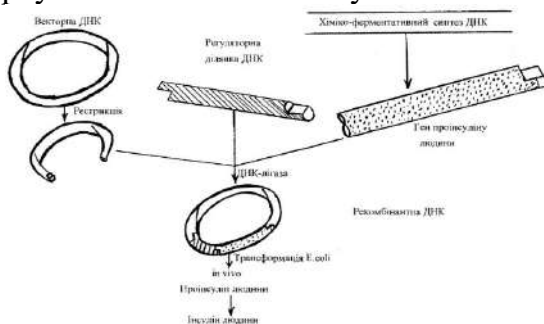


Рис. 6 Схема отримання інсуліну людини мікробіологічним шляхом

Виявилось, що вихід інсуліну можна збільшити шляхом введення в одну бактеріальну клітину декількох копій рекомбінантної плазмиди. В Англії у Центрі прикладної мікробіології був одержаний таким чином високий вихід інсуліну — до 200 г з 1000 л культурального середовища. Ця кількість еквівалентна кількості інсуліну, виділеного приблизно з 1600 кг підшлункової залози свині або корови.

10.3 Отримання соматотропіну

Гормон росту людини (ГРЛ) або соматотропін — це поліпептидний гормон, який секретується передньою долею гіпофізу і складається із 191 амінокислотного залишку. Однак синтезується він більшого розміру разом з «сигнальною послідовністю», яка вилучається у процесі секреції гормону із клітини.

Вперше соматотропін був виділений і очищений у 1963 р. з гіпофізу, одержаного із трупного матеріалу.

Недостатня кількість цього гормону в організмі людини призводить до гіпофізарної карликовості.

Гормон має видову специфічність, тому для лікування не можуть використовуватись аналоги, одержані від тварин. Для одержання лікувального ефекту введення гормону необхідно продовжувати від 4–5-річного віку дитини і до статевої зрілості і навіть довше. А з одного трупа можна одержати тільки 4–6 мг соматотропіну. Натомість для лікування однієї дитини, яка страждає на гіпофізарну карликовість, необхідно 7 мг соматотропіну на тиждень. Наприклад, у США в 1981р. з трупів вилучали до 60 тис. гіпофізів на рік і їх вистачало на лікування 1500 дітей — тільки на третину хворих дітей. Дефіцит соматотропіну збільшується, якщо врахувати й інші випадки використання цього гормону — при незаживаючих переломах (удавані суглоби), опіки, язви і порушення гемопоезу.

Соматотропін з кальцитоніном (гормоном щитовидної залози) регулює обмін Ca^{+} в кістковій тканині.

Отже, доступна кількість соматотропіну, одержаного традиційним шляхом, була обмежена і не задовольняла попит. Хімічний же синтез гормону дуже складний через великий розмір його молекули.

Перспективним став генно-інженерний метод одержання соматотропіну. Вперше біотехнологічний гормон одержали в 1980 р. у лабораторії, а в 1985 р. – у промисловому масштабі. В США фірмою «Генентек» був отриманий «квазісинтетичний» ген соматотропіну, побудований з двох частин, синтезованих різними методами.

На першому етапі ензиматичним методом синтезували фрагмент кДНК (комплементарна ДНК — ензиматично синтезована двониткова ДНК — копія інформаційної або матричної РНК). Цей фрагмент гена кодує усю амінокислотну послідовність N-кінцевої частини соматотропіну, за винятком перших 23 амінокислот. Цю частину гена синтезували хімічним шляхом. Потім обидва фрагменти гена зшивали, вмонтували у плазмідну *E. coli* і переносили у клітину бактерії для клонування. Кінцевий вихід соматотропіну становив 2,4 мкг на 1 мл культуральної рідини.

Синтезований у бактеріях гормон має необхідну молекулярну масу і не зв'язаний з будь-яким бактеріальним білком, від якого необхідно було б його відщеплювати. Єдиною структурною відмінністю гормону росту бактеріального походження від аутентичного соматотропіну є наявність залишку метіоніну на N-кінці поліпептидного ланцюга, отриманого в умовах мікробіологічного синтезу. Хоча синтез будь-якого поліпептидного ланцюга і в клітинах бактерій, і в клітинах еукаріот починається з метіоніну (або формілметіоніну), але в результаті процесингу білка є можливість виділити його N-кінцеву частину, що веде до елімінації термінального метіоніну.

Це явище проходить при формуванні зрілого соматотропіну шляхом елімінації його сигнальної послідовності в клітинах тварин, тоді як соматотропін бактеріального походження відразу синтезується у формі зрілого білка, де метіонін знаходиться в N-кінцевому положенні. Свого часу висловлювались припущення, що цей зайвий метіонін може впливати на

фізіологічну активність препаратів бактеріального походження або підвищувати їх імуногенність.

Однак в подальшому було встановлено, що гормональні активності соматотропіну мікробного та природного походження ідентичні. Крім того, в препаратах генно-інженерного соматотропіну міститься менша кількість неактивного димерізованого гормону та продуктів його деградації, що підвищує питому активність препарату.

Підвищена активність метіонільованого соматотропіну обумовлена не присутністю N-кінцевої метіонінової групи, а невеликими домішками бактеріального білка, який відіграє роль своєрідного ад'юванту та підвищує імуногенність препарату.

В СРСР в Інституті молекулярної біології був одержаний ген соматотропіну без «сигнальної послідовності» пептиду прегормону. Таким шляхом одержали з 1 л суспензії рекомбінантних клітин *E. coli* за 7 год. стільки гормону, скільки міститься в 60 гіпофізах людини. Клінічні випробування біотехнологічного соматотропіну у хворих дітей показали збільшення росту дітей на 8–18 см за рік.

Недоліком традиційно отриманого соматотропіну є недостатня його кількість, яка не задовольняє попит. Є й інші проблеми, пов'язані з гетерогенністю гормону, який виділяється з трупного матеріалу. Це суміш з декількох форм, тому викликає у 30 % пацієнтів алергічні реакції. Існує також небезпека, що гіпофізарний матеріал заражений вірусами, що повільно розвиваються, внаслідок чого діти, які отримували препарат, потребували тривалого медичного спостереження.

Соматотропін, одержаний біотехнологічним методом за допомогою технологій рекомбінантних ДНК, має переваги над традиційно отриманим гормоном: він доступний у великих кількостях; його препарати є біохімічно чистими і вільними від вірусних забруднень. Використання біотехнологічного соматотропіну значно знижує вартість лікування.

11. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ СПОСОБИ ВИРОБНИЦТВА ІНТЕРФЕРОНІВ

Вперше інтерферон був отриманий у 1957 р. Айзексом і Лінденманном у Національному інституті медичних досліджень в Англії. Дослідники виявили, що клітини тварин, які піддалися впливу вірусу, виділяють у середовище фактор, який здатний надавати свіжим, необробленим вірусом клітинам стійкість до вірусної інфекції. Фактор перешкоджав (інтерферував) розмноженню вірусів у клітині і отримав назву інтерферон. Це відкриття сприяло успішній боротьбі з вірусними інфекціями.

Інтерферони – білки, до складу поліпептидного ланцюга яких входить 146–166 амінокислотних залишків. Вони синтезуються клітинами хребетних у відповідь на вірусну інфекцію і забезпечують неспецифічний противірусний імунітет. Біосинтез інтерферону як відповідь на проникнення вірусної інфекції є однією з реакцій організму, яка найшвидше реалізується і значно випереджає реакції імунної відповіді. Фактично інтерферони є першою лінією оборони проти вірусної атаки.

За даними медичної статистики, серед інфекційних захворювань майже 95 % становить вірусна патологія. Ветеринарна практика підтверджує цю закономірність.

Значний інтерес до препаратів інтерферонів викликаний тим, що практичні медицина і ветеринарія

не мають достатньої кількості ефективних етіотропних засобів профілактики і лікування вірусних інфекцій.

Крім антивірусної дії і посилюючого впливу на імунітет, інтерферони гальмують розмноження аномальних клітин, і тому використовуються як протипухлинний засіб для лікування раку. Вони є імуномодуляторами і, виступаючи при цьому регуляторами імунологічних реакцій, проявляють антимікробну властивість і радіозахисну дію.

Визначено стимулюючий вплив інтерферону на фагоцитоз і неспецифічну резистентність клітин. Загальна імунологічна реактивність організму, як правило, відповідає рівню утворення інтерферонів. Під впливом інтерферонів підвищується цитотоксичність кілерних клітин і збільшується їх кількість.

Інтерферони є відносно нешкідливими для організму в концентраціях, які забезпечують лікувальний ефект, хоча механізм дії інтерферонів і їхня біологічна роль ще недостатньо з'ясовані.

Інтерферон утворюється не тільки в організмі людини, але й в багатьох інших хребетних. Але він має видову специфічність і тому інтерферони тварин не вдається використовувати для лікування людини.

Розрізняють три класи інтерферонів: лейкоцитарний (б-інтерферон), фібробластний (в-інтерферон) та імунний (г-інтерферон).

1) б-інтерферон синтезується лейкоцитами під час дії на них вірусу. Він має майже 20 рекомбінантних варіантів (А, В, С, D, Е, F тощо), які відрізняються набором і послідовністю амінокислот у поліпептидному ланцюгу, а також біологічною активністю.

2) в-інтерферон утворюється фібробластами сполучної тканини під впливом вірусу.

3) г-інтерферон – його біосинтез відбувається у сенсibiliзованих Т-лімфоцитах у відповідь на вплив мітогенів, бактеріальних і вірусних антигенів, антисироваток проти поверхневих детермінант лімфоцитів. У в- і г-інтерферонів рекомбінантних варіантів не виявлено.

Класи інтерферонів відрізняються структурою молекул, деякими біологічними властивостями і типом клітин, які їх продукують в організмі. Так, клас в-інтерферонів складається з декількох білків і число генів, які кодують ці білки, наближається до 20; г-інтерферон представлений індивідуальним білком, якому відповідає один ген. Поки що виділений один ген, який відповідає в-інтерферону людини, – це інтерферон v_1 . Цьому білку відповідає практично вся противірусна активність, яка виявляється після індукції фібробластів. в- і г-інтерферони зв'язані з залишками глюкози (гліколізовані), тоді як у б-інтерферону не виявлено моноцукристичних залишків.

Крім трьох класів, розрізняють два типи інтерферонів. б- і в-інтерферони належать до першого типу і є так званими вірус-індукованими. Імунний, або г-інтерферон, належить до другого типу, індукція біосинтезу якого забезпечується іншими речовинами (білок А-ентеротоксин стафілококів, антигени тощо).

Традиційні шляхи отримання інтерферонів

Процес отримання інтерферону в основному однаковий для всіх типів клітин, які вирощуються в культурі й утворюють інтерферон. Клітини найчастіше

заражають вірусом Сендай або хвороби Ньюкасла і через 24 години центрифугують. Із надосадової рідини одержують грубий препарат інтерферону, який піддають очищенню.

Отримання б-інтерферону. У Фінляндії було налагоджено виробництво і випробування препаратів б-інтерферону, який отримували із лейкоцитів донорської крові, як індуктор використовували вірус Сендай або вірус хвороби Ньюкасла. Але ефективність виробництва інтерферону шляхом простого виділення дуже низька. Із 250 л крові (її можна отримати від 500–1000 донорів) одержували 0,25–0,5 мг чистого б-інтерферону, якого достатньо для лікування 50 чоловік при легкій формі захворювання і лише однієї людини при важкій формі.

Технологія виробництва інтерферонів з лейкоцитів крові набула розповсюдження, але вона не могла повністю задовольнити потребу в цьому препараті через недоліки:

- обмеженість сировинних ресурсів (донорської крові);
- нормальні, тобто неракові лейкоцити не вдається культивувати, внаслідок чого масове виробництво інтерферонів заскладне;
- чистота кінцевого продукту незадовільна, тому що отри мується суміш б-інтерферонів;
- висока собівартість виробленого продукту.

Вченими Франції та Ізраїлю була розроблена установка для виділення інтерферону з лейкоцитів людей, хворих на хронічний мієлоїдний лейкоз і оброблених вірусом Сендай. В результаті вихід інтерферону був значно вищий, ніж при використанні

нормальних лейкоцитів. Однак через те, що метод ґрунтується на культивуванні ракових клітин, сфера використання одержаного інтерферону обмежена.

Фібробластний інтерферон (в-інтерферон) синтезується фібробластами (клітинами сполучної тканини), які одержують із тканин плода або з матеріалу передньої плоті при обрізанні немовлят, після обробки їх вірусом Сендай.

Фібробласти можна культивувати, тому вони придатні для масового виробництва інтерферону. Це простіше, ніж отримувати його з лейкоцитів. Але метод має недоліки: у ємностях з культурою фібробласти утворюють плівку товщиною в одну клітину, що обмежує вихід інтерферону. Його вдається підвищити введенням в культуральне середовище мікроскопічних гранул, до яких приєднуються клітини.

Із культури фібробластів вихід в-інтерферону вищий, але теж дорогий.

Імунний, або г-інтерферон синтезується Т-лімфоцитами. Його утворення індукується багатьма речовинами. В Техаському університеті шляхом стимуляції лімфоцитів білком А (ентеротоксином) стафілококів було одержано вихід в 1000 одиниць г-інтерферону на 1 млн клітин.

Англійська фірма «Велкам» одержувала інтерферон із лімфобластоїдних клітин, взятих у новонароджених хом'ячків. В США одержували інтерферон з культури лімфоцитів донорської крові, стимульованих мітотичним агентом.

В цілому жоден метод одержання інтерферонів усіх трьох класів не міг задовольнити попиту через низький вихід продуктів; їх високу вартість (вартість

промислового одержання сягає 40–50 дол. за 1 млн одиниць), а чистота препаратів недостатня.

Тому в усіх країнах було розпочато роботи, спрямовані на застосування методів генетичної інженерії для виробництва відносно дешевого інтерферону в кількостях, які давали б змогу задовольнити попит на нього.

Генно-інженерний метод одержання інтерферонів.

Розробка біотехнології виробництва інтерферону була складним і багатоетапним процесом. Досліди з перенесення генів інтерферонів людини в бактеріальні клітини були розпочаті наприкінці 1977 – на початку 1978 рр. майже одночасно групами дослідників у Швейцарії, Японії, США, а також у Радянському Союзі.

Але на початок досліджень не було відомостей про структуру білка (інтерферону), що не давало змоги отримати ген шляхом хімічного синтезу. Крім цього, в суміші іРНК (мРНК), які кодують різні білки, частка інтерференової мРНК невелика – приблизно 0,1 %, що ускладнювало роботу з її виділення. Для клонування гена інтерферону усі дослідники користувалися методом зворотної транскрипції мРНК інтерферону.

За короткий проміжок часу (1979–1982 рр.) гени лейкоцитарних, фібробластного й імунного інтерферонів були клоновані в *E. coli*. Була отримана достатня інформація про структуру інтерферонів та їх генів. Встановлено, що інтерферони синтезуються на першій стадії у вигляді попередників, що містять на N–кінці поліпептидного ланцюга сигнальний пептид, який потім відщеплюється і в результаті утворюється зрілий

інтерферон, котрий наділений повною біологічною активністю.

Першим був клонований ген фібробластного інтерферону у складі гібридної плазміди в клітинах *E.coli* (Японія) у 1979 р. Визначення нуклеотидної послідовності показало, що в-інтерферон синтезується в клітині у вигляді поліпептиду розміром у 187 амінокислот – преінтерферону. У процесі секреції преінтерферону з клітини від нього відщеплюється сигнальний пептид, який складається з 21 амінокислоти. Зрілий в-інтерферон містить 166 амінокислот.

У 1980 і 1982 рр. були клоновані гени б- і г-інтерферонів. Довжина поліпептидного ланцюга проінтерферонів складає відповідно 189 і 166 амінокислотних залишків, а зрілі інтерферони – 166 і 146 амінокислот. Сигнальний пептид містить відповідно 23 і 20 амінокислот.

У колишньому Радянському Союзі перше успішне клонування гена лейкоцитарного інтерферону було здійснено у 1982 р., фібробластного – у 1983 р. та імунного – у 1985 р.

Конструювання штамів продуцентів інтерферонів та технологія одержання генів є дуже складним і багатоетапним процесом. Найчастіше ген інтерферонів отримують шляхом зворотної транскрипції – передачі інформації від структури мРНК до структури ДНК (Рис. 7). Виділену із донорської крові суспензію лейкоцитів обробляють вірусом Сендай, який індукує біосинтез інтерферонів. В них видаляють іРНК, яка несе інформацію (кодує) про синтез інтерферонів. За допомогою ферментів

зворотної транскрипції – ревертази або зворотної транскриптази на основі матриці іРНК синтезується комплементарна щодо неї копія ДНК (кДНК) одноланцюгова. Утворюється комплекс ДНК–РНК.

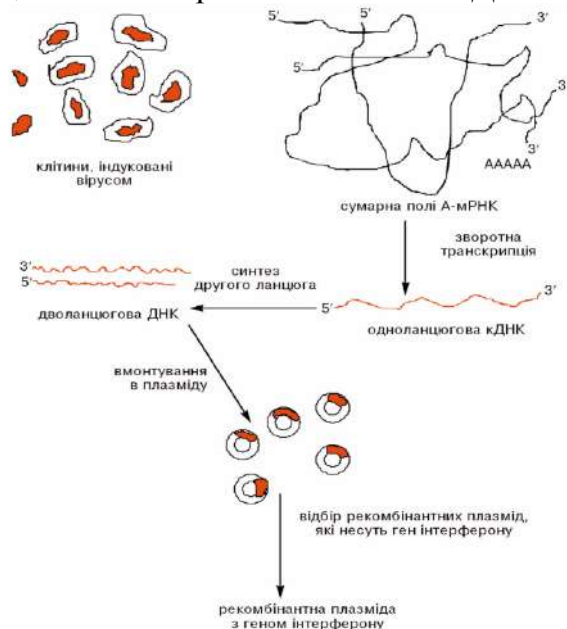


Рис. 7 Схема клонування генів інтерферону людини

На наступному етапі одноланцюгову кДНК відділяють від структури ДНК–РНК і на ній здійснюють синтез другої комплементарної нитки ДНК. Одержують дволанцюгову ДНК (ген). Щоб забезпечити у синтезованій кДНК комплементарність липких кінців, до них приєднують лінкери (перехідники), які є синтезованими хімічним шляхом ділянками ДНК, що мають липкі кінці.

Ген виділеного інтерферону, крім структурного гена, включає промоторну ділянку, оператор і ділянку зв'язування рибосоми (ініціації синтезу білка) і складається майже з 1,2 тис. нуклеотидів.

У колишньому Радянському Союзі і в Англії труднощі виділення гена інтерферону були подолані іншим шляхом. Ген інтерферону синтезували хімічним шляхом, приєднуючи один нуклеотид за іншим. Велику молекулу такого штучного гена, який складається з 514 нуклеотидів, збирали з 8 окремо синтезованих фрагментів. Ця робота зайняла стільки ж часу, скільки виділення гена інтерферону.

Гени б-інтерферонів можуть бути безпосередньо вилучені із геному людини, тому що вони не містять інтронів.

Експресія генів інтерферонів у клітинах. Для одержання значних кількостей гомогенних препаратів інтерферону, необхідних для широкого клінічного застосування та наукових досліджень, було здійснено численні і успішні спроби створення штамів продуцентів на базі різних мікроорганізмів.

Найбільший обсяг робіт було здійснено на бактерії *E. coli*.

Для того щоб забезпечити синтез чужорідного білка (у конкретному випадку інтерферону) в бактерії, необхідно:

- 1) ввести ген цього білка у векторну бактеріальну ДНК, наприклад, плазмиду;
- 2) приєднати до цього гена бактеріальні регуляторні елементи, які програмують його транскрипцію і трансляцію у бактерії.

Введення гена інтерферону в плазмід, вилучену з *E. coli*, відбувається аналогічно до гена інсуліну, соматотропіну тощо. Проводиться обробка рестрикційною ендонуклеазою (рестриктазою) кінців кДНК, а також плазмід, яка в результаті набуває лінійної форми з липкими кінцями. Це дозволяє приєднати кДНК до плазмід і за допомогою ДНКлігази утворити кільцевидну рекомбінантну плазмід з синтезованою кДНК, в якій є ген, що кодує біосинтез інтерферону. Потім рекомбінантну плазмід вводять у бактеріальну клітину.

Експресія будь-якого еукаріотичного гена з метою одержання білка вимагає використання структурної частини гена в поєднанні з відповідними нуклеотидними послідовностями, які розпізнаються ферментами клітини-господаря як ефективні сигнали ініціації транскрипції і трансляції (Рис. 8).

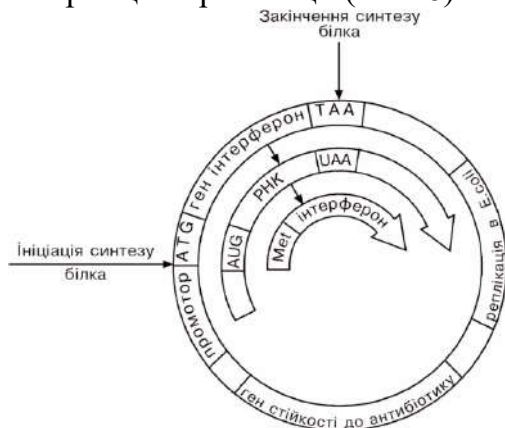


Рис. 8 Схема рекомбінантної плазмід, яка обумовлює синтез інтерферону людини в *E. coli*

Для експресії генів інтерферонів у клітинах *E. coli* широко застосовують регуляторні елементи триптофанового (*trp*) і лактозного (*lac*) оперонів.

Складним є також процес виділення інтерферону, який накопичується у бактеріальній клітині. Кишкова паличка «не вміє» секретувати білки, і необхідний білок потрібно виділяти та очищати від усієї маси білка бактерії.

Для цього використовуються моноклональні антитіла до інтерферону, тобто імуноглобулін, який зв'язувався тільки з б-інтерфероном. Ці антитіла пришивали до поліцукричних кульок, через які пропускали суміш білків. У результаті інтерферон захоплювався антитілами і утримувався на кульках. Потім його змивали і отримували готовий препарат, який у 5 000 разів краще очищений, ніж вихідний.

Таким складним і багатоетапним шляхом у колишньому Радянському Союзі був одержаний продуктивний штам – продуцент *E.coli*: 1 л суспензії цих бактерій давав понад 10 мг б-інтерферону, тобто в 5000 разів більше, ніж одержували з 1 л крові донорів.

Бактерії, які містять таку плазмиду, синтезують інтерферон і стійкі до дії антибіотиків.

Аналогічним шляхом нині продукуються й інші класи інтерферонів – в і г, а також гібридний інтерферон, який складений з половинок молекул різних інтерферонів.

Однак інтерферон, синтезований у бактеріях, не містить необхідних за нормою вуглеводних груп, приєднаних до білка, тобто неглікозильований. Це наслідок того, що в клітинах прокаріот немає відповідних ферментів глікозильовання.

У 1981 р. у США був синтезований лейкоцитарний інтерферон з використанням генетично сконструйованої клітини дріжджів. Згодом таким методом були одержані в- і г-інтерферони. Гени цих інтерферонів у складі рекомбінантної ДНК, введені в дріжджову клітину (найчастіше *Sacharomyces cerevisiae*), дають змогу у 10 разів інтенсифікувати біосинтез інтерферону порівняно з бактерією. До того ж інтерферон у дріжджовій клітині зазнає глікозильовання. Крім дріжджових клітин, для отримання глікозильованих інтерферонів використовуються клітини вищих еукаріот.

б-, в- і г-інтерферони з успіхом отримують шляхом використання генноінженерних штамів *E.coli*, дріжджів, культивованих клітин комах (*Drosophila*) і ссавців. Щодо отримання г- і в-інтерферонів, то краще використовувати еукаріотичні продуценти, тому що прокаріоти не глікозильовують білки.

Одержання вдосконалених інтерферонів

Сучасна біотехнологія та фармацевтична промисловість розвивається високими темпами, що впливає на фармацевтичну розробку лікарських засобів. Одним з них є ПЕГ-інтерферон, який слугує для ефективного лікування гепатиту С.

Використання поліетиленгліколю в процесі виробництва інтерферонів призводить до високої ефективності лікарського засобу та знижує економічні втрати.

Поліетиленгліколь являє собою ковалентну полімерну модифікацію для фармацевтичного і біотехнологічного використання. ПЕГ

використовується для зміни структури біологічних макромолекул, пептидів та білків.

Пегілювання використовується в основному для запобігання розпізнаванню та деградації протеолітичними ферментами. Сполучення цих молекул також збільшує розмір молекули поліпептиду і зменшує фільтрацію нирками і зміну біорозподілення.

Поліетиленгліколь знаходиться на одній з провідних ролей в фармацевтичній галузі, оскільки вона впливає на вивільнення лікарського засобу, таким чином, дозволяючи забезпечити зменшення частоти введення активної речовини в організм.

Додавання поліетиленгліколю до інтерферону за допомогою процесу пегілювання призводить до збільшення періоду напіврозпаду інтерферону в порівнянні з його початковою формою.

Ці препарати дозволені у всьому світі для лікування хронічного гепатиту С (в тому числі у пацієнтів з ВІЛ-інфекцією та цирозом печінки). Використовуються два види пегільованого інтерферону: ПЕГ-інтерферон-альфа-2а (наприклад, препарат PEGASIS) і ПЕГ-інтерфероном-альфа-2b (наприклад, препарат PEGINTRON).

Обидва пегільовані інтерферони вводять шляхом ін'єкції під шкіру один раз на тиждень.

Пегільований інтерферон отримують шляхом хімічного приєднання поліетиленгліколю (ПЕГ) до інтерферону. Для зв'язування білків з ПЕГ, зазвичай використовується монометоксі ПЕГ $[\text{CH}_3(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{OH}]$, що активується за допомогою ціанурхлориду, , 1'- карбонілдіімідазолу,

фенілхлорформіату або сукциноміділовим активним ефіром перед зв'язуванням з білком.

У більшості випадків активний агент виступає в якості лінкеру між ПЕГ та білком. Також декілька молекул ПЕГ можуть бути приєднані до однієї молекули білка.

На фармацевтичному ринку України вітчизняні виробники випускають ПЕГ-інтерферони, що мають високу якість і значно нижчу ціну, ніж інші, це дозволяє знизити витрати на лікування.

ПЕГ покращує фармакокінетичні параметри інтерферону та допомагають активній речовині залишатися в організмі довше, працювати більш ефективно проти вірусу гепатиту С і підвищують прибутковість препарату.

Специфічні особливості поліетиленгліколю такі як можливість регулювання довжини ланцюга, розчинність в воді, висока рухливість у розчині, відсутність токсичності та імуногенності дають змогу легко поєднуватися з інтерферонам, що сприяє лікуванню хворих на гепатит С.

Пегінтерферон являє собою ефективну заміну стандартного інтерферону як для монотерапії, так і в якості комбінованої терапії для лікування гепатиту С. Наявність на ринку та доступність ціни ПЕГінтерферону дозволяє використовувати його для лікування хворих на гепатит С по всьому світу.

12. ВИРОБНИЦТВО БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ В УКРАЇНІ

Після розпаду СРСР єдиним великим біотехнологічним підприємством в Україні залишилося державне Ладжинське ВАТ «Ензим», яке спеціалізується на виробництві технічних ферментних препаратів.

Після тимчасового занепаду в 90-х роках фірма відновила свою діяльність і навіть розширила асортимент продукції. Використовуючи 30-річний досвід роботи і сучасні технологічні рішення, вона виробляє продукцію високої якості, оперативно підбираючи оптимальні рішення для кожного конкретного споживача: пташиних і тваринницьких господарств; виробників комбікормів і преміксів; зернових і овочевих господарств; тепличних комбінатів; станцій захисту рослин; особистих підсобних господарств; спиртових заводів; виробників соків і вин; легкої промисловості; виробників синтетичних мийних засобів; підприємств нафтовидобувної і нафтопереробної промисловості; екологічних організацій; організацій охорони здоров'я. Тоді ж «Ензим» налагодив ампульне виробництво інтерферону людського рекомбінантного.

Препаративне одержання інсуліну для лікувальних потреб – це одне із найбільших досягнень медицини ХХ століття, що розпочалось у 1921 році і пов'язано з іменами двох науковців Торонтійського (Канада) університету Фредериком Бантінгом та Чарльзом Вестом, які назавжди ввійшли до історії

світової медицини. Після цього полковник Елі Ліллі, тодішній власник невеликої лабораторії для виготовлення медичних препаратів, у 1922 році заснував разом із Торонтійським університетом кооператив для виготовлення інсуліну.

В тому ж році вперше у світовій медичній практиці 14-літній Леонард Томпсон, хворий діабетом, зберіг життя завдяки лікуванню інсуліном, хоч іще не достатньо очищеним. Фірма Ліллі приступила до інтенсивного збільшення промислового виробництва інсуліну з підшлункових залоз тварин, і вже у 1925 році Ліллі-інсуліном лікувалося понад 30 000 пацієнтів.

Однак без забезпечення інсуліном велика кількість діабетиків помирали. Подальше вдосконалення методів одержання інсуліну фірмою Ліллі привело до одержання у 1968 році високоочищеного інсуліну з підшлункових залоз свиней, який відзначається високою ефективністю при лікуванні хворих діабетом. У 1980 році вперше вдалося виготовити біосинтетичним шляхом людський інсулін і врешті у 1983 році завдяки досягненням біотехнології було розроблено метод генно-інженерного одержання людських інсулінів.

Тепер у багатьох країнах світу для лікування цукрового діабету застосовують як людські, так і високоочищені інсуліни з підшлункових залоз свиней. Майже кожен другий діабетик лікується тепер інсуліном фірми Ліллі.

В період СРСР в ендокринному цеху Львівського м'ясокомбінату виготовляли, за даними аналітичних служб, один із найкращих в СРСР інсулінів. Конкурентна боротьба за ринки збуту інсуліну

призвела до того, що у колишньому Радянському Союзі було припинено виробництво інсуліну за розпорядженням міністра охорони здоров'я СРСР у 1990 році (не виключено що для очищення ринку збуту іноземним фірмам). Тоді це був єдиний виробник інсуліну в Україні, на території якої проживало понад мільйон людей, хворих цукровим діабетом.

В світі небагато держав, які здійснюють повний цикл виробництва препаратів інсуліну, й Україна входить в це число.

В Україні з 1999 року на київському заводі «Індар», який нині є одним з найбільших фармацевтичних підприємств на вітчизняному ринку, виготовляється інсулін на сучасному обладнанні, яке було свого часу поставлено такими відомими закордонними фірмами («Бош», «Глат-лінде», «Сіменс», «Летцнер», «Рота»), при цьому використовувалась власна технологія.

На сьогоднішній день ПрАТ «Індар» - одне з небагатьох підприємств України, продукція якого відповідає новітньому світовому рівню завдяки широкому практичному використанню вітчизняних технологій, воно одним з перших вітчизняних підприємств отримало міжнародний сертифікат GMP, який засвідчує, що стан виробництва інсулінів відповідає стандартам Всесвітньої організації охорони здоров'я та нормативам Європейського союзу.

Виробництво інсулінів на заводі здійснюється за повним технологічним циклом – від культивування продуценту протеїнового попередника інсуліну – до готових лікарських форм у флаконах та картриджах.

На сьогодні понад 70% продукції поставляється на експорт. Активна експортна політика забезпечується значними інвестиціями в розробку нових біотехнологічних і фармакологічних препаратів, створення нових виробничих дільниць. Наприклад, у 2011-му році у розвиток заводу було інвестовано понад 10 млн доларів США.

Близько половини всіх інсулінозалежних в Україні використовують препарати «Індар», ціна яких на 20-30 % нижча від ціни аналогів іноземного виробництва. За роки поставок інсулінів виробництва ПрАТ «Індар» держава зекономила сотні млн грн. тільки за рахунок різниці цін на вітчизняний та зарубіжний інсулін.

Високим стандартам якості українських інсулінів ПрАТ «Індар» довіряють пацієнти та партнери в Україні, СНД, Бразилії, Сирійській Арабській Республіці, Республіці Ємен та інших країнах.

Частина біотехнологічних виробництв України та характеристика їх наведені в Табл.3.

Біотехнологічні виробництва України

<i>Підприємство</i>	<i>Біотехнологічна продукція</i>
«Індар» (м.Київ)	Інсуліни
«Біофарма» (м. Київ)	Специфічні імуноглобуліни широкої номенклатури, рекомбінантні лікарські препарати, пробіотики
«Вітротест» (м. Київ)	Імуноферментні тест-системи для діагностики інфекційної патології та ендокринних порушень людини
ПАТ «Фармстандарт-Біолек» (м. Харків)	Імунобіологічні препарати, фізіологічно активні ліпіди: фосфоліпіди і гліколіпіди, кардіоліпінові антигени тощо.
ЗАТ «Технолог» (м. Умань). Входить у групу компаній «Лекхім»	Ферментні препарати: панкреазим, панкреатин-800, креазим.

<p>«Інтерфармбіотек» (м.Київ)</p>	<p>Єдине в Україні підприємство, що виробляє фармацевтичні препарати з використанням генно-інженерної біотехнології в усіх ланках виробничого циклу, включаючи біосинтез і очищення рекомбінантного білка, приготування готової лікарської форми.</p>
<p>Співробітництво «Інтерфармбіотек» (м.Київ) з ТОВ «Валартин Фарма»</p>	<p>Альфарекін, Альфапег, Нуклекс</p>
<p>«Біостимулятор» (м.Одеса)</p>	<p>Біогенні стимулятори</p>
<p>«Ензим» Ладижинський завод біоферментних препаратів для різних галузей промисловості</p>	<p>ферментні препарати «Ензим» препарати для сільського господарства; ферментні комплекси для годування сільськогосподарських тварин; пробіотичні препарати; біологічні засоби захисту рослин; препарати для очищення води і ґрунту; готові лікарські форми і медичні субстанції</p>

Межиріцький вітамінний завод (с.Межирічка, Кіровоградська обл.)	Гормональні й ендокринні препарати, витяжки з органів
---	---







Завод «Ензим» найстаріший не лише в Україні, а і на території усього колишнього СРСР виробник мікробних біологічних препаратів для сільського господарства, тваринництва та фармацевтики...

ДЕТАЛЬНІШЕ



ПРОБИОТИК

Препарати зі складом для людини, дітей та тварин.

Препарати зі складом для людини, дітей та тварин.

Препарати зі складом для людини, дітей та тварин.

БІОСІМ'Я
КОМПЛЕКСНИЙ ПРОБИОТИК
ДЛЯ ДІТЕЙ ВІД 0 ДО 3 РОКІВ



БІОСІМ'Я
КОМПЛЕКСНИЙ ПРОБИОТИК
ДЛЯ ДІТЕЙ



БІОСІМ'Я
КОМПЛЕКСНИЙ ПРОБИОТИК
ДЛЯ ДОРОСЛИХ



БІФІДУМБАКТЕРІН
ПРОБИОТИЧНИЙ ЗАСІБ



ВІТЕФЛОР
КОМПЛЕКСНИЙ ПРОБИОТИК
ДЛЯ ДІТЕЙ



НОРМАФЛОР
КОМПЛЕКСНИЙ ПРОБИОТИК
ДЛЯ ДОРОСЛИХ







ЗАКЛЮЧЕННЯ

Фармацевтика та біотехнології є сучасними високотехнологічними сферами промисловості різних країн світу та одними із ключових факторів створення сучасної інноваційної економічної системи багатьох країн, у тому числі країн ЄС, забезпечуючи основу для значних конкурентних переваг, стимулюючи економічне зростання та створення нових робочих місць. Розробки в галузі біотехнології застосовуються в медицині, виробництві харчових продуктів, сільському господарстві.

Приєднання України до Угоди про асоціацію з ЄС у сферах фармацевтики та біотехнологій створило б умови для співробітництва українських фармацевтичних та біологічних компаній з компаніями країн ЄС, що забезпечило б взаємодію у сфері досліджень і розробок інноваційної продукції з використанням біотехнологій.

Це сприяло б розширенню асортименту продукції, підвищенню якості, залученню інвестицій для оновлення власних інноваційних патентних портфелів і конкурентоспроможності українських виробників у довгостроковій перспективі на зовнішньому та внутрішньому ринках.

Для цього необхідно продовжувати уніфікувати законодавство України, що регулює виробництво, продаж, обіг продукції, створеної за допомогою біотехнологій, із законодавством ЄС та рекомендаціями ВОЗ.

Слід зазначити, що у 2011 р. Україна стала першою країною серед СНД, яка набула членства в міжнародній Системі співробітництва фармацевтичних інспекцій (Pharmaceutical Inspection Cooperation Scheme – PIC/S). Основними позитивними сторонами є вільний обмін інформацією в сфері лікарських засобів з країнами – членами PIC/S (це стосується усунення бар'єрів у міжнародній торгівлі, що стимулює експорт та імпорт, полегшує підписання контрактів на виробництво фармпродукції між підприємствами України та іншими країнами) та оптимізує видачу сертифікату GMP. Відповідно, з 2013 р. в Україні введено ліцензування імпорту лікарських засобів, що й передбачено стандартами PIC/S.

У 2013 р. Україна стала 38-м членом Європейської конвенції з розробки Європейської фармакопеї. У зв'язку із цим у державі були введені жорсткі стандарти якості відповідно до вимог Європейської фармакопеї. Результатом такої діяльності стало приєднання Центральної лабораторії з контролю якості лікарських засобів до Загальноєвропейської мережі офіційних медичних контрольних лабораторій.

Впровадження в законодавчу базу України гармонізованих з європейськими положень належної виробничої практики GMP сприяло підвищенню якості продукції українських виробників та їх конкурентоспроможності на внутрішньому і зовнішньому ринках.

Україна була однією з перших країн, що підписали Конвенцію MEDICRIME і ратифікували її, а також ввела та посилила у 2012 р. кримінальну відповідальність за злочини, пов'язані з

фальсифікацією препаратів. Завдяки підписанню у 2013 р. меморандуму з Європейським директором з якості лікарських засобів у рамках реалізації проекту Ради Європи “eTACT” автоматизованою системою стеження розпочато відстеження лікарських засобів в обігу. Ці зміни забезпечили позитивний вплив на теперішній розвиток галузі та зростання інвестиційної привабливості України.

Подальша імплементація в нормативно-правову базу України норм ЄС справляє позитивний вплив і сприятиме розвитку фармацевтики та біотехнологій. Так, у сфері фармацевтики на законодавчому рівні посилено державне регулювання, контроль за обігом та якістю фармацевтичної продукції тощо.

Завдяки приєднанню України до угоди СОТ і угоди ТРИПС, вона значно зміцнила нормативно-правову базу у сфері захисту прав інтелектуальної власності.

Проте потрібно зазначити, що для подальшого перспективного розвитку фармацевтичної та біологічної галузей в Україні необхідні:

- проведення досліджень, що забезпечать симбіоз фундаментальних досліджень і прикладних розробок;
- підтримка співробітництва між країнами через створення координаційних науково-дослідних центрів;
- усунення бар'єрів для налагодження співробітництва між підприємствами;
- запровадження курсів, програм за напрямом біотехнології;
- заохочення мобільності дослідників;

– більш широке запровадження он-лайн-конференцій та наукових дискусій через сучасні соціальні медіа.

Біотехнології є одним з найбільш пріоритетних напрямів науково-технічного прогресу і яскравим прикладом «високих технологій», з якими пов'язують перспективи розвитку багатьох виробництв.

Найбільший внесок сучасної біотехнології спостерігається у галузі охорони здоров'я.

Основним напрямом медичної біотехнології сучасності є створення лікарських препаратів і вакцин для лікування і запобігання більш ніж 40 різним формам раку, хворобі Альцгеймера, захворюванням серця, діабету, інфекційних, аутоімунних та безлічі інших захворювань.

При цьому значну частину складають препарати, отримані за допомогою генетичної й білкової інженерії: інсулін; гормон росту; гормон, що стимулює утворення еритроцитів; фактори згортання крові тощо.

Також біотехнологічні методи широко використовуються під час трансплантації органів, діагностики вірусних інфекцій (ВІЛ, гепатиту В і С), для тестування різних патологічних змін (тести на вагітність, діагностика генетичних спадкових захворювань).

Розроблені за допомогою біотехнології препарати, діагностичні тести і вакцини покращують якість медичного обслуговування, підвищують рівень діагностики захворювань, а також сприяють зниженню вартості діагностики та лікування

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Допоміжні речовини в технології ліків: вплив на технологічні, споживчі, економічні характеристики і терапевтичну ефективність / За ред. І.М. Перцева. — Х.: Золоті сторінки, 2010. — 600 с.
2. Розенфельд Л.Г., Москаленко В.Ф., Чекман І.С. та ін. Нанотехнології, наномедицина: перспективи наукових досліджень та впровадження її результатів у медичну практику / Укр. мед. часопис, 2008. — № 5. — С. 63–68.
3. Фармацевтична енциклопедія / Голова ред. ради чл.-кор. НАН України, проф. В.П. Черних. — 2-е вид. — К.: МОРІОН, 2010. — 1632 с.
4. Фармацевтичні та медико-біологічні аспекти ліків / За ред. проф. І.М. Перцева. — Вінниця: Нова книга, 2007. — 728 с.
5. Шибаева А. Биофармация сквозь призму рыночных реалий // «Еженедельник АПТЕКА». — 2010. — №13. — С. 21.
6. Біотехнологія: Підручник / В.Г. Герасименко, М.О. Гера сименко, М.І. Цвіліховський та ін.; Під общ. ред. В.Г. Герасименка. — К.: Фірма «ІНКООС», 2006. - 647 с.
7. Androshchuk H. Programa innovatsiinoho rozvytku Nimechchynu: strategiya vysokykh tekhnologii [Germany's innovative development programme: high technology strategy]. Nauka ta innovatsii – Science and Innovation, 2009, Vol. 5, № 3, pp. 72–88

8. Barmina A. Regulyatornaya politika v farmatsevticheskoi otrasli: problemy i puti ikh resheniya [Regulatory policy in the pharmaceutical sector: problems and ways of their solution]. *Ezhenedel'nik APTEKA*. Kiev, Morion, 2014, №3, p. 7
9. Dmitrik E. R&D-aktivnost' farmatsevticheskikh i biotekhnologicheskikh kompanii [R&D-activity of pharmaceutical and biotechnological companies] *Ezhenedel'nik APTEKA*. Kiev, Morion, 2014, № 8, p. 16
10. Shchegol' S. R&D-aktivnost' farmrynka v 2012 g. [R&D-activity of pharmaceutical market in 2012] *Ezhenedel'nik APTEKA*. Kiev, Morion, 2013, № 32, p. 12
11. The German Biotechnology Sector 2013, available at: <http://www.biotechnologie.de/>.
12. Regional'ni innovatsiini systemy Ukrainy: stan formuvannya ta rozvytku v umovakh integratsiinykh vyklykiv: monografiya [The regional innovation system of Ukraine: state formation and development under the conditions of integration challenges: monograph]. Za red. L.I. Fedulovoi; Institute for Economics and Forecasting, National Academy of Sciences. Kyiv, 2013, 724 p.
13. Hruzdova T. Komertsializatsiya rezul'tativ intelektual'noi diyal'nosti na providnykh pidpryemstvakh farmatsevychnoi galuzi [Commercialization of the intellectual activity results at the leading enterprises of the pharmaceutical industry] *Mizhgaluzevyi naukovo-praktychnyi zhurnal «Problemy nauky»*, 2014, № 4–5 (160–161), pp. 9–15
14. Materialy krugloho stolu «Yevropeis'ka integratsiya farmatsevychnoi galuzi Ukrainy» [Materials of the round table «European integration of pharmaceutical industry in Ukraine»], available at: <http://www.gmpcenter.org.ua/>

15. Ukraina i Yevropeis'kyi Soyuz [Ukraine and European Union], available at: <http://www.3w.mk.ua/Site3W/00000126.htm>
16. Груздова Т. В. Перспективи розвитку сфери фармацевтики та біотехнологій із приєднанням України до угоди про асоціацію з Європейським Союзом / Т. В. Груздова, Т. М. Юхновська // Український соціум. - 2014. - № 3. - С. 63-77. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Usoc_2014_3_9
17. Тенденції розвитку комерційної біотехнології / В.Новіков, Ю. Сидоров, О. Швед // Вісн. НАН України. — 2008. — N 2. — С. 25-39. — Бібліогр.: 23 назв.
18. Федулова Л. І.Формування інноваційної системи біотехнологій: досвід зарубіжних країн, проблеми України / Л. І. Федулова, К. І. Федулова // Наука та інновації. - 2012. - Т. 8, № 4. - С. 51-66. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/scinn_2012_8_4_9
19. Анализ современного состояния биотехнологической отрасли в мире: [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://www.cleandex.ru/subscribe/>.
20. Рабочие материалы к Стратегии развития биотехнологической отрасли промышленности до 2020 года. — Москва, 2009.
21. Сучасні біотехнології виробництва продуктів харчування, здоров'я й розвитку людини // <http://www.cbio.ru/modules/news/article.php?storyid=3248>.
22. Генетически модифицированные организмы и обеспечение биологической безопасности / И. Игнатъев, И. Тромбицкий, А. Лозан. — Кишенев: Экоспектр – Бендеры, 2008. – 60 с.

23. Feczko, T. In-vitro interferon- α release from interferon- α and pegylated IFN- α loaded PLGA and PEG-PLGA nanoparticles [Text] / T. Feczko, A. FodorKardos, M. Sivakumaran, Q. T. H. Shubhra // *Nanomedicine*. – 2016. – Vol. 11. – Issue 12 – P. 2029–2034. doi:10.2217/nmm-2016-0058.
24. Kuo, H. P. Delivery of grouper interferon by chitosan-modified poly (lactico-glycolic acid) nanoparticles to protect nervous necrosis virus infection [Text] / H. P. Kuo, L. L. Goh, M. W. Lu, Z. L. Kong // Source: *journal of nanoscience and nanotechnology* — 2016. — Vol. 16. — Issue 7. — P. 7521–7529. doi: 10.1166/jnn.2016.12348.
25. Yang, J. A. Target specific hyaluronic acid–interferon alpha conjugate for the treatment of hepatitis C virus infection [Text] / J. A. Yang, K. Park , H. Jung, H. Kim, S. W. Hong, S. K. Yoon, S. K. Hahn // *Biomaterials*. — 2011. — Vol. 32.— Issue 33. — P. 8722—8729. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.088.
26. Min-Young, L. Hyaluronic acid–gold nanoparticle Interferon - α complex for targeted treatment of hepatitis C virus infection [Text] / L. Min-Young, J. A. Yang, S. J. Ho, B. Songeun, E. C. Jung, H. Wonhee, K. Heebeom, K. Kwangmeyung, K. Y. Seung, K. H. Sei // *ACS Nano*. — 2012. — Vol. 6 (11) — P. 9522–9531. doi: 10.1021/nn302538y.
27. Лікарські засоби. Випробування стабільності біотехнологічних/біологічних продуктів (ICH Q5C): Настанова СТ-Н МОЗУ 42-8.2:2013. – К.: МОЗ України, 2013. – 22 с. – (Стандарт МОЗ України).
28. Лікарські засоби. Специфікації: методи випробування та критерії прийнятності для

біотехнологічних/біологічних продуктів (ICH Q6B): Настанова СТ-Н МОЗУ 42-8.3:2013. – К.: МОЗ України, 2013. – 34 с. – (Стандарт МОЗ України).

29. Лікарські засоби. Фармацевтична розробка біотехнологічних та біологічних продуктів: Настанова СТ-Н МОЗУ 42-8.1:2013. – К.: МОЗ України, 2013. – 13 с. – (Стандарт МОЗ України).

30. Порядок здійснення контролю за відповідністю імунобіологічних препаратів, що застосовуються в медичній практиці, вимогам державних і міжнародних стандартів. – Наказ МОЗ України від 01.10.2014 № 698.

31. Чекман, І. С. Нанотехнології у розробці систем доставки лікарських засобів [Текст] / І. С. Чекман, А. О. Прискока // Український медичний часопис. — 2010. — №1 (75). — С. 14–18.

32. Комісаренко С. В. Стан, проблеми та перспективи розвитку біотехнології в Україні: [Електронний ресурс] / С. В. Комісаренко // Режим доступу:http://www.biochemistry.org.ua/index.php?option=com_content&view=article&id=23&Itemid=22&lang

33. Угода про співробітництво в боротьбі з обігом фальсифікованих лікарських засобів. – Постанова КМУ від 08.12.2010 № 1114. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/1114-2010-п>

Навчальна література

Укладачі

Тугай Тетяна Іванівна

Посєдинок Наталія Леонідівна

Сергійчук Наталія Миколаївна

Катинська Марина Георгіївна

Сучасні тенденції розвитку біотехнологій
в біології та фармації

Навчально-методичний посібник

В авторській редакції

Формат 60x84/16. Ум.друк.арк. 7,3

Наклад 100пр. Зам. № 10.09-19.

Видавець і виготовлювач ТОВ «Талком»

03115, м. Київ, вул. Львівська, 23,

тел./факс (044) 424-40-69, 424-56-26

Е-mail: ukraina.vdk@email.ua

С відоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4538 від 17.05.2013