

Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев

**ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ
БИОТЕХНОЛОГИЯ:
ПРОИЗВОДСТВО
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ**

Учебное пособие

ЧАСТЬ II

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
«Харьковский политехнический институт»

Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев

**ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ:
ПРОИЗВОДСТВО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ**

Учебное пособие

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

В двух частях

ЧАСТЬ II

Утверждено
редакционно-издательским
советом университета,
протокол № 2 от 06.12.2012 г.

Харьков
НТУ «ХПИ»
2013

УДК 615.012 (075)
ББК 35.66я73
К 78

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

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

Призначено для студентів і аспірантів біотехнологічного напрямку підготовки.

Краснопольский Ю. М.

К 78: Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ : учеб. пособие : в 2 ч. – Ч. 2 / Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2013. – 192 с.– На рус. яз.

ISBN 978-966-593-969-6 (полное изд.)

ISBN 978-617-05-0068-7(Ч. 2)

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

Предназначено для студентов и аспирантов биотехнологического направления подготовки.

Ил. 8. Табл. 6. Библиогр.: 51 назв.

УДК 615.012 (075)
ББК 35.66я73

ISBN 978-617-05-0068-7(Ч. 2)

© Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев, 2013

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Глава 1. Биотехнология аминокислот	7
1.1. Биотехнология получения лизина.....	13
1.2. Биотехнологическое получение триптофана.....	21
1.3. Биотехнологическое получение глутаминовой кислоты.....	25
1.4. Биотехнологическое получение L-аланина.....	27
Глава 2. Биотехнология фармацевтических препаратов из дрожжей	38
2.1. Метод автолиза дрожжей.....	38
2.2. Получение нуклеиновых кислот из дрожжей.....	44
2.3. Биотехнология получения фармацевтических препаратов на основе дрожжей.....	47
2.3.1. Препараты на основе двуспиральной РНК дрожжей.....	47
2.3.2. Препараты на основе β-глюканов дрожжей.....	49
2.3.3. Препараты на основе гидролиза РНК дрожжей.....	50
2.4. Ферменты, выделяемые из дрожжей.....	54
Глава 3. Биотехнология растений	63
3.1. Вторичные метаболиты растений – фармакологически активные вещества.....	63
3.2. Получение иммунобиологических препаратов с использованием генной инженерии растений.....	83
3.2.1. Генная инженерия растений.....	83
3.2.2. Растительные вакцины.....	91
3.2.3. Растения – продуценты иммуноглобулинов.....	94
Глава 4. Фосфолипиды в биотехнологии	103
4.1. Фосфолипиды в биологических мембранах.....	103
4.2. Биотехнологическое получение фосфолипидов.....	116
Глава 5. Требования к производству и контролю качества биотехнологических препаратов	140
Глоссарий	154
Список литературы	187

ВВЕДЕНИЕ

Уважаемый читатель! Представленная Вам книга является продолжением обзора по биотехнологии фармацевтически активных субстанций, входящих в состав профилактических, диагностических и лекарственных препаратов: аминокислот, природных и синтетических фосфолипидов, веществ, выделенных из дрожжей, а также фармакологически активных субстанций, полученных с помощью биотехнологии растений. Кроме того, в данном пособии описаны требования к производству и контролю качества биотехнологических препаратов.

Фармацевтическая биотехнология имеет большие перспективы на мировом фармацевтическом рынке в связи с постоянным ростом потребностей здравоохранения. Среди биотехнологических препаратов присутствуют продукты для прецизионного воздействия на патологические мишени, в основном, парентеральные. Среди них белки, липиды и нуклеиновые кислоты: вакцины, гормоны, моноклональные антитела, фосфолипиды, ДНК, РНК и др.

Широкий спектр биотехнологических препаратов, применяемый сегодня в мировой практике, требует дальнейшего исследования и является предметом обсуждения данной публикации. Нами будут рассмотрены вопросы получения и использования ряда генно-инженерных штаммов сверхпродуцентов аминокислот: лизина, триптофана, L-лейцина и др., ко-

торые являются фармакологически активными субстанциями многих лекарственных препаратов различной направленности. В данной публикации подробно обсуждены вопросы биотехнологии получения, выделения и очистки субстанций дрожжей: ридостина, РНК, Энкада и ряда других. Особый интерес представляют данные о биотехнологии фосфолипидов, рассмотрены вопросы об их иммуногенности, антигенности, адьювантности, возможности использования в биотехнологии иммобилизации фосфолипидов для выделения биологически активных веществ и в целях создания диагностических препаратов или биодатчиков. Отдельный раздел посвящен перспективному направлению фармацевтической биотехнологии – созданию субстанции лекарственных препаратов на основе биотехнологии растений. Сегодня широко используются вторичные метаболиты растений: алкалоиды, сердечные гликозиды и другие биологические вещества. С помощью трансгенных растений получены оригинальные вакцины против бактериальных и вирусных инфекций. Несомненным достижением ученых является создание с помощью растений моноклональных антител различной направленности, например, к известному онкогену HER2/neu. В учебном пособии рассматриваются вопросы производства фармацевтических препаратов в соответствии с требованиями GMP.

Технологии, приведенные в данной публикации, являются принципиально возможными схемами получения биотехнологических препаратов и не являются технологией конкретного производителя. Попытка их воспроизводства не может закончиться успешно, так как приведены только общие характеристики процессов, позволяющие представить и оценить современное состояние проблемы.

В этой публикации суммированы основные технологии и ключевые проблемы биотехнологического производства аминокислот, природных и синтетических фосфолипидов. Рассмотрены основные механизмы автолиза

дрожжевых клеток и получение из дрожжей фармакологически активных субстанций и готовых препаратов различной направленности. Сегодня, по видимому, мало у кого возникают сомнения по поводу возможности получения лекарственных препаратов на основе биотехнологии растений. Использование суспензионных культур растительных клеток и трансгенных растений, полученных генно-инженерными методами, позволяет производить препараты различной направленности: алкалоиды и сердечные гликозиды, антигены – компоненты вакцин, «съедобные» вакцины и моноклональные антитела.

Необходимо отметить, что данное учебное пособие не имеет аналогов в Украине.

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

- ❖ Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов (2009 г.);
- ❖ Фармацевтическая биотехнология: Бионанотехнология в фармации и медицине (2011 г.);
- ❖ Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ. Часть I (2012 г.).

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

ГЛАВА 1. БИОТЕХНОЛОГИЯ АМИНОКИСЛОТ

Аминокислоты – основные структурные единицы белковых молекул. В организме человека синтезируется только 10 из 20 известных аминокислот. Это так называемые заменимые аминокислоты (аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, глицин, глутамин, глутаминовая кислота, пролин, серин, тирозин, цистеин (цистин)). Эти аминокислоты могут быть синтезированы из продуктов обмена углеводов и липидов. Остальные 10 аминокислот не синтезируются в организме, поэтому они были названы жизненно необходимыми, или незаменимыми аминокислотами (аргинин, валин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин). Незаменимые 10 аминокислот должны поступать с пищей. Значение растительных белков в пище человека невозможно переоценить, поскольку именно белки растений содержат незаменимые аминокислоты, которых нет в животных продуктах и которые люди неспособны синтезировать. Необходимо отметить, что ряд аминокислот, таких как аргинин, триптофан, тирозин, лизин, цистеин и другие, синтезируются микрофлорой кишечника.

При дефиците в организме ряда аминокислот, связанного с патологическими процессами, в арсенале врачей присутствуют препараты, содержащие индивидуальные аминокислоты или их смеси.

Аминокислоты широко применяют в медицине для терапии послеоперационных больных, при лечении заболеваний ЦНС, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, печени (серотонин, аспарагин, валин, глицин, гистидин, глутамин и глутаминовая кислота, изолейцин, метионин, пролин, тирозин, триптофан, фенилаланин, цистеин).

Применение аминокислот в медицинской практике основано на их способности принимать участие в синтезе белков, пептидов, ферментов, гормонов, в азотистом обмене, создании конечных его продуктов (аммиака, мочевины) и других жизненно важных процессах.

Ежегодно в мире производится более 800000 тонн аминокислот стоимостью более 5 млрд. долларов (пищевые добавки, кормовые добавки, косметические средства). Причем, больше половины производства прихо-

дится на долю L-глутаминовой кислоты, которую используют для получения известного усилителя вкуса и аромата – натрия глутамата.

Коммерческие препараты аминокислот получают, в основном, при помощи четырех методов:

1 – биологическим – экстракцией из белковых гидролизатов (растений, животных, микроорганизмов);

2 – микробиологическим – биосинтезом или очисткой продуктов метаболизма бактерий – *Corynebacterium*, *Brevi bacterium spp*, (в частности, *Brevibacterium flavum*), *Bacillus*, *Aerobacter*, *Microbacterium*, *Eschirichia* и др.;

3 – химико-энзиматическим – энзиматическая трансформация химически синтезированных предшественников аминокислот с образованием активных L-изомеров (например, синтез аспарагиновой кислоты из фумаровой с использованием клеток кишечной палочки и синтез L-фенилаланина из коричной кислоты с использованием клеток дрожжей);

4 – химическим синтезом – использование тонкого органического синтеза.

Наиболее часто для получения аминокислот используют 2-й и 3-й методы.

В табл. 1 приведены основные продуценты аминокислот, полученные путем селекции с использованием биотрансформации предшественников аминокислот.

Таблица 1– Штаммы-продуценты аминокислот

Штамм-продуцент	Аминокислоты
<i>B. flavum</i>	Тирозин, Валин, Треонин, Аргинин, Гистидин, Лизин, Фенилаланин, Пролин
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Триптофан, Аргинин, Гистидин, Изолейцин, Лейцин, Лизин, Серин, Фенилаланин, Треонин, Тирозин, Валин
<i>Bacillus subtilis</i>	Триптофан, Лейцин, Аргинин

Как показано ранее, получение аминокислот возможно несколькими путями: химическим синтезом, гидролизом природного белкового сырья и при использовании биотехнологических процессов.

Химический синтез дает рацемат – продукт, содержащий как L-, так и D-формы аминокислот. За исключением глицина, который не имеет оптически активных изомеров, и метионина, который усваивается организмом в обеих формах. Причем, D-изомеры обладают токсичностью.

Получение оптически активных L-изомеров аминокислот из продуктов гидролиза природных материалов растительного и животного происхождения связано с многоступенчатой и дорогостоящей очисткой.

Биотехнологическое получение аминокислот включает в себя как прямую микробную ферментацию, так и микробиологический или ферментативный синтез из предшественников. Используемые в промышленности микроорганизмы можно разделить на: дикие штаммы, ауксотрофные мутанты, регуляторные мутанты и ауксотрофные регуляторные мутанты. Промышленные штаммы, как правило, несут несколько мутаций, затрагивающих механизмы регуляции целевой аминокислоты и её предшественников.

Для получения таких аминокислот, как L-глутамата, L-валина, L-аланина, L-глутамина и L-пролина возможно применение природных штаммов и усиление у них продукции аминокислот условиями ферментации. Например, высокий (до 30 г/л) выход глутамата возможен при полном или частичном подавлении активности α -кетоглутаратдегидрогеназы, добавлении в среду ПАВ (поверхностно-активные вещества) и антибиотиков (пенициллина, цефалоспорины) для увеличения проницаемости клеточных мембран для глутамата. Синтез L-глутамата можно переключить на образование L-глутамина или L-пролина, изменяя условия ферментации. При повышении концентрации ионов аммония и биотина в среде стимулируется образование L-пролина; слабо кислая среда и ионы цинка при избытке аммония усиливают синтез L-глутамина.

Для получения новых эффективных штаммов-продуцентов аминокислот применяют методы биотехнологии. Наиболее перспективным направлением являются методы генетической инженерии – введение в клетку продуцента многокопийных плазмид, содержащих гены, контроли-

рующие биосинтез аминокислот в ущерб синтезу биомассы и других клеточных компонентов. Методы генетической инженерии позволяют повышать количество генов биосинтеза путем их клонирования в плаزمиды. Это приводит к увеличению количества ферментов, ответственных за синтез аминокислот, следовательно, повышает выход целевого продукта. Клонирование генов системы синтеза аминокислот в клетках микроорганизмов с иным, по сравнению с донорским организмом, типом питания позволяет расширить сырьевую базу и заменить дорогостоящие сахаросодержащие субстраты более дешевыми. Кроме того, применение гибридных плазмид в биосинтезе аминокислот позволяет: увеличить рост продуктивности биомассы; уменьшить примеси в целевом продукте; увеличить коэффициент использования субстрата.

Одним из подходов к получению штаммов с повышенной способностью к синтезу аминокислот является выделение мутантов с нарушенной регуляцией биосинтеза аминокислот. Отбор таких мутантов проводят *in vitro* на средах с повышенным содержанием аминокислот или их аналогов.

Возникает закономерный вопрос – почему это возможно? Как правило, устойчивость к повышенному уровню аминокислот и их аналогов связана с нарушением регуляции в их биосинтезе. Установлено, что регуляция синтеза большинства аминокислот у микроорганизмов (и растений) осуществляется по принципу обратного ингибирования, т.е. уровень аминокислоты находится под контролем биосинтеза. Например, такая система регуляции описана для аминокислот, которые синтезируются из аспартата. Важно отметить, что наличие одной аминокислоты в среде может ингибировать биосинтез других, имеющих общий путь биосинтеза. В средах с повышенной концентрацией какой-то одной аминокислоты клетки дикого типа гибнут, так как для нормального роста им необходимы те аминокислоты, которых нет в среде и биосинтез которых ингибирован избыточным количеством присутствующей в питательной среде аминокислоты. В устойчивых клетках изменена регуляция биосинтеза, связанная с чувствительностью ферментов к обратной регуляции. *Снижение чувствительности ферментов к обратной регуляции аминокислотами ведет к повышенному синтезу аминокислот или определенной аминокислоты.* Данный под-

ход является основой для получения штаммов микроорганизмов сверхпродуцентов по синтезу незаменимых аминокислот.

Производственные биотехнологические процессы получения аминокислот реализуются в условиях глубокой аэробной периодической ферментации. Скорость синтеза аминокислот не совпадает во времени со скоростью роста производственной культуры.

Максимальная продукция аминокислоты наступает, как правило, когда прирост биомассы практически прекращается. Поэтому питательная среда на первом этапе ферментации должна обеспечивать сбалансированный рост клеток; а на втором – условия для сверхсинтеза целевой аминокислоты. В качестве источника углерода и энергии используют богатые сахаром субстраты, главным образом, мелассу. В зависимости от таксономического положения и физиологических потребностей микроорганизмов в качестве источника азота используют соли аммония, нитраты, аминокислоты и молекулярный азот. В состав среды вносят необходимые количества углерода и азота, фосфатов и других солей, а также стимуляторы роста (витамины, экстракт дрожжей), ПАВ (поверхностно-активные вещества), антибиотики. Периодический режим ферментации и «богатая» по составу среда требует соблюдения стерильности в ходе получения инокулята и на стадии ферментации продуцентов. Стерилизации подвергаются питательные среды, воздух и все технологическое оборудование. После стадии ферментации в процессе обработки культуральной жидкости клетки отделяют от раствора, который далее подвергают очистке от окрашенных примесей и взвешенных частиц с помощью сорбционных методов. Далее процесс проводится с использованием различных методов выделения и очистки в зависимости от сферы применения конечного продукта. Для фармацевтической промышленности аминокислоты выпускают в виде высокоочищенной кристаллической субстанции.

Биотехнологическое получение аминокислот, основанное на способности микроорганизмов синтезировать все L-аминокислоты, является сегодня широко распространенным. Кроме того, селекционная работа со штаммами продуцентами аминокислот позволяет обеспечивать их сверхсинтез. Для синтеза всех белков требуется 20 аминокислот. Пути синтеза

большинства аминокислот взаимосвязаны. При этом *одни аминокислоты являются предшественниками для биосинтеза других:*

- пируват – предшественник аланина, валина, лейцина;
- 3-фосфоглицерат – предшественник серина, глицина, цистеина;
- щавелево-уксусная кислота – предшественник аспартата, аспарагина, метионина, лизина, треонина, изолейцина;
- α -кетоглутаровая кислота – предшественник глутамата, глутаминна, аргинина, пролина;
- фосфоэнолпируват + эритрозо-4-фосфат – предшественник фенилаланина, тирозина, триптофана;
- 5-фосфорибозил-1-пирофосфат + АТФ – предшественник гистидина.

Синтез каждой аминокислоты микробными клетками реализуется в строго определенных количествах, обеспечивающих образование последующих аминокислот, и находится под строгим генетическим контролем. Контроль осуществляется по принципу обратной связи на уровне генов, ответственных за синтез соответствующих ферментов (репрессия), и на уровне самих ферментов, которые в результате избытка образующихся аминокислот могут изменять свою активность (ретроингибирование). Данный механизм контроля включает перепроизводство аминокислот и также препятствует их выделению из клеток в окружающую среду. Чтобы добиться сверхсинтеза отдельных аминокислот, нужно обойти или изменить данный контрольный механизм их синтеза. Для этого пути возможно использование природных «диких» штаммов; очень существенны при этом условия ферментации, так как добиться дисбаланса в системе синтеза аминокислот можно путем изменения ряда основных факторов среды (концентрация основного субстрата, pH, соотношение макро- и микроэлементов в среде и т.д.). Изменение контрольного механизма синтеза аминокислот осуществляется генетическими методами. При этом получают мутантные организмы – ауксотрофные или регуляторные мутанты. Ауксотрофные мутанты – это организмы, утратившие способность к синтезу одной или нескольких аминокислот.

Обычно для повышения продуктивности этих микроорганизмов используют мутагенез с последующим отбором штаммов – сверхпродуцен-

тов определенных аминокислот. Этот способ получения штаммов требует много времени и эффективность его невелика. Альтернативные подходы – выделение и изменение специфических генов, кодирующих ключевые ферменты определенных биохимических реакций. Например, генно-инженерный способ получения аминокислоты триптофана, синтезируемой *C. glutamicum*, одного из видов *Corynebacterium*. Для этого в клетки *C. glutamicum* дикого типа введена копия гена, кодирующего антранилатсинтазу, фермента лимитирующего синтез триптофана.

Высокий уровень биосинтеза триптофана достигают введением в клетки *C. glutamicum* модифицированных генов трех ключевых ферментов: 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфатсинтазы, антранилатсинтазы и антранилатфосфорибозилтрансферазы. В качестве альтернативы для синтеза аминокислот можно использовать *E. Coli*. Этот микроорганизм хорошо изучен, а генно-инженерные методы работы с ним более или менее детально разработаны.

1.1. Биотехнология получения лизина

Аминокислота L-лизин ($\text{CH}_2\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_3 - \text{NH}_2\text{CH} - \text{COOH}$) в организме человека и высших животных определяет биологическую ценность перевариваемого белка. Лизин выполняет важнейшие биохимические функции – способствует секреции пищеварительных ферментов и транспорт кальция в клетки, улучшает общий азотный баланс в организме. Аминокислота и её производные, обладая высокой фармакологической активностью, широко используются в составе различных форм лекарственных препаратов.

В основу производства лизина положены технологии с использованием одноступенчатого микробного синтеза, которые включают промышленное культивирование ауксотрофных мутантов бактерий рода *Corynebacterium* способных к сверхсинтезу этой аминокислоты. Обычно у диких штаммов, из которых получены ауксотрофные мутанты, сверхсинтеза лизина не наблюдается, т.к. у них действуют механизмы саморегуляции. Бактерии и высшие растения синтезируют лизин через α -диаминопимелиновую кислоту. По этой разветвленной схеме биосинтеза лизина

(диаминопимелиновый путь) синтез начинается с аспарагиновой кислоты и проходит через диаминопимелиновую кислоту. Помимо L-лизина, аспарагиновая кислота является также предшественником для L-метионина, L-треонина и L-изолейцина.

Чтобы добиться *образования лизина в больших количествах*, получают мутанты двух типов:

❖ у *мутантов первого типа* не синтезируется или не функционирует гомосериндегидрогеназа, в результате чего блокируется синтез метионина и треонина. Такие мутанты являются ауксотрофами по гомосерину или треонину (метионину); внутриклеточная концентрация треонина у них существенно снижена, что снимает блокаду с аспараткиназы. Поэтому при выращивании мутантных штаммов в среде, где присутствуют лимитирующие концентрации метионина и треонина, они способны образовывать избыточные количества лизина;

❖ *мутанты второго типа* дефектны по структурному гену, детерминирующему конформацию аспараткиназы. В итоге фермент теряет чувствительность к высоким концентрациям аллостерического ингибитора – лизина.

Таким образом, в клетках бактерий аминокислота лизин синтезируется из аспарагиновой кислоты через ряд промежуточных этапов, связанных с образованием полуальдегида аспарагиновой кислоты, дигидропиколиновой кислоты, E-диаминопимелиновой кислоты, являющейся непосредственным предшественником лизина. Полуальдегид аспарагиновой кислоты является также предшественником синтеза аминокислот: треонина, метионина и изолейцина. Ключевым местом в синтезе лизина является аспараткиназа, ингибируемая треонином. Присутствие лизина этот эффект усиливает. Треонин ингибирует дегидрогеназу полуальдегида аспарагиновой кислоты, а также гомосериндегидрогеназу. Метионин является репрессором по отношению к гомосериндегидрогеназе, а изолейцин ингибирует треониндегидрогеназу. Продукты обмена, угнетающие различные ферменты и участвующие в синтезе лизина, следует вывести из реакции. Именно поэтому для производства L-лизина используют различные ауксотрофные мутанты.

В результате, процесс синтеза указанных аминокислот начинается фосфорилированием аспарагиновой кислоты с участием фермента аспараткиназы, активность которого ингибируется совместным действием двух аминокислот – лизина и треонина, если они накапливаются в клетках бактерий в избыточной концентрации. Если каким-либо путем понизить концентрацию одной из этих аминокислот, то синтез другой будет осуществляться даже при условии, когда она накапливается в довольно высокой концентрации.

Для снятия регуляции синтеза лизина необходимо прекратить образование треонина на стадии превращения полуальдегида аспарагиновой кислоты в гомосерин, катализируемое ферментом гомосериндегидрогеназой. Последнее достигается посредством мутагенеза. Опыты показывают, что мутантные клетки, не образующие гомосериндегидрогеназы, при их культивировании на искусственной питательной среде обеспечивают высокий выход лизина. Дефицитные аминокислоты, которые не синтезируются мутантными клетками, вводятся в состав питательной среды в таком количестве, чтобы они не были регуляторами синтеза лизина.

Производственные штаммы-суперпродуценты лизина – это ауксотрофные штаммы глутаматпродуцирующих бактерий (*Corynebacterium glutamati-cum*, *Brevibacterium flavum*). Применяют *три типа мутантов*:

❖ ауксотрофы по гомосерину или треонину с подавленной гомосеринкиназой;

❖ метионин и треонинчувствительные штаммы с существенно сниженной активностью гомосериндегидрогеназы;

❖ аналогорезистентные прототрофные продуценты лизина, устойчивые к треонину и аминокотициллистеину, с аспараткиназой, не чувствительной к согласованному ингибированию лизином и треонином.

Биотехнологический процесс производства лизина с использованием ауксотрофных микроорганизмов требует специального состава питательных сред, которые подбираются индивидуально для каждого штамма.

Получены штаммы, обеспечивающие 40 %-ю конверсию углеродного субстрата в аминокислоту и выход лизина на сахарах до 40 г/л, на углеродной кислоте – до 50–73 г/л.

Вопросам увеличения выхода лизина и интенсификацией процесса его получения посвящено значительное количество работ. Производительность промышленного биореактора существенно зависит от соотношения длительности стадий наращивания биомассы продуцента и биосинтеза целевого продукта. Сокращение длительности первой стадии процесса может быть достигнуто путем увеличения исходной плотности культуры. Достижение максимально возможной плотности посевного материала желательным было обеспечить при минимальном приборном оснащении и незначительных дополнительных трудозатратах. Однократное увеличение содержания питательных веществ в исходной среде не дает положительных результатов, поскольку концентрация редуцирующих веществ более 2,0 % уже частично ингибирует процесс роста продуцента. Эффект ингибирования при этом обусловлен, по-видимому, интенсивным образованием побочных продуктов в условиях избытка сахаров относительно количества, потребляемого системами транспорта кислорода. Поэтому начальная концентрация редуцирующих веществ в культуральной жидкости продуцентов лизина не должна превышать 1,9 %. Однако такой низкий запас питательных веществ не позволяет получить желаемую плотность биомассы без дополнительных подпиток. С другой стороны, при реализации подпиток происходит постепенное снижение рН культуральной жидкости, приводящее к угнетению роста культуры. Снижение рН культуральной жидкости при производстве лизина может быть связано со способностью продуцентов выделять молочную кислоту, что происходит в условиях лимитирования кислорода. В этом случае наблюдается неполное окисление субстрата с образованием кислот, которое может быть предотвращено или уменьшено на стадии приготовления инокулята и посевного материала рядом способов:

1 – повышением массообменных характеристик инокуляторов и посевных аппаратов для предотвращения лимитирования роста популяции продуцента концентрацией растворенного кислорода;

2 – внесением веществ с высокой буферной емкостью, например, солей угольной кислоты, в состав сред или увеличением рН подпиточной среды;

3 – увеличением азотсодержащих органических компонентов и солей органических кислот в питательной среде до уровня, при котором происходит их потребление с высвобождением щелочных агентов – минеральных щелочей и аммиака (возможный путь достижения эффекта аутостабилизации рН).

Рассмотрим указанные варианты стабилизации рН культуральной жидкости при производстве лизина.

Практическое использование *первого способа* может быть реализовано в весьма ограниченном масштабе, так он предполагает серьезную модернизацию оборудования, что в крупнотоннажном производстве оправдано лишь для стадии приготовления посевного материала. При этом не гарантирован положительный эффект модернизации.

Второй путь представляется более привлекательным вследствие простоты реализации: требуется подобрать лишь соотношение добавляемых компонентов. Однако добавление мела возможно лишь на стадии приготовления инокулята в качалочных колбах вследствие того, что в аппаратах с механическими перемешивающими устройствами мел действует на конструктивные материалы как абразив. Использование же буферных агентов ограничивается экономическими причинами. Кроме того, вследствие изменения во времени интенсивности роста биомассы продуцента и стехиометрических показателей процесса при выращивании посевного материала необходимое количество титранта будет переменным и придется готовить несколько подпиточных сред, что в промышленных условиях затруднительно.

Третий путь представляется более перспективным: в этом случае необходимо подобрать эффективное соотношение основного источника углеродного питания (мелассы и др.) и ростового фактора (например, гидролизата белково-витаминного концентрата и кукурузного экстракта) в культуральной жидкости, а фактически в исходной и подпиточной средах. Положительный результат может быть получен в случае параллельного потребления культурой нескольких источников углерода и азота с высвобождением определенного количества щелочных агентов. Это имеет место, если транспорт источников углерода лимитирует рост продуцента и в среде присутствует значительное количество солей органических кислот.

Гидролизат кукурузного экстракта, например, содержит натриевую соль молочной кислоты в количестве 5–11 %, а в гидролизате белково-витаминного концентрата присутствует избыточное количество аминокислот, предпочтительно потребляющихся культурой продуцента. Так, эффект увеличения рН среды (от 6,8 до 8,0) в процессе биосинтеза лизина на начальной фазе процесса ряд авторов связывает с потреблением органических кислот и аминокислот ростовых добавок. Установлено, что существует принципиальная возможность поддержания величины рН культуральной жидкости в благоприятном для роста продуцентов лизина диапазоне за счет подбора соотношения мелассной и ростовой составляющей исходной среды и подпиток в условиях отсутствия лимитирования процесса по кислороду. Образование кислых продуктов и потребление компонентов сред с образованием щелочных продуктов является практически сбалансированным при использовании сахаросодержащей и ростовой сред в соотношении, соответствующем содержанию около 10–20 г редуцирующих веществ на 1 г аминного азота.

Рассмотрим два способа получения *L*-лизина на питательных средах различного состава.

1. Получение *L*-лизина на питательных средах, содержащих сахара.

В составе питательной среды присутствуют: сахара в количестве 7–12 %, сульфат аммония, фосфаты калия, кукурузный экстракт в качестве источника биологически активных веществ (1,2–1,5 % по содержанию сухих веществ), а также мел и синтетический пеногаситель. Среда должна содержать в 1 литре: 200 мг метионина, 800 мг треонина, 15–20 мкг биотина (при меньших концентрациях биотин синтезируется глутаминовая кислота, при 2,5 мг – молочная кислота, как механизм обратного действия). Соотношение углерода и азота в среде оптимально как 11 : 1 (при его увеличении выход лизина падает, при уменьшении накапливается аланин). Важный фактор, обеспечивающий в культуральной среде высокие концентрации аминокислоты, синтезированной внутри клетки, – проницаемость клеточных мембран. Проницаемость клеточной мембраны увеличивают либо с помощью мутаций, либо путем изменения состава питательной среды. В последнем случае в культуральной среде создают дефицит

биотина (1–5 мкг/л), добавляют пенициллин (2–4 мкг/л), детергенты (твин-40 и твин-60) или производные высших жирных кислот (пальмитаты, стеараты). Биотин контролирует содержание в клеточной мембране фосфолипидов, а пенициллин нарушает биосинтез клеточных стенок бактерий, что повышает выделение аминокислот в среду.

Ферментацию проводят в стерильных условиях в глубинной аэробной периодической культуре в аппаратах объемом 50 и 100 м³ при коэффициенте заполнения 0,75. Процесс длится 48–72 часа при 29–30 °С, контролируемом рН 7,0–7,5, при непрерывном перемешивании и избыточном давлении. Уровень аэрации составляет 1 м³ воздуха/м³ питательной среды в минуту. При снижении аэрации происходит образование молочной кислоты. Для пеногашения используют кашалотовый жир или синтетические масла (0,5 % от объема среды). В первые сутки потребляется около 25 % сахаров и почти все аминокислоты. При этом образуется почти вся биомасса. Далее на фоне резкого снижения скорости роста клеток наблюдается самая высокая скорость синтеза лизина (до 1,0 г/литр в час). Для стабилизации рН периодически проводят его корректировку в культуре путем добавления 25 % раствора аммиака. При дополнительном дробном введении в аппарат углеводов и источников азота значительно повышается выход. Конечная концентрация кислоты достигает до 40 г/л при остаточной концентрации сахаров около 0,5–1,0 г/л.

2. Получение *L*-лизина на питательных средах, содержащих уксусную кислоту.

В состав питательной среды в качестве источника углерода входит смесь, включающая уксусную кислоту и свекловичную мелассу; в качестве источника азота – соли аммония, мочевины; в качестве источника биологически активных веществ – кукурузный экстракт (1,2–1,5 % по содержанию сухих веществ, гидролизат дрожжей, витамины группы В, биотин, микроэлементы (Р, Mg, Fe, Са и др.). Токсичность уксусной кислоты делает необходимой дробную подачу ацетата; его концентрация не должна превышать 2 %. Небольшие добавки сахара в среду (около 1 %) повышают выход лизина на 30–50 %.

Ферментация проводится в асептических условиях строго в глубинной аэробной периодической культуре в аппаратах объемом 50 и 100 м³. Про-

цесс длится 55–72 часа при 28–32 °С, контролируемом рН 7,0–7,2, непрерывном перемешивании и избыточном давлении. Уровень аэрации составляет 1 м³ воздуха/м³ питательной среды в минуту. При снижении аэрации происходит образование молочной кислоты. Для пеногашения используют кашалотовый жир или синтетические масла (0,5 % от объема среды). Конечная концентрация лизина в среде достигает до 50 г/л. При использовании мутантного штамма *B. flavum* обеспечивается выход лизина на ацетатной среде до 73,0 г/л.

Для получения очищенного препарата лизина, культуральную жидкость после отделения фильтрацией бактерий, подкисляют хлористоводородной кислотой до рН 1,6–2,0. Полученный монохлоргидрат лизина в культуральной жидкости подвергают хроматографии на катионите. Обладающая двумя положительно заряженными ионогенными группировками, лизин прочно сорбируется на смоле. При этом происходит сорбция лизина на катионите и отделение аминокислоты от культуральной жидкости. Десорбцию лизина проводят раствором аммиака. Полученный раствор аминокислоты в растворе аммиака концентрируется в вакууме при 60 °С до 30–50 % концентрации по сухому веществу. Концентрированный раствор охлаждают при температуре 10–12 °С. При охлаждении монохлоргидрат выпадает в виде кристаллов желтого цвета. Путем перекристаллизации полученной соли монохлоргидрата лизина в этиловом спирте удается получить субстанцию лизина с чистотой 97–98 % основного вещества. Существует возможность выделять высокоочищенный лизин и по другой схеме: ультразвуковая обработка бактерий, центрифугирование и ионно-обменная хроматография.

Предложен метод получения лизина за счет сорбции аминокислоты в двухзарядной форме, так как после ферментации культуральную жидкость (исходная концентрация лизина в культуральной жидкости 20 г/л) подкисляют серной кислотой до рН 1,5–1,9 и в охлажденном виде подают на ионообменную колонну с катионитом КУ-2-8 (смола ионообменная). После сорбции колонну промывают водой для удаления клеток, примесей и окрашенных пигментных веществ. Необходимо отметить, что лизин в процессе сорбции эффективно отделяется от сопутствующих аминокислот. При указанной величине рН (1,5–1,9) лизин обладает наибольшим сродством к катиониту. Десорбцию и элюирование проводят 4,5 % раствором аммиака с линейной скоростью 1,1–1,3 м³/час. Объединенная фракция со-

держит 126–130 г/л лизина. При проведении хроматографии снижается концентрация Na⁺, K⁺, Ca⁺² по сравнению с исходной концентрацией в 20, 12 и 11 раз, соответственно. В результате очистки из 2400 кг лизина, содержащегося в культуральной жидкости, выделено 1900 кг аминокислоты в виде обогащенной фракции. Аммиак из элюата удаляют нагревом раствора. После перекристаллизации получают 1400 кг очищенного лизина.

Для выделения и очистки лизина также можно использовать разделение аминокислот путем экстракции из водных растворов тройной смесью гидрофильных растворителей (бутиловый спирт – этилацетат – ацетон). Изменяя соотношение между компонентами, есть возможность разделять аминокислоты за счет их различной растворимости, например, разделить тирозин и глицин. Кроме того, существует возможность высаливания различных аминокислот в комплексе с сульфатами, хлоридами, нитратами – лития, натрия и калия. Установлено, что сульфат лития – наиболее эффективно осаждает аминокислоты.

1.2. Биотехнологическое получение триптофана

L-триптофан (α -амино- β -индолилпропионовая кислота) относится к незаменимым аминокислотам: $\text{CH}_2 - \text{NH}_2\text{CH} - \text{COOH}$. Триптофан, наряду с другими ароматическими аминокислотами, фенилаланином и тирозином находит все большее применение в фармакологии. Отсутствие или дефицит триптофана в организме приводит к ряду тяжелых заболеваний (диабет, туберкулез, пеллагра). В общем виде последовательность биосинтетических реакций образования триптофана следующая:

эритрозо-4-фосфат + фосфоенолпировиноградная кислота \rightarrow
7-фосфо-3-дезоксид-арабиногептулозная кислота \rightarrow 5-дегидрошикимовая кислота \rightarrow шикимовая кислота \rightarrow хоризмовая кислота \rightarrow антралиловая кислота \rightarrow триптофан.

Шикимовая кислота является основным промежуточным продуктом, из которого через 5-фосфо-3-енолпирувилшикимовую кислоту образуется хоризмовая кислота. Данная стадия является ключевой для синтеза ароматических аминокислот.

Таким образом, у бактерий аминокислота триптофан образуется из эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпировиноградной кислоты через ряд по-

следовательных реакций, включающих образование шикимовой и хоризмовой кислот, а непосредственным предшественником триптофана в процессе синтеза является анраниловая кислота. Необходимо отметить, что в зависимости от направленности синтеза можно получать триптофан, а также тирозин и фенилаланин (см. рис. 1).



Рисунок 1 – Микробиологический синтез L-триптофана

Микробиологический синтез L-триптофана осуществляется на основе мутантных штаммов дрожжей (*Candida*) и бактерий (*E. Coli*, *B. subtilis*), дефицитных по тирозину и фенилаланину.

Для смещения метаболических реакций по пути преимущественного образования триптофана необходимо блокировать превращение хоризмовой кислоты в префеновую. Такое блокирование достигается действием мутагенных факторов. У мутантов с пониженной активностью ферментов, катализирующих превращение хоризмовой кислоты в префеновую, наблюдается повышенный синтез аминокислоты триптофана, однако для нормального развития этих мутантов в питательную среду необходимо добавлять дефицитные аминокислоты – фенилаланин и тирозин в количестве, не вызывающем регуляторное ингибирование ферментов синтеза триптофана.

В промышленных условиях получения аминокислоты триптофана разработана технология на основе использования ауксотрофных мутантов бактерии *Bacillus subtilis* с нарушенным синтезом фенилаланина и тирозина. Ферментацию проводили в течение 48 часов при 37 °С. Концентрация триптофана в культуральной жидкости достигала 10 г/л. После отделения культуральной жидкости от бактериальных клеток её упаривают и высушивают при температуре 110–120 °С.

В настоящее время синтез триптофана проводится по двухступенчатой схеме: первоначально химическим синтезом получают предшественник триптофана – анраниловую кислоту, которую затем с помощью ферментов микробного происхождения превращают в триптофан.

Биохимическое превращение анраниловой кислоты в триптофан происходит в три этапа:

I этап – из анраниловой кислоты с участием фосфорибозилпирофосфата образуется аминокликозид-N(5-фосфорибозил)-анраниловая кислота;

II этап – в результате внутримолекулярной перегруппировки и декарбокислирования аминокликозид-N(5-фосфорибозил)-анраниловая кислота превращается в индол-3-глицерофосфат;

III этап – под действием фермента триптофансинтетазы из индол-3-глицерофосфата и аминокислоты серина осуществляется синтез триптофана. Источником ферментов для указанных реакций являются дрожжи.

Производственный процесс биохимического превращения антрапилиновой кислоты в триптофан проводится в две стадии:

I стадия – наращивается биомасса дрожжей (*Candida utilis*), которые являются продуцентами необходимых ферментов. Промышленный синтез L-триптофана осуществляется на основе сахаров. Питательная среда для выращивания дрожжевых клеток содержит свекловичную мелассу (содержание сахарозы около 10,0 %), мочевины (0,5 %), кукурузный экстракт (2,0 %) и минеральные соли (хлорид кальция, калий фосфорнокислый, сульфат магния). Ферментация проводится в течение 24 часов, при 30 °С. Процесс ферментации проводят в условиях интенсивной аэрации (около 7 грамм кислорода на литр питательной среды). Для пеногашения используют кашалотовый жир и синтетические кремнеорганические соединения. Далее интенсивность аэрации снижают в два раза и в ферментер вводят 5 %-ый спиртовой раствор антрапилиновой кислоты и 50 %-ый раствор мочевины.

II стадия – чрез 3–4 часа после добавления антрапилиновой кислоты в ферментер дополнительно подается углеродный субстрат – меласса в виде 25 % раствора. На последующем этапе ферментации периодически проводится подача антрапилиновой кислоты и мочевины через каждые 6 часов и раствора мелассы через каждые 12 часов.

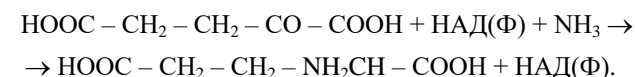
Длительность ферментации около 120 часов, а с учетом времени наращивания дрожжей – 144 часа. Содержание триптофана в культуральной среде около 60 г/л. После упаривания и сушки получают кормовой концентрат триптофана, содержащий 90 % сухого вещества, 48–54 % белка, 1–3 % триптофана и витамины. Для получения фармацевтической субстанции триптофана проводят очистку ионно-обменной хроматографией и при необходимости перекристаллизацией. При очистке можно получить кристаллический препарат триптофана, который содержит не менее 99 % триптофана в виде его хлорида.

1.3. Биотехнологическое получение глутаминовой кислоты

L-глутаминовая кислота (α -аминоглутаровая) – первая аминокислота, полученная на основе промышленного микробиологического синтеза: $\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2\text{CH} - \text{COOH}$.

Глутаминовая кислота является важнейшей аминокислотой животных и растительных белков. *Важное свойство глутаминовой кислоты* – ослаблять действие токсинов и усиливать фармакологическое действие ряда лекарственных препаратов при отравлениях внутренних органов (печени, почек).

Синтез глутаминовой кислоты происходит в цикле трикарбоновых кислот в результате ферментативного восстановительного аминирования 2-кетоглутаровой кислоты НАД(Ф)-зависимой глутаматдегидрогеназой:



Из изолимонной кислоты под воздействием изоцитратдегидрогеназы образуется 2-кетоглутаровая кислота. Необходимый для синтеза глутаминовой кислоты НАД(Ф)Н постоянно регенерируется в процессе окисления изолимонной кислоты в 2-кетоглутаровую.

Возможность получения глутаминовой кислоты из углеводов на основе микроорганизмов впервые была продемонстрирована в 1957 году японскими исследователями Киносита, Асаи и др. Производить глутаминовую кислоту способны дрожжи, микроскопические грибы, бактерии. Бактерии обеспечивают наибольший выход по отношению к использованному углеродному субстрату (не менее 40–50 %). Промышленное значение имеют бактериальные культуры (*Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*). Сверхсинтез кислоты у диких штаммов возможен в специальных физиологических условиях при торможении скорости роста и увеличении проницаемости клеточной мембраны для глутаминовой кислоты. Такие условия обеспечивает определенная концентрация биотина в среде (1–5 мкг/л), а также присутствие некоторых антибиотиков. Внутриклеточная концентрация глутаминовой кислоты снижается в результате

выделения продукции в окологлеточную среду, поэтому регуляция синтеза конечным продуктом ослабевает. Сверхпродукция глутаминовой кислоты связана также с высокой концентрацией аммония в среде, высокой активностью НАД(Ф)Н-зависимой глутаматдегидрогеназы и отсутствием или дефектом α -кетоглутаратдегидрогеназы, катализирующей превращение 2-кетоглутарата в янтарную кислоту. При выращивании бактерий на углеводном сырье (гидролизат крахмала, тростниковая или свекловичная меласса), на этаноле или ацетате и при дефиците биотина в культуральной среде накапливается глутаминовая кислота с концентрацией 30 г/л. *Важнейшее условие для образования этой аминокислоты* – подавление активности глутаматдегидрогеназы. При высоком содержании в среде биотина и солей аммония обеспечиваются условия для образования пролина, а при значительных концентрациях ионов аммония и ионов цинка в слабокислой среде обеспечиваются условия для синтеза глутамина.

Для получения высокоочищенной глутаминовой кислоты на первом этапе обработки культуральной жидкости в неё добавляют негашеную известь или известковое молоко. После этого избыток ионов осаждают кислотой, осадок удаляют центрифугированием. Фильтрат после осветления активированным углем и сорбции на ионообменных смолах концентрируют упариванием в вакууме при 40–60 °С. Осаждение кристаллов глутаминовой кислоты проводят в изоэлектрической точке (рН – 3,2 при 4–15 °С). В результате перекристаллизации чистота продукта достигает 99,6 %. Кристаллы кислоты отделяют от маточного раствора центрифугированием, промывают и высушивают.

Если нужно получить глутамат натрия, кристаллы глутаминовой кислоты обрабатывают гидроокисью натрия. Для этого влажные кристаллы растворяют в воде и нейтрализуют 50 % раствором едкого натрия. Полученный раствор фильтруют, концентрируют под вакуумом до содержания сухих веществ 60 % и направляют на перекристаллизацию. Полученные кристаллы глутамата натрия выделяют из маточного раствора центрифугированием и высушивают током горячего воздуха.

1.4. Биотехнологическое получение L-аланина

Аланин (аминопропионовая кислота) – заменимая аминокислота ($\text{NH}_2 - \text{C}_2\text{H}_4 - \text{COOH}$) – является важнейшим источником энергии для мышечной ткани, головного мозга, центральной нервной системы. Аланин укрепляет иммунную систему, участвует в метаболизме сахаров.

Основным недостатком первоначально используемых аланинпродуцирующих штаммов была их неспособность накапливать аланин в ферментационной среде в виде чистого оптического L-изомера. Установлено, что причиной накопления аланина в виде рацемической смеси (L- и D-изомеров) является присутствие в исследованных микроорганизмах аланин-рацемазы. Японскими и китайскими учеными с помощью мутагенеза были получены продуценты аланина – *Corynebacterium gelatinosum* No. 7183, *Brevibacterium flavum* ATCC 21269, последний из которых после 72-часовой ферментации в колбах накапливал в питательной среде 45 г/л D-, L-аланина. До конца 60-х годов лучшим продуцентом L-аланина являлся полученный Самеджима и сотрудниками штамм *Corynebacterium gelatinosum* 483, который к концу ферментации накапливал в культуральной жидкости 17,5 г/л L-аланина при начальной концентрации глюкозы, равной 10 %. Теми же исследователями было доказано, что биосинтез L-аланина у данного штамма протекает в основном по L-аланиндегидрогеназному пути. Ученым в Армении удалось получить штаммы-продуценты L-аланина, которые отличались от ранее известных, во-первых, тем, что синтез в них протекает по трансаминазному пути, а во-вторых, тем, что штаммы из *Corynebacterium* или *Brevibacterium* были целенаправленно лишены аланин-рацемазы. При использовании сахарозы в качестве источника углерода на минимальной среде штамм *Brevibacterium flavum* AA 5 продуцировал до 42 г/л L-аланина.

В дальнейшем были разработаны штаммы, продуцирующие значительно больше L-аланина. Так, штамм LAP7 из рода *Arthrobacter*, обладающий выраженной L-аланиндегидрогеназной активностью и лишенный аланил-рацемазы, в условиях подпитки глюкозой продуцировал до 76,7 г/л L-аланина. Близкое количество (до 71 г/л) L-аланина накапливается в ферментационной среде при использовании рекомбинантных штаммов с введенными L-аланиндегидрогеназными генами (*Escherichia*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*) при лимитированной подаче кислорода.

Приведенные данные, относящиеся к микробному синтезу L-аланина, свидетельствуют о том, что достигнутые результаты в ряде случаев превосходят аналогичные показатели для многих других аминокислот, промышленное производство которых основано на микробном синтезе. Однако, несмотря на это, в литературе отсутствуют какие-либо сведения относительно применения этих способов для производства L-аланина в промышленных целях. Существует мнение, что микробный синтез L-аланина может стать конкурентоспособным при условии накопления продукта в культуральной жидкости – не менее 200–400 г/л.

Сегодня для получения L-аланина разработаны два основных направления: первое – энзиматическое расщепление производных рацемического аланина, которое позволяет также получить D-аланин, и второе – получение L-аланина энзиматическим декарбоксилированием L-аспарагиновой кислоты. Известны также способы получения L-аланина из пировиноградной кислоты с применением L-аланин-дегидрогеназы и из L-аспарагиновой кислоты с использованием трансминазы.

Основным способом получения L-аланина является ферментативное декарбоксилирование L-аспарагиновой кислоты с применением L-аспарат-β-декарбоксилазы микроорганизмов (*Pseudomonas dacunhae*, *Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter*) при оптимальном pH = 5,5–5,7 (см. рис. 2). Величина pH определяет эффективность проведения реакции декарбоксилирования.

Согласно проведенному анализу, по признаку регулирования pH процесса декарбоксилирования, известные способы и технологии разделены на 5 групп:

- ✓ процессы без регулирования pH реакционной среды (допускается свободное удаление CO₂ из реакционной среды);
- ✓ процесс с регулированием pH посредством предотвращения удаления CO₂ из реакционной среды;
- ✓ использование буферных систем (для стабилизации pH на стадии декарбоксилирования в реакционную среду добавляется 0,15 М трис-буфер);
- ✓ использование минеральных кислот в качестве титранта (добавление 5н H₂SO₄);
- ✓ использование кристаллической L-аспарагиновой кислоты в качестве субстрата и титранта одновременно.

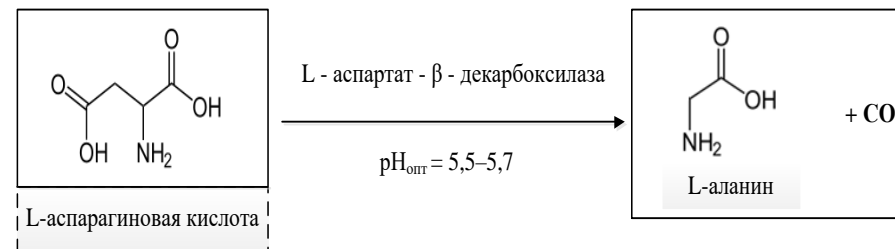


Рисунок 2 – Получение L-аланина путем ферментативного декарбоксилирования L-аспарагиновой кислоты

Использование аминокислот в составе фармацевтических препаратов требует разработки новых штаммов продуцентов, отличающихся сверхсинтезом целевого продукта, создания новых высокоэффективных технологий их получения, включая разработку питательных сред, оптимизации процесса ферментации и очистки аминокислот.

Одним из таких направлений является поиск продуцентов, способных ферментировать аминокислоты на доступном и дешевом сырье. Одним из видов такого сырья является метан. Интерес представляет работа авторов, в которой предложен способ получения заменимых и незаменимых L-аминокислот, основанный на ферментации утилизирующих метан бактерий (*Methylomonas albus*, *Methylococcus capselatus*, *Methylosinus trichosporium*) на питательной среде в присутствии газа, содержащего метан, как основного источника углерода. Аминокислоты L-лизин и L-глутамат накапливаются в питательной среде, из которой могут быть выделены.

Предложена также технология получения L-аминокислот путем культивирования бактерий рода *Bacillus*, обладающих способностью продуцировать L-аминокислоты в среде, содержащей метанол в качестве источника углерода. Причем аминокислоты накапливаются как в клетках бактерий, так и в питательной среде. При этом в бактерию введен ген метанолдегидрогеназы, а активность гексулозофосфатсинтетазы и фосфогексулоизомеразы усилена. Установлена высокая эффективность бактерий, как производителя аминокислот. Возможность получения L-лизина показана для метанолутилизирующих бактерий *Methylohilus methylotropus* в пи-

тательной среде, которая в качестве единственного источника углерода содержала метанол. Для роста бактерий требуется присутствие в среде метионина, фосфата аммония, K, Na, Mg, Mn, Zn, Cu; pH питательной среды – 5,0–8,0. Выращивание проводили при 25–45 °С. Состав питательной среды в значительной степени определяет свойства штамма продуцента, в том числе, и количество синтезируемых аминокислот. Причем, важным является качество используемой воды. Так, например, при выращивании *Saccharomyces oviformis* на геотермальной воде в среде обнаружено повышение внутриклеточного синтеза аминокислот.

L-глутамилгидрин использовали как субстрат при синтезе треонина, катализируемого клетками *E. Coli*, которые обладают L-глутамилтранспептидазной активностью (GGT). В оптимизированных условиях реакции при L-глутамилгидрина – 0,3 моль/л, этиламина – 3 моль/л, GGT-клеток – 0,018 г/мл, ферментацию проводили при температуре 40 °С в течение 40 часов. В результате культивирования штамма была получена аминокислота треонин в концентрации 0,25 моль/л. Степень конверсии L-глутамилгидрина в треонин составила 84,1 %.

Примером применения γ -облучения для получения высокоэффективных продуцентов аминокислот путем мутаций является культура *Streptomyces canosus CNMN-71*, которая после облучения получила название *Streptomyces canosus CNMN-71 var 3-III-6*. Культивирование двух штаммов вели на среде, содержащей кукурузную и соевую муку. Выход культуры после облучения был в 1,59 раза больше, что сопровождалось увеличением выхода аминокислот.

Одним из инструментов при создании новых высокопродуктивных штаммов-продуцентов является генная инженерия. На возможность получения аминокислот с использованием рекомбинантных штаммов бактерий указывают исследования культивирования микроорганизмов родов *Escherichia*, *Serratia*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, обладающих трансминазной активностью и катализирующих реакцию между аланином и пировиноградной кислотой и реакцию между 2-оксоизовалериановой кислотой и L-валином. Выращивая бактерии в аэробных условиях на среде, содержащей углерод, азот, витамины, минеральные соли (pH – 7,2) в течение 7 суток при 25–40 °С были получены L-лейцин (или L-изолейцин).

Используя для выращивания питательную среду, содержащую углерод, азот, кислоты (уксусная, молочная, янтарная), мочевины, ионы хлора, сульфаты, карбонаты возможно получение L-лизина, L-аргинина, L-гистидина.

На протяжении последних 15 лет ведущее положение в России занимает НИИ Аджиномото – Генетика «АГРИ» Использование передовых технологий генной инженерии и методы биотехнологической селекции сотрудники «АГРИ» проводят молекулярные исследования и создают на основе *E. Coli* новые микроорганизмы – продуценты аминокислот. Микроорганизмы рода *Escherichia* перспективны в качестве потенциальных продуцентов L-аминокислот благодаря их быстрому росту, большому количеству данных генетического анализа и возможности генетического конструирования.

Классический подход к селекции штаммов-продуцентов основанный на отборе случайных мутаций, приводит к возникновению продуцентов с пониженной жизнеспособностью. Для введения мутаций путем генной рекомбинации могут применяться следующие действия. Конструируется мутантный ген, кодирующий мутантный белок со сниженной активностью, и бактерии для её модификации трансформируются фрагментом ДНК, содержащим мутантный ген. Затем нативный ген на хромосоме замещается путем гомологичной рекомбинации мутантным геном, отбирается полученный ген. Далее, введение сайт-специфической мутации путем замещения гена с использованием вышеупомянутой гомологичной рекомбинации может быть осуществлено с помощью использования плазмиды с пониженной способностью к репликации в клетке-хозяина. Экспрессия гена также может быть ослаблена вставкой транспозона (транспозон – последовательность ДНК, способная перемещаться внутри генома) в кодирующую область гена, или традиционными методами, такими как мутагенез с использованием УФ-излучения или обработкой нитрозогуанидином.

В работе взят штамм *C. glutamicum* дикого типа. В него введены такие же регуляторные мутации оперона *arg*, как и штаммов – продуцентов аргинина. Подобрано наиболее удачное сочетание мутаций для синтеза аргинина *argR* и *argB26*. Полученный продукт назван RB. Для увеличения выхода продукта в штамм RB введена мутация *leuC456*, вызывающая гло-

бальную индукцию генов биосинтеза аминокислот. Ген *argV* бактерии *C. glutamicum* заменен геном *argB* бактерии *E. Coli*, чья экспрессия исходно не подавляется аргинином. Производительность аминокислоты – аргинина увеличена в 3 раза, что указывает на то, что в штамме RB лимитирующим фактором является активность гена *argB*.

В литературе описан способ получения L-аминокислот с использованием бактерий *Escherichia*, которые модифицированы таким образом, что содержат глицеринкиназу, в которой ингибирование фруктозо-1,6-дифосфатом по типу обратной связи ослаблено. Указанная глицеринкиназа содержит замену, по крайней мере, одной аминокислоты на другую в области, соответствующей положениям с 233 по 235 в аминокислотной последовательности глицеринкиназы дикого типа.

Большой цикл работ посвящен получению аминокислот при использовании рода *Escherichia*. Предложены штаммы *E. Coli 57* и *E. Coli 103*, которые продуцируют L-лейцин и его аналоги и устойчивы к этим аминокислотам. Штаммы накапливают на среде с глюкозой 1,5–1,7 г/л лейцина за 48 часов в аэробных условиях при температуре 30–38 °С. Оптимальный рН 6,5–7,2. Скорость вращения 250 об/мин. Состав питательной среды: глюкоза – 6,0 %, сульфат аммония – 1,5 %, гидрофосфат калия – 0,15 %, магния сульфат – 0,1 %, тиамин – 100 мкг/л, мел – 2,0 %, рН при культивировании поддерживали либо аммиаком, либо кислотами. Указанные штаммы получали из штамма *E. Coli K-12* методом ступенчатой мутации. Мутант по каждой устойчивости отбирают из спонтанных мутантов. *E. Coli K-12* высевают на агаровые среды, содержащие различные концентрации L-лейцина или его аналогов. Затем отбирают выросшие штаммы с максимальной продуктивностью. L-треонин получен на *E. Coli*, модифицированной таким образом, что ген *uahN* (в других работах – ген *msbA*) инактивирован. Установлена высокая степень эффективности получения аминокислоты треонин при ослаблении экспрессии гена *uahN* осуществленного путем его инактивации.

Препараты аминокислот выпускаются фармацевтической промышленностью в разных лекарственных формах: таблетки, растворы для инъекционного и инфузионного введения (Изолейцин, Валин, Лейцин, Пролин, Тирозин, Триптофан, Фенилаланин), глазные капли (Цистеин для пре-

дупреждения и лечения катаракты, вызванной облучением, миопатией, контузиями и возрастными изменениями).

В ряде мировых фармакопей приводятся частные статьи, описывающие требования к фармацевтическим субстанциям аминокислот. В табл. 2 приведены характеристики аминокислот, используемых в фармацевтических препаратах.

Таблица 2 – Физико-химические характеристики аминокислот

Наименование аминокислоты	Формула	Количественное определение (%), метод	Оптическое вращение	Подлинность	Железо, ppm (не более)
Лейцин	$C_6H_{13}NO_2$	98,5–101 Титриметрия	+14,5 – +16,5	ИК-спектр, ТСХ-нингидрин	10
Лизина ацетат	$C_8H_{18}N_2O_4$	98,5–101 Титриметрия	+8,5 – +10,0	ИК-спектр, ТСХ-нингидрин	30
Лизина хлорид	$C_6H_{15}ClN_2O_2$	98,5–101 Титриметрия	+21 – +22,5	ИК-спектр, ТСХ-нингидрин	30
Триптофан	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	98,5–101 Титриметрия	-30 – -33	ИК-спектр, ВЭЖХ, ТСХ-нингидрин	20
Тирозин	$C_9H_{11}NO_3$	98,5–101 Титриметрия	-11 – -12,3	ИК-спектр, ТСХ-нингидрин	10
Глицин	$C_2H_5NO_2$	99,0–101 Титриметрия	-	ИК-спектр, ТСХ-нингидрин	-

Все аминокислоты представляют собой порошки белого цвета. Содержание воды – не более 0,5 %, тяжелые металлы – не более 10 ppm, хлориды – не более 200 ppm, сульфаты – не более 300 ppm, аммоний – не более 200 ppm, сульфатная зола – не более 0,1 %. Для определения аминокислот и пептидных субстанций в лекарственных средствах перспективным методом является обращено-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография.

В качестве примера фармакологической активности можно рассмотреть препарат «Октамин плюс» (в форме капсул), который содержит 8 аминокислот:

➤ *Валин*, который необходим для восстановления тканей и метаболических процессов в мышцах в случае тяжелых нагрузок и для поддержки нормального обмена азота в организме;

➤ *Изолейцин*, который способствует образованию гемоглобина, стабилизирует уровень глюкозы в крови;

➤ *Лейцин*, который в соединении с Валином и Изолейцином, защищает мышечные ткани и является источником энергии, и способствует восстановлению костей, кожи, мышц, снижает уровень сахара в крови и стимулирует выделение гормона роста;

➤ *Метионин*, который обеспечивает детоксикацию тяжелых металлов, эндогенных и экзогенных токсинов, обладает антиоксидантной активностью, инактивирует свободные радикалы;

➤ *Треонин*, который в соединении с Метионином поддерживает липотропную функцию печени, играет важную роль в образовании коллагена и эластина, повышает иммунитет;

➤ *Фенилаланин*, который принимает активное участие в синтезе белков, повышает умственную активность, память, способствует улучшению секреторной деятельности поджелудочной железы и печени;

➤ *Триптофан*, который необходим для синтеза важного нейромедиатора витамина В₃;

➤ *Лизин* снижает уровень триглицеридов в сыворотке крови, проявляет противовирусное действие, например, к вирусу герпеса.

В препарат «Факовит» (таблетки) входят две аминокислоты:

➤ *Глутаминовая кислота*, которая является важной составляющей мышечной ткани и влияет на синтез гормона роста;

➤ *Глицин* обладает седативным действием, улучшает метаболические процессы в мозговой ткани. Аминокислота глицин входит в состав многих лекарственных препаратов. Помимо седативного действия проявляет снотворное и психостимулирующее действие, уменьшает влечение к алкоголю и проявление абстинентного синдрома. Кроме того, глицин входит в качестве стабилизатора в ряд белковых препаратов: иммуноглобулины различной направленности, вакцины и др.

Одним из направлений использования аминокислот является их вспомогательная функция в составе лекарственных препаратов. В настоящее время решению проблемы предотвращения нежелательного окисления жировых компонентов эмульсий лекарственных препаратов посвящено большое количество исследований. В последние годы появились данные

об антиоксидантном действии аминокислот и белков в радикально-цепных процессах окисления. Для примера можно привести работу авторов, изучающих антиоксидантное действие аминокислот в эмульсиях подсолнечного масла. Сравнивая антиоксидантное действие аминокислот при одинаковой концентрации (5×10^4 моль/л), обнаружены наиболее эффективные гидрохлориды аргинина, лизина и гистидина. Наибольшими антиоксидантными свойствами обладал триптофан. Композиция L-аланина с глицином предлагается для лечения гепатита.

Лекарственные препараты, содержащие аминокислоты нашли широкое применение в качестве средств для парентерального питания. После парентерального введения они включаются в пул свободных аминокислот организма и участвуют во всех метаболических процессах, в частности используются для синтеза белков. Совместно с растворами углеводов, жировыми эмульсиями, а также с препаратами витаминов, электролитов и микроэлементов обеспечивают полное парентеральное питание.

Сегодня в Украине зарегистрирован ряд аминокислотных инфузионных препаратов:

▪ *Аминовен инфант*, 10 %-ый (Fresenius Kabi Deutschland), используемый для парентерального питания новорожденных детей, детей раннего возраста и недоношенных.

▪ *Аминол* (Юрия-Фарм), используемый до и после обширных оперативных вмешательств, при черепно-мозговых травмах, ожоговой болезни, тяжелых инфекционных заболеваниях, длительной глубокой коме, продолжительной диарее и др. заболеваниях.

▪ *Аминоплазмаль Гепат* (В. Braun), 10 %-ый, используемый для обеспечения организма аминокислотами при парентеральном питании пациентов с тяжелой печеночной недостаточностью, а также при угрозе развития печеночной недостаточности.

▪ *Аминосол* (Немофарм), используемый при тяжелых заболеваниях органов пищеварения, при травмах, ожогах, сепсисе и других заболеваниях.

▪ *Аминостерил* (Fresenius Kabi, Austria), используемый при тяжелом нарушении функции печени (печеночная недостаточность) и печеночной коме.

В табл. 3 приведен аминокислотный состав препаратов для парентерального питания.

Таблица 3 – Аминокислотный состав лекарственных препаратов

Аминокислоты	Аминовен, 10 %-ый	Аминол	Аминоплазмаль ГЕПА 10 %-ый	Аминосол НЕО 10%-ый	Амино-стерил КЕ 10%-ый
Аргинин	0,75	0,64	0,88	1,2	1,06
Лейцин	1,3	0,98	1,36	0,74	0,706
Изолейцин	0,8	0,44	0,88	0,50	0,467
Метионин	0,312	0,57	0,12	0,43	0,41
Фенилаланин	0,375	0,7	0,16	0,51	0,482
Аланин	0,93	0,64	0,83	1,4	1,5
Пролин	0,97	0,64	0,71	1,12	1,5
Валин	0,9	0,49	1,06	0,62	0,592
Треонин	0,44	0,43	0,46	0,44	0,421
Лизин	0,851	1,15	1,06	0,66	0,597
Глицин	0,415	0,8	0,63	1,1	1,595
Гистидин	0,476	0,32	0,47	0,3	0,288
Серин	0,767	-	0,37	0,65	-
Тирозин	0,52	-	0,09	0,04	-
Триптофан	0,2	0,14	0,15	0,2	0,182
Цистеин	0,077	-	-	-	-
Глутаминовая кислота	-	-	0,57	-	-

Как видно из приведенных в табл. 3 данных, в состав указанных препаратов входят основные аминокислоты в количестве от 14 до 16 аминокислот.

Сегодня за рубежом 60 % мощности по биотехнологическому производству аминокислот занимает глутаминовая кислота, полученная с использованием штаммов *Corynebacterium*. Наибольшее количество производится метионина, лизина и глицина. В кормах используется 66 % от общего количества аминокислот, 31 % в пищевых продуктах, 4 % в медицине и косметике. Аминокислоты широко используются в современной фармакологии. Некоторые из них (глутаминовая кислота, глицин, метионин и др.) нашли самостоятельное применение в качестве лекарственных средств. В настоящее время расширяется круг новых лекарственных препаратов, синтезируемых с помощью аминокислотных остатков пептидов: даларгин, тимогин, окситоцин и др. Важное значение имеют смеси аминокислот, используемых в качестве средств для парентерального питания.

Контрольные вопросы

1. Приведите классификацию аминокислот и их основные свойства.
2. Опишите основные штаммы продуценты аминокислот.
3. Почему часто прибегают к использованию генно-инженерных конструкций для получения аминокислот?
4. Какие вопросы решает генная инженерия при создании штаммов сверх продуцентов?
5. С какой целью используют различные мутации при создании штаммов сверх продуцентов аминокислот?
6. Какие требования предъявляют к питательным средам при производстве аминокислот.
7. Опишите основные фазы роста продуцентов аминокислот и укажите, каким образом можно влиять на увеличение биосинтеза.
8. Какие критические стадии получения Лизина на питательных средах, содержащих сахара Вам известны?
9. Какие критические стадии получения Лизина на питательных средах, содержащих уксусную кислоту Вам известны?
10. Каковы отличительные особенности технологии получения триптофана?
11. Опишите технологию получения глутаминовой кислоты.
12. Опишите технологию получения L-глутамин.
13. Каким образом проводится селекция штаммов продуцентов аминокислот?
14. В чем преимущества получения аминокислот биотехнологическими методами по сравнению с их выделением из природных источников?
15. Какие основные методы используются для очистки аминокислот?
16. Какие методы контроля аминокислот используется для оценки этих соединений как фармацевтических субстанций?
17. Приведите примеры применения различных аминокислот в составе лекарственных препаратов.
18. С какой целью аминокислоты вводят в состав лекарственных препаратов?

ГЛАВА 2. BIOTEХНОЛОГИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ ДРОЖЖЕЙ

Производство препаратов из дрожжей начинается с производства различных штаммов дрожжей. Технологический процесс выращивания пекарских дрожжей состоит из отдельных стадий: приготовление питательной среды, выращивание дрожжевой массы, выделение, формирование и упаковка прессованных дрожжей. Мы считаем нецелесообразным, подробно останавливаться на производстве дрожжевой биомассы, так как ранее было выпущено учебное пособие (Клещев Н.Ф., Бенько М.П. Общая промышленная биотехнология: Технология бродильных производств. – Харьков, НТУ «ХПИ», 2007), которое подробно описывает процесс производства дрожжей. Получение препаратов из дрожжей в большинстве случаев требует проведения подготовительной стадии – автолиза дрожжей.

2.1. Метод автолиза дрожжей

Автолиз клеток рассматривают как необратимый процесс, связанный с гибелью клеток, сопровождающийся гидролизом внутриклеточных биополимеров под действием собственных ферментов, высвобождением во внеклеточное пространство низкомолекулярных продуктов и начинающийся с разрушения клеточной оболочки. Под последней понимается функциональный комплекс клеточной стенки и цитоплазматической мембраны (ЦПМ). Проведение лизиса клеточных стенок при получении фармацевтических продуктов во многом определяет качество конечного продукта т.к. необходимо получать биологически активные вещества в не деградированном виде.

У микроорганизмов наблюдают *две разновидности автолиза* – *экзо- и эндотипы*. Стафилококкам, стрептококкам и ряду других бактерий свойственен экзотип автолиза, при котором под действием собственно автолизина разрушается клеточная стенка, но сохраняется ЦПМ в осмотически защищенной среде. Эндотип автолиза характерен для дрожжей, плесневых грибов, бацилл и связан с первоначальным разрушением липидов и липопротеиновых структур клеточных мембран.

Кроме деления на экзо- и эндотипы, различают *естественный и индуцированный автолиз*. К естественному можно отнести автолиз клеток микроорганизмов в постстационарной фазе отмирания микробных культур. Индуцированный автолиз может быть вызван у клеток любой фазы роста микробных культур как результат воздействий, приводящий к необратимым структурным и функциональным нарушениям клеточной оболочки. Мы рассмотрим индуцированный автолиз дрожжей, т.к. именно этот тип в большинстве случаев применяется для получения фармацевтических продуктов из дрожжей.

Для нарушения целостности клеточной оболочки применяют индукторы автолиза. *Автолиз дрожжевых клеток может быть обусловлен тремя воздействиями:* физическими, химическими, биологическими.

Физические факторы:

➤ температура – для дрожжей оптимальный интервал температуры 40–70 °С. Автолиз сопровождается резким повышением проницаемости клеточных мембран, в первую очередь ЦПМ. Термообработка при отсутствии кислорода повышает активность дрожжевых автолизина, т.е. ферментов, разрушающих биополимеры;

➤ осмотическое давление среды – в технологической практике для этой цели применяют повышенное содержание натрия хлорида или некоторых других солей. В результате повышения осмотического давления ЦПМ дрожжевых клеток полностью разрушаются;

➤ механическое разрушение – приводит к нарушению компартиментализации автолитического ферментного комплекса, а у дрожжей и грибов к высвобождению лизосомальных протеаз, что обеспечивает субстрат-ферментные взаимодействия автолитических гидролаз с компонентами мембраны и биополимерами клеточной стенки, приводящие к их разрушению.

Химические факторы:

➤ ионная сила, рН среды и качественный состав ионов. Установлено, что большинство литических ферментов более активны при низкой ионной силе раствора. Высокие концентрации галогенов в солях натрия и калия хлористого, бромида натрия, хлористого аммония специфически активизируют ферменты автолитического комплекса. Соли щелочноземель-

ных металлов, кобальта, марганца оказывают незначительное влияние на интенсивность автолиза. Соли меди, железа и цинка в концентрации 0,2–0,5 мМ подавляют процесс, а ионы кальция или магния в концентрации 10 мМ стабилизируют клеточные биополимеры и предотвращают повреждение субклеточных структур. Например, на среде с глюкозой в присутствии ионов кадмия в концентрации 0,05 мМ число жизнеспособных клеток *Saccharomyces cerevisiae* уменьшается на 90 % через 5 минут и на 99,9 % через 60 минут, тогда как на среде без глюкозы токсического действия кадмия в этой концентрации не наблюдается.

Биологические факторы:

➤ аминокислоты, белки, ферменты, фракции клеточных гидролизатов. Указанные вещества влияют на целостность клеточных мембран и их функциональную активность. Так, например, глицин, аланин, метионин, фенилаланин и пролин в концентрациях 10^{-3} – 10^{-5} М повышают верхний предел температуры повреждения мембран дрожжевых клеток на весьма значительную величину (3–9 °С). Существенное влияние на индукцию автолиза оказывают антибиотики, влияющие на синтезную и деполимеризующую активности системы синтеза клеточной стенки.

Для автолиза дрожжевых клеток применяют литические ферменты. В качестве ферментов обладающих протеолитической активностью могут быть использованы такие ферменты как пепсин, трипсин, лизоцим, папаин и др. Применяют также и другие виды ферментов, например, β-глюконаза, обработку которой проводят при 30 °С в течение 30 минут.

Особую роль при проведении автолиза дрожжей играют детергенты:

▪ *анионные* (додецилсульфат натрия, N-лауроилсаркозинат натрия, жирные кислоты) – в мембранах дрожжей они вызывают уменьшение содержания общих липидов и фосфолипидов и компенсаторное увеличение степени ненасыщенности жирных кислот, приводя в конечном итоге, к критическому повышению текучести мембран и её дестабилизации. Наиболее эффективно приводят к автолизу ненасыщенные жирные кислоты. Ненасыщенные жирные кислоты в высокой концентрации вызывают дестабилизацию мембран. Механизм этого действия заключается в способности ненасыщенных жирных кислот растворяться в мембране без уча-

стия ацилпереносящего белка и снижать температуру плавления мембранных липидов, что ведет к увеличению текучести мембраны. Наиболее активными оказываются те ненасыщенные жирные кислоты (олеиновая, линолевая), которые обладают собственной низкой температурой плавления. При этом увеличение текучести мембраны сверх некоторого предела оказывается губительным для клеток и является причиной их автолиза;

▪ *катионные* (цетилтриметиламмония хлорид (бромид)) – лизируют клеточные ядра, денатурируют белки и образуют с ними положительно заряженные комплексы, образуют соли ДНК и РНК, растворимые при концентрации натрия хлорида более 0,7 М. Это позволяет избирательно осадить ДНК и РНК в виде солей цетилтриметиламмония в водных растворах при низкой концентрации натрия хлорида. Осадок ДНК и РНК в виде солей цетилтриметиламмония растворяется в 1 М натрия хлорида. Благодаря гидрофобности молекул детергента, происходит их проникновение в липидный бислой, что приводит к дезорганизации липидных компонентов бислоя мембраны, вызывает нарушение их барьерных функций и приводит к автолизу клетки;

▪ *нейонные* (Тритон X-100, Нонидет NP-40) – их антимикробная активность невелика, хотя они обладают способностью изменять структуру клеточной оболочки микробной клетки, высвобождая белки, липиды, углеводы, липополисахариды. Это ведет к проницаемости ЦПМ и увеличению пор в клеточной стенке, что повышает степень лизиса клеток при их обработке ферментами и антибиотиками.

В клетках дрожжей структурные преобразования генерализованного характера, начавшись в ЦПМ, распространяются по всей клетке за счет непрерывной сети мембран эндоплазматического ретикулума, и таким образом вся клетка включается в физиологический ответ на внешнее воздействие. Поэтому довольно часто в качестве индукторов используют мембранотропные соединения, вызывающие общие нарушения структурной организации мембран дрожжевых клеток, и вследствие этого, их барьерных функций, что приводит к выходу из клетки жизненно важных метаболитов, т.е. к автолизу клеток микроорганизмов.

Автолиз дрожжей можно проводить в периодическом и непрерывном режимах.

Характеристиками автолиза служат интенсивность процесса и глубина распада клеточных структур.

Интенсивность автолиза определяется скоростью реализации продуктов гидролиза клеточных биополимеров и как суммарный ферментативный процесс зависит от:

- количества гидролаз;
- активности гидролаз;
- физико-химических условий среды;
- субстратной устойчивости клеточных компонентов к действию ферментов автолитического комплекса.

Глубина автолиза измеряется соотношением общего количества имеющихся в клетке до автолиза белков, полисахаридов, нуклеиновых кислот и их гидролизовавшейся частью. Глубина и скорость автолиза зависят от физиологического возраста клеток. Клетки экспоненциально растущей культуры автолизуются быстрее и в большей степени, чем клетки стационарные, полного лизиса которых, как правило, добиться не удается. Индукция автолиза предусматривает создание дисбаланса между процессами синтеза и деградации клеточных структур. Интенсивность автолиза определяется характером выбранного индуктора и физико-химическими условиями, оптимальными для лишения клетки энергии и нарушения структуры клеточной оболочки. *При выборе индуктора* многие авторы предпочитают использовать ненасыщенные жирные кислоты, что связано, во-первых, с тем, что они являются естественным компонентом клетки, и поэтому нет необходимости удалять их из полученного продукта (автолизата), во-вторых, жирные кислоты доступны и достаточно дешевы.

Хорошим биологическим тестом для подбора индуктора является определение его влияния на дыхание клеток, так как этот показатель количественно отражает изменения функциональной активности мембран, обусловленные нарушениями их структурной организации, что и является причиной автолиза.

В качестве примеров рассмотрим несколько методов лизирования пекарских дрожжей (*S. cerevisiae*).

Пример 1 проведения автолиза дрожжей. Клетки дрожжей суспендируют в воде до конечной концентрации 12–20 % (в пересчете на сухие вещества) и добавляют олеиновую кислоту в количестве 0,1–0,3 % к количеству дрожжей. Смесь тщательно перемешивается при 45–55 °С в течение 30 минут для полного связывания олеиновой кислоты и дрожжевых клеток. Затем к смеси добавляют гипохлорит натрия в количестве 0,1–0,3 %. Процесс автолиза проводится при 45–55 °С в течение 20 часов. После проведения автолиза суспензию сепарируют с целью разделения на водорастворимую фракцию и остаток дрожжевых клеток. Водорастворимую фракцию концентрируют в вакууме и высушивают. Выход из 10 кг дрожжей составляет 4,1 кг сухого продукта. Продукт глубокого автолиза представлен следующим составом: аминный азот – 6,7 %; нуклеиновые кислоты – 1,45 %; углеводы – 11,6 %; липиды – 8,3 %; зола – 3,5 %; вода – 5,6 %.

Пример 2 проведения автолиза дрожжей. Клетки дрожжей хлебопекарских суспендируют в воде до конечной концентрации 14 % (в пересчете на сухие вещества) и смесь подвергают автолизу в течение 8 часов в присутствии олеиновой кислоты при температуре 50–55 °С, при pH – 6,8–7,2. Продукты автолиза постоянно перемешивают. Через 3 часа после начала автолиза вносят фермент. После окончания гидролиза суспензию прогревают при температуре 90 °С в течение 30 минут. Отделяют растворенные в экстракте вещества от остатков дрожжевой биомассы путем центрифугирования. Экстракт продуктов автолиза концентрируют до 18 % сухого вещества путем упаривания в вакууме, а затем высушивают на распылительной сушке. Выход сухого продукта автолиза дрожжей 3 кг из 10 кг пекарских дрожжей. Содержание аминного азота составляет 2,8 %.

2.2. Получение нуклеиновых кислот из дрожжей

Экзогенные нуклеиновые кислоты, и в частности, РНК, а также продукты её частичного гидролиза имеют широкий спектр биологических эффектов:

- ❖ стимуляция процессов клеточного метаболизма с активацией синтеза эндогенных нуклеиновых кислот, специфических белков и ферментов;
- ❖ повышение митотической активности клеток;
- ❖ активация гипофиз-адреналовой системы;
- ❖ стимуляция репаративных процессов с освобождением регенерирующей ткани от необходимости осуществления сложного и энергоёмкого синтеза оснований для простых предшественников;
- ❖ иммуномодулирующая активность;
- ❖ активация образования белков в клетках костного и головного мозга;
- ❖ стимуляция синтеза АТФ.

К этим свойствам за последнее время добавлены данные о противовоспалительном действии низкомолекулярной дрожжевой РНК, которая за счет механизмов угнетения расщепления фосфолипидов клеточной мембраны до свободной арахидоновой кислоты и её дальнейшего окисления по липоксигеназному и циклогеназному путях, стабилизирует клеточные мембраны.

Промышленное культивирование большинства микроорганизмов с целью выделения ДНК и РНК экономически нецелесообразно. Поэтому выбор определен микроорганизмами, которые культивируют в промышленных масштабах, например, пекарские или пивные дрожжи.

Дрожжевая РНК является субстанцией для получения ряда фармацевтических препаратов, таких как нуклеинат натрия, ридостин, энкад и др.

Технология выделения РНК дрожжей состоит из нескольких основных стадий:

Стадия I. Микроорганизмы из культуральной среды при температуре 4 °С осаждают низкоскоростным центрифугированием, осторожно ресуспендируют в изотоническом растворе и повторно осаждают центрифугированием. Отмытые дрожжевые клетки ресуспендируют в растворе для гомогенизации или лизирующем растворе.

Стадия II. Разрушение клеток (лизис) и осветление лизата путем удаления нерастворимых частиц. Из полученного осветленного лизата выделяют РНК с дальнейшей очисткой. Для оптимальных условий лизиса используются сочетание анионных детергентов (додецилсульфат натрия) и протеаз. Для разрушения клеток используется баллистическая дезинтеграция, при которой степень разрушения дрожжевых клеток легко регулируется и хорошо воспроизводится. Баллистическая дезинтеграция не требует никаких дополнительных реактивов, не приводит к загрязнению продукта и не инактивирует биологически активных веществ.

Стадия III. Лизис плазматических клеток, осветление лизиса, суспендирование и лизис ядер. Клетки лизируют добавлением к гомогенату при использовании мягких детергентов – неионогенных (тритон X-100) и дезоксихолата натрия. При этом ядра не лизируются. Лизат осветляют низкотемпературным центрифугированием. Ядра осаждают центрифугированием при больших скоростях. В центрифугате содержится почти вся клеточная РНК с небольшой примесью ДНК. Ядра ресуспендируют в растворе для гомогенизации и проводят лизис добавлением анионных детергентов, например, додецилсульфата натрия. В лизате ядер содержится ДНК с незначительной примесью РНК.

Стадия IV. Очистка от биополимеров: депротенизация и удаление полисахаридов. Для очистки РНК и ДНК от белков нужно разрушить нуклеопротеиды. Для этого в лизирующий раствор вводят в различных концентрациях ионные детергенты; высокие концентрации солей (1 М натрия хлорид); денатурирующие агенты (4–8 М мочевины); протеазы (про-

теиназа К или проназа); тиольные соединения (2-меркаптоэтанол); комплексообразователи (ЭДТА).

Стадия V. Очистка продукта от низкомолекулярных примесей и концентрирование проводится путем диафильтрации и ультрафильтрации.

Стадия VI. Фракционирование нуклеиновых кислот. Примеси ДНК в препарате РНК проводят обработкой ДНК-азой 1, свободной от РНК-азы. Примеси РНК в препарате ДНК проводят обработкой РНК-азой, свободной от ДНК-азы. В дальнейшем проводят (при необходимости) колоночную жидкостную хроматографию.

Метод получения высокомолекулярной РНК дрожжей

Для рассмотрения приводим пример промышленного получения РНК из дрожжей для получения фармацевтических препаратов.

1. *Экстракция РНК.* Один килограмм свежих прессованных пекарских дрожжей (*S. cerevisiae*) суспендируют порциями в течение 20 минут в 2 л кипящей дистиллированной воды, содержащей 75 г анионного детергента додецилсульфата натрия (додецилсульфат натрия лизирует клетки ядра, денатурирует белки и образует с ними отрицательно заряженные комплексы, разрушает нуклеопротеиды, высвобождая РНК и ДНК). При этом температура суспензии не должна быть ниже 98 °С. Суспензию кипятят в течение 40 мин при 98–102 °С при постоянном интенсивном перемешивании. Первоначально поддерживают постоянный объем воды, а затем доводят до 3 л. После окончания экстракции в горячую суспензию добавляют кипящую воду до объема 4,5 л, смесь перемешивают и переносят в узкую цилиндрическую емкость из термостойкого стекла вместимостью 5,0 л. Смесь оставляют для отстаивания на 22 часа.

2. *Высаливание РНК.* Отстоявшийся верхний слой (около 2,8 л) декантируют с помощью сифона в стеклянную емкость вместимостью 5,0 л и прибавляют в неё 810 г натрия хлористого и доводят водой до объема 4,5 л. Суспензию интенсивно перемешивают до полного растворения соли и оставляют при комнатной температуре на 22 часа. При этом в нижней части суспензии формируется осадок – высокомолекулярная РНК.

3. *Промывка осадка РНК 3 М раствором натрия хлорида и этиловым спиртом.* Выпавший осадок, содержащий высокополимерную РНК, отделяли от супернатанта центрифугированием (1500 г, в течение 10 мин). Полученный осадок промывали двумя порциями по 2 л 3 М раствором натрия хлорида и 2 порциями (по 1 л и 0,5 л) 94 %-ым этиловым спиртом. Осадок при каждой промывке отделяют центрифугированием. Осадок растворяют в воде для инъекций и лиофилизируют. Выход субстанции составляет до 10 грамм лиофилизированной высокомолекулярной РНК с 1 кг дрожжей. Спектр поглощения соответствует очищенному препарату РНК: $A^{230/260} - 0,35-0,55$; $A^{280/260} - 0,4-0,55$; $A^{250/260} - 0,86-0,94$. Продукт белого цвета, хорошо растворимый в воде.

2.3. Биотехнология получения фармацевтических препаратов на основе дрожжей

2.3.1. Препараты на основе двуспиральной РНК дрожжей

РИДОСТИН. Основным направлением в предотвращении распространения инфекционных заболеваний в течение ряда десятилетий является вакцинация населения. Однако проводимые мероприятия не всегда достигают цели. Так, например, при высоком проценте привитых против гриппа отмечается снижение среднегодовых показателей заболеваемости лишь на 10–20 % против ожидаемого уровня. Как показывает опыт, профилактика инфекционных заболеваний с помощью вакцинации может быть успешной в том случае, если возбудитель не подвержен антигенной изменчивости. Поэтому в последние годы внимание обращается на средства, влияющие на статус системы неспецифической резистентности. Известно, что от состояния этой системы зависит эффективность лечения и профилактики многих заболеваний, в том числе и инфекционной природы. Разработка способов активации механизмов резистентности к инфекционным агентам включает создание новых препаратов, схем их применения и сочетание с известными фармакологическими средствами. Достижения био- и генной инженерии, современной биотехнологии позволили получать принципиально новые средства для нужд здравоохранения. Одним из

такими препаратами является *индуктор интерферона на основе двухспиральной РНК (дсРНК) микробиологического происхождения – Ридостин*. В настоящее время препарат разрешен для лечения различных видов герпеса (простой, опоясывающий и генитальный), инфекционных урогенитальных заболеваний (хламидиоз) и как иммуностимулятор. В 1967 году была доказана ведущая роль двухспиральных рибонуклеиновых кислот в индукции интерферона. Обширный опыт экспериментального использования синтетических полирибонуклеотидов на различных животных и моделях патологий, выдвинул ряд задач, связанных с преодолением их побочных и кумулятивных свойств. Это поставило перед исследователями задачу – искать другие источники и способы получения двухспиральных РНК – индукторов интерферона из микробиологического сырья. Наиболее перспективными с точки зрения продуктивности дсРНК и экологической безопасности являются непатогенные штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, которые были выбраны в качестве штамма продуцента дсРНК.

Одним из основных моментов выделения дсРНК из дрожжей явился поиск методов разрушения чрезвычайно прочных клеточных стенок биомассы *Saccharomyces cerevisiae*. На начальных этапах для разрушения клеточных стенок и извлечения дсРНК из дрожжей более предпочтительным является применение детергентного метода, который заключается в последовательном применении 2-этилгексановой кислоты и додецилсульфата натрия при оптимальном температурном режиме. Это позволяет извлечь дсРНК, свободной от белковых примесей. Дробное фракционирование экстрагированных нуклеиновых кислот хлористым литием и дополнительная депротеинизация конечного продукта позволили получить препараты дсРНК со следующими показателями качества: содержание дсРНК – $41 \pm 9\%$; содержание нуклеотидного материала – $72 \pm 5\%$; содержание белка – $0,7 \pm 0,5\%$; содержание ДНК – не более $1,0\%$. Выход такого препарата из 1 кг биомассы составлял $16,3 \pm 2,4$ мг.

Препарат хорошо зарекомендовал себя при лечении гриппа и ОРВЗ, при рассеянном склерозе, тяжелых форм клещевого энцефалита и других заболеваниях.

2.3.2. Препараты на основе β -глюканов дрожжей

ЗИМОЗАН. Препараты Зимозан (Россия), Zymocel (США) представляют собой смесь полисахаридов, выделенных из стенки дрожжевых клеток штамма *Saccharomyces cerevisiae*. Изучение активной субстанции этих препаратов началось с 1940 года. В то время еще не было известно, какой компонент этой субстанции: белок, липиды или полисахариды отвечают за фармакологическую активность. В 80-х годах Goldman С. и Grop J. из Гарвардского Университета установили, что активной субстанцией в этих препаратах является смесь β -1,3-глюкан и β -1,6-глюкан. Молекула β -1,3/1,6-глюкана состоит из длинной основной цепи молекул глюкозы, соединенных β -1,3-связями, и боковых цепей молекул глюкозы, также соединенных β -1,3-связями (см. рис. 3).

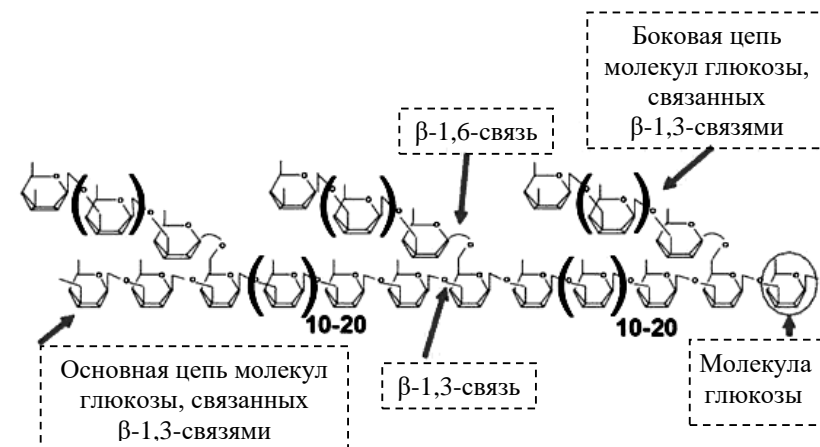


Рисунок 3 – Структура молекулы β -1,3/1,6-глюкана

В различных штаммах дрожжей присутствуют различные β -глюканы: *Saccharomyces cerevisiae* в клеточной стенке содержит β -1,3-глюкан и β -1,6-глюкан, а дрожжи *Pichia* и *Candida* – β -1,3-глюкан.

Получение β -глюканов состоит из нескольких стадий:

- выращивание биомассы дрожжей;
- отмывка клеток дрожжей;

- разрушение клеток механическим методом;
- обработка ультразвуком (частота 18–22 кГц) суспензии отмытых клеточных стенок;
- очистка от сопутствующих полисахаридных компонентов обработкой щелочью или специфическими ферментами;
- осаждение целевого продукта.

Зимозан применяется в клинике как неспецифический стимулятор лейкопоэза, не оказывает прямого цитотоксического действия на опухолевые клетки, но угнетает рост опухоли и снижает метастазирование. Биологическая активность препарата обусловлена гликанами. Механизм действия связан с активацией фагоцитирующих и антигенпредставляющих клеток. В реакциях комплементзависимого цитолиза усиливает цитотоксическую активность Т-лимфоцитов, повышает синтез иммуноглобулинов, активирует систему комплемента. Используется при лейкопении для профилактики лучевой терапии и химиотерапии опухолей.

Последнее время в литературе появились данные о том, что норвежская фармацевтическая компания «Biotec Pharmason» создала новое лекарственное средство на основе выделенных из клеточной стенки пекарских дрожжей β-глюканов. Внедрение в медицинскую практику этого препарата намечено на 2012–2013 годы после окончания клинических испытаний. Препарат в виде геля на основе β-глюканов позволяет ускорить заживление ран, в том числе и хирургических швов. Действие препарата основано на усилении врожденного иммунитета, антибактериальной активности. Эксперименты на лабораторных животных с бактериальной инфекцией, которым β-глюканы вводили внутривенно и давали *per os* с пищей показали эффективность при двух способах введения.

2.3.3. Препараты на основе гидролиза РНК дрожжей

Метод получения нуклеината натрия из дрожжей

Свежие прессованные пекарские дрожжи (*S. cerevisiae*) измельчают и заливают водным раствором щелочи (NaOH, KOH) или раствором натрия хлористого и при pH 7,0–9,5 начинают нагрев. Полученную смесь выдерживают при температуре 60–100 °C и постоянном перемешивании в течение

1 часа для проведения экстракции. Чем выше температура раствора и pH, тем меньше времени необходимо для полной экстракции. Биомассу отделяют от экстракта центрифугированием или фильтрованием. Полученный экстракт обрабатывают протеолитическими ферментами, например, панкреатином при рекомендованной величине pH и температуре. После завершения ферментализации pH доводят до 3,8–4,2 путем добавления минеральных кислот (HCl, H₂SO₄). Экстракт нагревают до 80–100 °C и выдерживают при указанной температуре в течение 15 минут. При этом выпадает осадок примесей, которые отделяют центрифугированием или фильтрацией. В полученный прозрачный осветленный раствор РНК вносят CaCl₂. При этом в осадок выпадает кальциевая соль РНК. Полученный осадок отделяют фильтрацией и промывают водой при температуре (0–5 °C). Осадок ресуспендируют в воде, а затем pH раствора доводят до величины 1–2 (при помощи HCl или H₂SO₄). В результате в осадок выпадает свободная РНК. Осадок РНК отделяют центрифугированием, промывают водой и органическими растворителями (ацетоном или этанолом). После промывки РНК растворяют в воде с добавлением NaOH до величины pH 6,2–6,5. Из полученного раствора при помощи обработки этиловым спиртом осаждают нуклеинат натрия. Осадок промывают спиртом и высушивают. Белковые примеси отсутствуют. Содержание основного вещества – нуклеината натрия, не менее 90,0 %.

Получение Энкада из ферментативного гидролизата РНК дрожжей

Приводим пример получения препарата Энкад, представляющего собой продукт гидролиза дрожжевой РНК панкреатической РНК-азой.

Дрожжевую рибонуклеиновую кислоту (70 грамм), выделенной из дрожжей штамма *Torula*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida*, растворяют в 430 мл воды для инъекций и при помощи 2н NaOH доводят pH раствора до 5,1 ± 0,2. Добавляют 140 мг панкреатической рибонуклеазы и проводят гидролиз в течение 5 часов при температуре 64 ± 1 °C. Проведено изучение количественных закономерностей процесса гидролиза РНК с точки зрения влияния их параметров на показатели A_{260/280} и A_{260/230}. Было установлено, что на исследуемые показатели A_{260/280} и A_{260/230} наибольшее влияние ока-

зывает время гидролиза. Результаты исследований свидетельствуют, что изменение величины максимума поглощения при 260 нм связано с накоплением в гидролизате аденина и других оснований, а также нуклеозидов вследствие неспецифических ферментативных процессов. Содержание низкомолекулярных компонентов превышает 20 % после 5–6 часового гидролиза, при этом расходование высокомолекулярной фракции прекращается. Таким образом, критерием окончания процесса гидролиза с целью получения препарата можно считать момент окончания расходования высокомолекулярной фракции РНК дрожжей. Изучено влияние рН среды и температуры на показатели оптических соотношений при различных длинах волн. По допустимым значениям (максимальному и минимальному) показателей качества, определены, возможно, допустимые отклонения рН и температуры от оптимальных. Гидролиз панкреатической рибонуклеазой необходимо проводить при температуре 64 ± 1 °С и рН $5,1 \pm 0,2$.

Общий объем полученного раствора 465 мл. Раствор гидролизованной РНК охлаждают до температуры 25–35 °С и прибавляют 120 мл этанола, охлажденного до температуры минус 5–10 °С, выдерживают при температуре 2–8 °С в течение 3 часов. Выпавший в результате осаждения этанолом осадок удаляют центрифугированием или фильтрацией. Полученный прозрачный раствор подвергают ультрафильтрации через мембраны с порогом отсека 10 кДа. Процесс ультрафильтрации проводят при температуре 10–12 °С. Получают 360 мл раствора. К концентрированному раствору прибавляют 70 мл воды для инъекций и проводят процесс ультрафильтрации. Для полноты экстракции низкомолекулярных продуктов гидролиза РНК процесс ультрафильтрации повторяют.

Ультрафильтрацию проводят для разделения низкомолекулярных продуктов гидролиза дрожжевой РНК от высокомолекулярных компонентов. При исследовании зависимости производительности мембран от концентрации рибонуклеотидов, в растворе было найдено значение и концентрация гелеобразования, которое составляло $187,0 \pm 8,0$ г/л. При исходной концентрации дрожжевой РНК 100 г/л это позволяет получать пермеат при 3-х кратном изменении объема с выходом низкомолекулярной фракции до 65 %. Предложена двойная промывка в режиме диафильтрации. При этом в пермеате концентрация моно- и олигорибонуклеотидов состав-

ляет $78,3 \pm 3,1$ г/л, что позволяет проводить эффективное осаждение их этанолом. Из объединенного пермеата панкреатический гидролизат дрожжевой РНК осаждали этиловым спиртом при соотношении 1 : 10 при температуре 4–8 °С в течение не менее 12 часов. Выход осадка составляет 95 ± 2 %.

Объединенный фильтрат (500 мл) смешивают с 5 литрами этилового спирта (10 кратный объем спирта), охлажденного до 0–1 °С. Для формирования осадка полученную смесь выдерживают в течение 12 часов при 0–4 °С. Прозрачный верхний слой удаляют декантированием, а выпавший осадок отделяют центрифугированием при 3000 об/мин и температуре 4–6 °С. Полученный осадок растворяют в воде для инъекций и раствор лиофилизируют. Выход целевого продукта – 36 г. Проводят контроль субстанции Энкада: вода – не более 3%; микробиологическая чистота в соответствии с ДФУ; пирогенность; состав полученной субстанции, масс. %: нуклеозиды – 1,5 %, мононуклеотиды – 25,6 %, динуклеотиды – 28,1 %, тринуклеотиды – 23,8 %, тетра- и пентануклеотиды – 12,8 %, остальное – высшие нуклеотиды. Степень чистоты субстанции определяется по соотношениям оптических плотностей при трех длинах волн: 230 нм, 260 нм, 280 нм, которые зависят от содержания низкомолекулярных компонентов продуктов гидролиза и возможных белковых примесей. Должны выполняться следующие требования: $A_{260/280} - 2,5-4,5$ и $A_{260/230} - 1,5-1,74$. Значение поглощения при длине волны 400 нм не должно превышать 0,5. Эти показатели характеризуют наличие примесей, которые могут оказать токсическое действие.

После контроля субстанции продукт используют для получения готовой формы препарата «Энкад – 3,5 % раствор для инъекций». Препарат регулирует обмен нуклеотидов в тканях, обладает иммуномодулирующими свойствами, способствует улучшению функций клеточных мембран, проведению импульса по двигательным нервам, уменьшению миодистрофических процессов и оптимизации биоэнергетики мышц. Энкад применяется для лечения наследственных тапеторетинальных абитрофий – заболеваний, приводящих к слабовидению и слепоте. Необходимо отметить, что до настоящего времени в мире не существует эффективных методов лечения этой группы заболеваний. Препарат разрешен к применению при болезни Шегрена и дегенеративных заболеваниях нервно-мышечной системы: наследственных формах миопатий (ранние стадии), врожденном и

приобретенном миопатическом синдроме, различных формах невралных абiotрофий, последствиях нейроинфекций, спинальных абiotрофиях. С помощью препарата Энкад проведено совершенствование методов патогенетической терапии больных псориазом. Наблюдается укорочение сроков лечения на 14,9 % и увеличение сроков ремиссии в два раза. Существенным моментом комплексной терапии с препаратом Энкад является тенденция к нормализации интерлейкинов ИЛ-2 и ИЛ-4, играющих важную патогенетическую роль при псориазе. Показана клиническая эффективность применения препарата «Энкад – 3,5 % раствор для инъекций» при ряде других социально значимых заболеваний (язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, псориаз, рассеянный склероз и др.).

В заключение, хотелось бы отметить, что перечисленные разноплановые свойства РНК обуславливают широкий спектр фармакологической активности её препаратов, полученных путем гидролиза дрожжей, и оказывающих при различных путях введения столь же разнообразные фармакотерапевтические эффекты при различных заболеваниях человека. Примером могут служить данные последних лет о кардиопротекторном действии 3 %-го инъекционного раствора дрожжевой РНК, представляющего собой гомогенную низкомолекулярную РНК с молекулярной массой около 7000 Da. Результаты получены на модели индуцированного инфаркта миокарда у крыс. Использование препарата из РНК приводит к нормализации в крови маркеров кардиоцитолита – креатинфосфокиназы и аспартатаминотрансферазы. Кардипротекторное действие дрожжевой РНК реализуется, по мнению авторов, за счет свойственных для неё мембранно-стабилизирующих, антиоксидантных и энергосберегающих эффектов. К настоящему времени созданы иммуномодуляторы, ингибиторы ферментов, препараты для направленного мутагенеза, противовирусные и противоопухолевые препараты на основе интерферирующих РНК.

2.4. Ферменты, выделяемые из дрожжей

Цитохром С является гемопротеидом (М.м. около 12599 Da) с редокспотенциалом +0,254 В, переносящим электроны от цитохрома С к цитохрому А в дыхательной цепи митохондрий путем попеременного обратимого перехода атома железа простетической геминовой группы из двухвалентного в трехвалентное состояние.

Цитохром С выделяют из ряда источников, например, из сердечной мышцы крупного рогатого скота или дрожжей *Pichia membranaefaciens*. Биотехнологический цитохром С, полученный из дрожжей имеет несколько меньший общий положительный заряд молекулы, чем фермент животного происхождения, поскольку его изоэлектрическая точка (pI = 9,8) несколько ниже, чем у цитохрома С из животной ткани (pI = 10,3). Молекулярные массы двух белков весьма близки, поскольку они ведут себя совершенно одинаковым образом в электрофорезе в полиакриламидном геле с додецилсульфатом. Аминокислотный состав цитохрома С из дрожжей *Pichia membranaefaciens* несколько отличается от состава аминокислот цитохрома С животного происхождения.

Эндогенный цитохром С относительно легко экстрагируется из дрожжевых клеток без нарушения его молекулярной структуры.

Отрицательный заряд молекулы белка позволяет использование отрицательно заряженных ионообменных смол (катионитов) для его очистки. Наибольшее количество работ по выделению и очистке цитохромов С было выполнено с помощью карбоксильной катионообменной смолы кислого типа – Amberlite IRG-50. С помощью катионообменных смол можно осуществить не только выделение и предварительную очистку, но и более тонкое разделение белков, молекулы которых отличаются друг от друга по величине заряда не более чем на единицу. Так, например, на указанной смоле можно разделить цитохромы С, выделенные из различных источников. Детальный хроматографический анализ цитохромов С позволяет установить, что их молекулы могут образовывать при определенных условиях димеры и другие высшие полимерные формы с нарушением функциональных форм фермента. Димеризация – самопроизвольный медленный процесс, имеет место в растворах и субстанциях препаратов цитохрома С. Резко ускоряется димеризация при обработке цитохрома С такими реагентами, как этанол и трихлоруксусная кислота. Полимерные формы цитохрома С резко отличаются по свойствам от нативного белка. Димерные и другие полимерные формы имеют очень низкую активность в сукцинатдегидрогеназной и цитохромоксидазной реакциях. Установлено, что полимерные формы распадаются на димеры при рН более 10,5 и низких рН (ме-

нее 3,5), а также при обработке белка высокими концентрациями денатурирующих агентов, таких как мочевины, гуанидин гидрохлорид и другие. Для тонкой очистки цитохрома С, выделенного из дрожжей используется также колоночная гельфильтрация. Наиболее употребляемый гель в случае цитохрома С – Сефадекс G-50. Небольшие размеры, высокая степень стабильности и высокая основность делают процедуру получения цитохрома С относительно простой.

Весьма критической стадией выделения считается начальная стадия экстракции белка из разрушенных тканей. Известно, что цитохром С отделяется от мембранных структур митохондрий при повышении ионной силы. Для исключения появления как полимеризованного цитохрома С, так и дезамидированных форм предлагается уже на стадии экстракции избегать не только действия сильных кислот и щелочей, но стараться поддерживать рН в диапазоне 7,0–8,0. Следует избегать также применения органических растворителей и высоких концентраций солей. С целью снижения общей ионной силы раствора при экстракции могут быть использованы для замещения цитохрома С из мембран митохондрий соли 3-х валентного металла, например, 0,3 %-ый раствор $Al_2(SO_4)_3$. Последующие стадии фракционирования могут быть с успехом заменены мембранной ультрафильтрацией в тангенциальном потоке.

В промышленных условиях цитохром С получают в процессе переработки биомассы культуры *Pichia membranaefaciens*. Необходимо отметить, что предлагаемая технология позволяет получать из биомассы дрожжей не только цитохром С, но и ряд других биологически активных продуктов: супероксидсмутазу, РНК и ДНК, гидролизаты белка и др.

В соответствии с разработанной технологией при переработке 1 тонны биомассы дрожжей *Pichia membranaefaciens* получают: 0,2 кг цитохрома С (фармацевтическая субстанция); 0,3 кг супероксидсмутазы (фармацевтическая субстанция); 50,0 кг РНК и ДНК; 80,0 кг гидролизата белка (применяется как компонент питательных сред); 300 кг клеточных оболочек дрожжей (многофункциональный сорбент, применяемый, например, в виноделии для очистки вина от пестицидов, солей тяжелых металлов).

Технологический процесс получения цитохрома С включает следующие стадии:

- ✓ выращивание биомассы *Pichia membranaefaciens*;
- ✓ отделение биомассы от культуральной жидкости;
- ✓ дезинтеграция дрожжей;
- ✓ экстракция фермента, хроматография, ультрафильтрация и очистка раствора цитохрома С;
- ✓ гельфильтрация;
- ✓ стерилизующая фильтрация раствора;
- ✓ лиофилизация раствора фермента;
- ✓ контроль субстанции цитохрома С.

Цитохром С нашел применение как естественный антигипоксикант для организма, как компонент дыхательной системы митохондрий, участвующий в переносе электронов. Фермент выполняет функцию заместительной терапии, поскольку при гипоксии из-за структурных нарушений митохондрии теряют часть своих компонентов, включая переносчики электронов. В экспериментальных исследованиях доказано, что экзогенный цитохром С при гипоксии проникает в клетку и митохондрии, встраивается в дыхательную цепь и способствует нормализации энергопродуцирующего окислительного фосфорилирования. Цитохром С может быть полезным средством комбинированной терапии критических состояний. Показана высокая эффективность препарата при отравлении снотворными средствами, окисью углерода, токсических, инфекционных и ишемических повреждениях миокарда, пневмониях, нарушениях мозгового и периферического кровообращения. Препарат применяют также при асфиксии новорожденных и инфекционном гепатите. Представляет особый интерес липосомальная лекарственная форма цитохрома С, обеспечивающая более высокую биодоступность и эффективность по сравнению со свободной формой фермента. У больных, получающих цитохром С, течение инфаркта миокарда более благоприятно, что сопровождается более быстрым улучшением состояния больных, увеличением сердечного выброса, фракции выброса левого желудочка, меньшим числом случаев левожелудочковой недостаточности. Препарат увеличивает сократительную и насосную функцию сердца, стабилизирует гемодинамику, способствует положительной динамике ЭКГ.

Заключение

Хорошо известна возможность получения на основе дрожжей рекомбинантных продуктов, в том числе иммунобиологических препаратов, в частности, вакцин. Примеры получения вакцин на штаммах дрожжей-продуцентов описаны в учебном пособии (Краснопольский Ю.М., Борщевская М.И. Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов. – Харьков, НТУ «ХПИ», 2009).

Интерес представляет работа, опубликованная в 2011 году в *Journal of Medical Microbiology*. Авторы этой работы установили возможность получения вакцинного препарата из пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. На примере тяжелого инфекционного заболевания аспергиллеза, вызываемого грибами аспергиллами, показана защитная роль вакцины, полученной из клеток пекарских дрожжей. Аспергиллы проникают в организм через рот и в случае ослабленной иммунной системы поражают легкие, почки, печень и мозг. Этому заболеванию часто сопутствует летальный исход. Ученые из Калифорнийского института медицинских исследований установили, что убитые клетки *Saccharomyces cerevisiae* введенные лабораторным мышам повышали выживаемость животных, зараженных аспергиллезом. Одновременно показано, что степень инфицированности этим грибом внутренних органов мышей значительно снижена. Очень важным является тот факт, что вакцина оказалась эффективной на лабораторных животных и при ряде других грибковых инфекциях: кандидозе, криптококкозе и кокцидиоидозе.

Различные штаммы дрожжей являются источником для получения ряда лекарственных препаратов: Геферитин – таблетка содержит сухих дрожжей – 0,3 г и фитина – 0,125 г, применяется при заболеваниях нервной системы (невралгия), заболевании костей (рахит, перелом), болезни крови (анемия); таблетки, содержащие группу витаминов В; автолизат пивных дрожжей; вакцина на основе антигенов дрожжей для лечения кандидозов; Мевакор (Ловастин) – монокалин К – получен путем экстракции красных рисовых дрожжей, содержащий несколько природных статинов, снижающих уровень холестерина и ряд других препаратов. На фармацевтическом

рынке присутствует препарат Энтерол, представляющий собой лиофилизированные клетки дрожжей *Saccharomyces boulardii*. Препарат способствует подавлению патогенной и условно-патогенной микрофлоры, обладает хорошим противомикробным и противодиарейным действием, восстанавливает микрофлору кишечника.

Нельзя обойти вопрос применения дрожжей с лечебными целями. Наиболее часто используются пекарские и пивные дрожжи (*Brewers yeast*).

При приеме во внутрь жидкие дрожжи увеличивают секреторную функцию желез в организме, в том числе, и поджелудочной железы. Применение дрожжей повышает сопротивляемость организма к инфекциям. Пивные дрожжи содержат высокое содержание витаминов группы В (тиамин, пиридоксин, пантотеновая кислота, фолиевая кислота), Е, РР, макро- и микроэлементы, включая Са, Mg, Fe, Mn, Zn. Применение жидких дрожжей рекомендовано при анемии, полиневрите, невралгии, сахарном диабете, фурункулезе, псориазе и при ряде других заболеваний. Сухие дрожжи проявляют меньшую активность.

В фармацевтической промышленности дрожжи играют еще одну немаловажную роль – с их помощью получают этиловый спирт (C_2H_5OH), нашедший широкое применение при получении лекарственных препаратов. Основной принцип получения спирта – превращение крахмала в сахар и сахара в этиловый спирт.

Технология получения спирта из крахмалосодержащего сырья включает в себя следующие стадии: подготовка сырья к развариванию; разваривание зерна и картофеля с водой для разрушения клеточной структуры и растворения крахмала; охлаждение разваренной массы и осахаривание крахмала ферментами солода (пророщенного зерна) или культур плесневых грибов; сбраживание сахаров дрожжами в спирт; отгонка спирта из бражки и его регенерация.

Этиловый спирт используется в фармации в качестве антисептика, экстрагирующего агента, осадителя, растворителя и т.д. Этиловый спирт используется для получения препаратов крови (выделение иммуноглобулинов и альбумина по методу Кона), спиртосодержащих препаратов (корвалол, настойки валерианы, пиона, эхинацеи, сиропа корня солодки и др.),

а также при получении многих биологически активных соединений: белков, нуклеиновых кислот, субстанций липидов, гликолипидов и др.

Особое место занимают дрожжи в фармацевтической биотехнологии, являясь продуцентами рекомбинантных продуктов. Для этого в клетку дрожжей вводят ген, отвечающий за синтез ряда продуктов, используемых в качестве фармакологически активных субстанций. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* – непатогенные одноклеточные микроорганизмы с диаметром клетки около 5 мкм. Их генетика, молекулярная биология и метаболизм детально изучены. *Saccharomyces cerevisiae* размножаются почкованием и хорошо растут на простых средах. Эти дрожжи являются наиболее удобной моделью для исследования других эукариот, в том числе человека, поскольку многие гены, ответственные за регуляцию клеточного деления *S. cerevisiae*, являются сходными с таковыми у человека. Широко используемая генетическая система дрожжей (искусственная хромосома) является неизменным участником всех исследований по изучению ДНК человека. В 1996 году была определена полная последовательность всего набора хромосом *S. cerevisiae* (впервые выполнено для эукариот), что еще более повысило ценность этих микроорганизмов для научных исследований. Очень важным является тот факт, что синтезированный бактериальной клеткой эукариотический белок часто приходится подвергать ферментативной модификации, присоединяя к белковой молекуле низкомолекулярные соединения, что необходимо для правильного функционирования полученных белков. *E. Coli* и другие прокариоты не способны осуществлять эти модификации, поэтому для получения полноценных эукариотических белков используют *Saccharomyces cerevisiae*, а также другие виды дрожжей: *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces diastaticus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*. Наиболее эффективными продуцентами полноценных рекомбинантных белков являются *P. pastoris* и *H. polymorpha*. Необходимо отметить, что в настоящее время с помощью дрожжевых клеток получен ряд модифицированных белков, например, химерный белок «альбурон», представляющий собой комплекс альбумин – интерферон. Такой комплекс увеличивает время периода полужизни белка в организме после введения. Причем, показано, что

штамм *Pichia pastoris*, продуцирующий химерный белок не оказывает действия на клетки дрожжей в отличие от дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. При использовании *P. pastoris* химерный белок не накапливается в клетке дрожжей, а секретируется в биологически активной форме.

Несомненный интерес представляет работа по получению с помощью дрожжей гормона – гидрокортизона. Гидрокортизон – один из главных кортикостероидных гормонов животных и человека, важнейший промежуточный продукт синтеза кортикостероидных лекарств. Возможно самым сложным метаболическим путем *de novo*, является создание штамма *Saccharomyces cerevisiae*, способного синтезировать гидрокортизон при росте на глюкозе. В процессе конструирования штамма *Saccharomyces cerevisiae* был оптимизирован синтез стероидов, а затем организован синтез гидрокортизона путем переноса в дрожжи 6-ти генов животных, 2-х генов человека, 2-х генов растений. Штамм при росте на глюкозе способен синтезировать до 17 г / литр стероидов, из которых 70 % составляет гидрокортизон. Ежегодно появляются сообщения о появлении препаратов на основе клеток генетически модифицированных дрожжей. Одним из ярких примеров является создание препарата Артемизина, направленного на лечение малярии. Каждый год от малярии умирает от одного до трех миллионов человек, причем, до 90 % составляют дети в возрасте до пяти лет. По данным ВОЗ Артемизин, выделяемый из полыни сладкой (*Artemisia annua*), признан наиболее эффективным противомалярийным средством. Стоимость лечения на одного человека составляет около 2 \$ США. Учеными США предложен продуцент – дрожжи, в которые включены гены, способные осуществлять биосинтез артемизининовой кислоты, из которой в дальнейшем путем химической модификации получают Артемизин. Стоимость лечения на одного человека полученного продукта значительно снижена и составляет 0,2 \$ США.

С использованием различных штаммов дрожжей были получены: антиген вируса гепатита В (HBs-антиген), белок малярийного плазмодия, интерлейкин-2, альбумин, альтоплаза, лизоцим, инсулин, фактор роста фибробластов, фактор роста эпидермиса и ряд других фармацевтических продуктов.

Контрольные вопросы

1. Привести данные, подтверждающие возможность использования дрожжей как источника фармакологически активных субстанций.
2. Почему есть необходимость проведения автолиза дрожжей при получении лекарственных препаратов?
3. Охарактеризуйте основные химические факторы, определяющие эффективность автолиза дрожжей.
4. Охарактеризуйте основные физические факторы, определяющие эффективность автолиза дрожжей.
5. Охарактеризуйте основные биологические факторы, определяющие эффективность автолиза дрожжей.
6. Классификация детергентов, применяемых для осуществления автолиза дрожжей.
7. Охарактеризуйте основные технологические этапы проведения автолиза.
9. Схема производства РНК из дрожжей.
10. Как получают и для чего используют препараты на основе бета-глюканов?
11. Почему есть необходимость в проведении процесса автолиза клеток дрожжей?
12. Схема производства фермента цитохрома С из дрожжей и функции цитохрома С в клетке.
13. Какие лекарственные формы препаратов из дрожжей сегодня используются в медицине?
14. Чем объясняются преимущества использования дрожжей для получения лекарственных препаратов?

ГЛАВА 3. BIOTEХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Представленный в данной главе материал посвящен биотехнологии растений, которая позволяет получать фармакологически активные вещества. Что же представляет собой биотехнология растений? Мы формулируем это следующим образом: **биотехнология растений** – это соединение методов культуры клеток и тканей растений с методами молекулярной биологии и генетики. *Преимуществом биотехнологии растений* является возможность выращивать растения в виде неорганизованной клеточной массы (каллус), способной синтезировать фармакологически активные субстанции. Последнее позволяет заменить растения, выращиваемые *in vivo*, клетками растений, выращенными *in vitro*.

3.1. Вторичные метаболиты растений – фармакологически активные вещества

В настоящее время культура клеток высших растений является альтернативным способом получения многих фармакологически активных субстанций из растений. Основным же типом культивируемых растительных клеток является каллусная ткань.

Процесс получения первичного каллуса требует стерильных условий. Экспланты растений помещают на искусственную питательную среду *in vitro*, которая включает микро- и макроэлементы, витамины и фитогормоны. При культивировании на питательных средах важными факторами являются: освещение, температура, аэрация, перемешивание среды и др. Каллусные клетки, при длительном культивировании, могут спонтанно приобретать гормонезависимость, и далее расти на среде без фитогормонов. Природа такой независимости к одному или обоим гормонам (ауксину и цитокинину) может быть генетической (результат мутации) или эпигенетической (результат экспрессии генов, определяющих гормонезависимый рост). Такие каллусы называют «привыкшей» тканью. Примером гормонезависимого штамма может быть штамм К-27 раувольфии змеиной (*Rauwolfia serpentine Benth*), полученной путем обработки тканей

клеточной линии А мутагеном этиленмином и дальнейшей селекцией по принципу «содержание алкалоидов» на специально разработанной питательной среде, обеспечивающей высокий уровень накопления индолиновых алкалоидов (0,9–1,2 % аймалина в сухой биомассе).

Каллусная клетка и сам каллус присущи всему растению. Однако *in vivo* каллус возникает на растении в исключительно редких случаях, обычно при травмах, функционирует непродолжительное время. Эта ткань защищает место ранения, накапливает питательные вещества для анатомической регенерации или регенерации утраченного органа. В культуре *in vitro* тип каллуса зависит от: 1) типа экспланта; 2) генотипа; 3) состава питательной среды.

По данным Л.А. Лутовой (2010 г.) при эксплантации на питательную среду *in vitro* клетки специализированной ткани должны дифференцироваться, т.е. потерять присущую им структуру и функцию, а также вернуться к состоянию делящейся клетки. Обычно клетки переходят к специализации из фазы G₁, очень редко из фазы G₂, а в дифференцированной ткани находятся на стадии G₀. Важную роль в этом процессе играют фитогормоны, которые индуцируют клеточное деление и поддерживают каллусные ткани в делящемся состоянии. При этом наблюдаются сложные взаимоотношения между ауксинами и цитокининами. Присутствие в среде одного ауксина определяет переход специализированной клетки из покоящейся фазы G₀ к вступлению в фазу S жизненного цикла, но для завершения фазы S, т.е. при подготовке к митозу или мейозу, необходимы цитокинины. В зависимости от концентрации фитогормоны вызывают образование каллуса разных типов. Каллус представляет собой аморфную массу, состоящую из тонкостенных паренхимных клеток, не имеющих строгой анатомической структуры. Цвет может быть белым, желтым, зеленым, пигментированным полностью или зонально. Каллусы, по существующей классификации, подразделяют на: 1) рыхлые, сильно обводненные, легко распадающиеся на отдельные клетки; 2) среднеплотные, с хорошо выраженными меристематическими очагами; 3) плотные, с зонами редуцированного камбия и сосудов. Как правило, на среде с 2,4-Д (2,4-дихлорофеноксисукусная кислота) каллусы становятся рыхлыми и теряют пигментацию. Каллус первого типа используют для получения суспензионных

культур, второго типа – для поддержания роста клеток и сохранения культуры в растущем состоянии.

В интактном растении большинство специализированных клеток не делятся, за исключением клеток, специализация которых направлена на деление. *Процесс потери клеточной специализации называют дедифференцировкой*. Первый этап дедифференцировки для неделящихся специализированных клеток растений это возобновление способности деления. Части растения (органы, ткани, клетки) по сравнению с клетками животных более автономны, что связано с тотипотентностью растительных клеток. Проявлением тотипотентности является способность растений к регенерации из единичных клеток. Предполагают, что чем меньше специализирована клетка, тем легче она будет дедифференцироваться.

Наиболее детально процесс дедифференцировки и каллусообразования изучен на культуре тканей на дисках из разных зон корнеплода моркови, клубня топинамбура и сердцевинки паренхимы стебля табака. Установлено, что дедифференцировка специализированных клеток начинается с использования запасных питательных веществ, разрушения специализированных клеточных органелл: хлоро-, хромо- и лейкопластов; затем происходят изменения в тонкой структуре клеток, увеличивается число рибосом и элементов эндоплазматического ретикулума, возрастает число элементов аппарата Гольджи, увеличивается размер ядрышек. Эти изменения, как правило, предшествуют началу деления клеток или его сопровождают.

При индукции к пролиферации клеток дифференцированной ткани важно знать, все ли они тотипотентны. Получение культуры тканей не из апикальной и камбиальной меристем, а из специализированных клеток позволило установить, что в культуре *in vitro* в митотический цикл входят, как правило, любые клетки, не потерявшие ядро в процессе дифференцировки.

Значение степени дифференцировки исходной ткани для последующей дедифференциации и вторичной дифференциации привлекло к себе внимание лишь в последние годы. Примерами стойкого сохранения в культуре *in vitro* видовых и органных особенностей метаболизма могут служить способность к специфическим для данного вида растений вторичным синтезам и сохранение некоторых свойств исходного органа и ткани.

Способность изолированных тканей в условиях культуры *in vitro* к синтезу веществ вторичного метаболизма, продуцентами которых являются эти ткани в системе целого растения, установлена для многих видов растений. Так, в изолированных корнях белладонны и в культуре корневых каллусов сохраняется способность к биосинтезу атропина. Культура ткани раувольфии змеиной, полученная из корня, сохраняет способность к синтезу резерпина, тогда как культура ткани стеблевого происхождения этого алкалоида не синтезировала. *Выявленная способность к синтезу вторичных метаболитов составляет основу для промышленного использования культур тканей как продуцентов лекарственных препаратов.*

Не менее интересно и перспективно для практики длительное сохранение культивируемыми клетками метаболического профиля, свойственного исходной ткани, а именно сохранение специфически углеродного обмена, специфических антигенов и изоферментных спектров алкогольдегидрогеназы, аспаратаминотрансферазы, глутаматдегидрогеназы, сукциндегидрогеназы и других.

Таким образом, основные особенности исходной ткани при получении от неё перевиваемых клеточных культур длительно сохраняются, что объясняется стойким сохранением состояния репрессии или дерепрессии генов.

Растения всегда служили человеку в качестве источника пищи, эфирных масел, красителей и лекарственных соединений. Так, мак снотворный (*Papaver somniferum*) является источником болеутоляющего вещества кодеина; из наперстянки (*Digitalis lanata*) получают дигоксин, понижающий сердечную деятельность; из хинного дерева (*Cinchona ledgeriana*) антималярийное средство «хининдин». Особое место занимают наркотики и стимулирующие вещества. В небольших, строго контролируемых количествах их используют в медицине. Однако при систематическом употреблении низких концентраций наркотиков возникает наркозависимость и стремление к увеличению употребляемой дозы. Применение высоких концентраций наркотика убивает человека. Наиболее известны опиум и героин из *Papaver somniferum*, кокаин из *Erythroxylon*, никотин из различных сортов табака. Наиболее известный стимулятор – кофеин, содержащийся в растениях чая и кофе. Стимуляторы не токсичны в концентра-

циях, рекомендуемых к применению. Однако высокие их концентрации негативно влияют на сердечно-сосудистую и нервную систему человека.

Способность интактных растений синтезировать различные соединения привела к предположению, что тем же свойством будут обладать клетки и ткани этих растений, выращиваемые в стерильных условиях. Для некоторых культур это оказалось справедливым. Но в отдельных случаях клетки либо не проявляли способности к синтезу необходимых веществ, либо синтезировали их в минимальном количестве. Понадобились долгие эксперименты по подбору питательных сред, условий культивирования, исследованию новых штаммов, полученных благодаря генетической гетерогенности каллусных клеток или применению мутагенных факторов, чтобы добиться серьезных успехов в этой области.

За последние годы были получены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что *для получения культуры продуцентов с высоким синтетическим потенциалом важно учитывать следующие особенности:*

1 – отбирать растения, в которых содержание биологически активных веществ максимально по сравнению с другими особями этого вида;

2 – для инициации культуры ткани необходимо использовать органы растений, в которых происходит синтез и накопление данных веществ, что позволит разнообразить и обогатить состав продуцентов;

3 – при культивировании тканей в условиях *in vitro* необходимо учитывать такие условия как:

✓ наличие в составе питательной среды источников углеродного питания;

✓ наличие в составе питательной среды минеральных веществ: источников азота, фосфора, калия, серы, кальция и других макро- и микроэлементов;

✓ наличие в составе питательной среды витаминов и аминокислот, способствующих синтезу вторичных метаболитов;

✓ наличие определенных типов гормонов и стимуляторов, поддерживающих способность клеток к делению и стимуляцию синтеза вторичных метаболитов;

✓ наличие или отсутствие в составе питательной среды углекислого газа;

✓ наличие освещения и предшественников конечных продуктов;

- ✓ температура культивирования и pH среды;
- ✓ наличие асептики.

Наиболее часто используются следующие питательные среды:

Среда Мурасиге – Скуга (универсальная среда, 1962 г.) – пригодна для образования каллусов, поддержания неорганизованного каллусного роста, индукции морфогенеза у большинства двудольных растений. В данной среде изменение соотношения ауксина и кинетина приводит к образованию либо корней (преобладание ауксина), либо стеблевых культур (преобладание кинетина). По данным исследователей в среде Мурасиге – Скуга наблюдается интенсивный синтез вторичных метаболитов.

Среда Гамборга – Эвелега (1968 г.) – пригодна для культивирования клеток и тканей бобовых растений, злаков.

При приготовлении твердых питательных сред для поверхностного выращивания каллусных тканей, например тканей женьшеня, используют *очищенный агар-агар* (полисахарид из морских водорослей).

Наличие в составе питательной среды источников углеродного питания. Наиболее эффективным источником углерода для культуры тканей растений обычно служит сахароза и реже глюкоза, используемые в концентрации 2–3 %. Для культуры ряда растений рекомендовано использование 5–7 % раствора сахарозы. При концентрациях сахарозы в концентрации 2–7 % наблюдается эффективный синтез культурой вторичных метаболитов. Необходимо отметить, что имеются многочисленные работы о возможности культивируемых клеток метаболизировать и другие сахара. Однако накопление вторичных метаболитов в этом случае было незначительным. Сахара необходимы в качестве питательного компонента, т.к. основные каллусные культуры тканей лишены хлорофилла и не способны к автотрофному питанию. Вследствие этого, их выращивание происходит при рассеянном освещении или темноте.

Наличие в составе питательной среды минеральных веществ: источников азота, фосфора, калия, серы, кальция и других макро- и микроэлементов. Минеральный состав культуральной среды оказывает на синтез вторичных метаболитов существенное влияние. При этом наиболее важное значение имеют фосфор, калий и различные формы азота. Высокие концентрации фосфора, в большинстве случаев, приводят к улучшению роста культуры и ухудшению синтеза вторичных метаболитов. Синтез

вторичных метаболитов начинается после истощения фосфатов в питательной среде. Так, например, высокие концентрации фосфора снижают синтез никотина в культуре клеток табака, антоцианов в культивируемых клетках моркови, фенолов в культуре чая и т.д. Органические формы азота (пептоны, дрожжевые экстракты и др.) тормозят рост тканей и синтез вторичных метаболитов. Увеличению синтеза вторичных метаболитов способствует наличие в культуральной среде неорганического азота в форме нитратов и солей аммония.

Наличие в составе питательной среды витаминов и аминокислот, способствующих синтезу вторичных метаболитов. В состав питательных сред вводят витамины: тиамин в количестве 0,4–1,0 мг/л; пиридоксин – 0,1–0,5 мг/л; никотиновая кислота – 0,5–1,0 мг/мл и др.

Наличие определенных типов гормонов и стимуляторов, поддерживающих способность клеток к делению и стимуляцию синтеза вторичных метаболитов. Основными фитогормонами, являющимися индукторами и регуляторами синтеза вторичных метаболитов являются ауксины (вызывают дифференцировку клеток экспланта) и цитокинины (индуцируют клеточное деление). Их вид, концентрация и соотношение должно определяться исследователем для каждого конкретно объекта культуры клеток растений. Это связано с тем, что в одних случаях фитогормоны могут повышать рост культуры и синтез вторичных метаболитов, а в других приводить к его снижению.

Стимуляторами роста (типа ауксинов) являются: 3-индолил-уксусная кислота в количестве 0,1–1,0 мг/мл; α -нафтилуксусная кислота – 1–2 мг/мл; 2,4-дихлорфеноксиксусная кислота (2,4-D) – 1–2 мг/мл. Стимуляторами роста цитокининов являются: кинетин, 6-бензиламинопурин, аденин в концентрациях 0,2–0,5 %. Так же в качестве стимулятора роста растений за последнее время предложены и другие соединения, например, мелафен, который представляет собой меламинамную соль бис(оксиметил)фосфиновой кислоты. Так, например, предложено использовать мелафен в качестве регулятора роста для увеличения накопления берберины в клеточной культуре василистника малого (*Thalictrum Minus*). Авторы провели сравнение эффективности биосинтеза алкалоида берберины при использовании классических стимуляторов роста (2,4-D – в концен-

трации $1 \cdot 10^{-4}$ г/л и кинетин – в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ г/л) и мелафена (в концентрации $10^{-6} \cdot 10^{-8}$ г/л). Установлено, что через 15 суток культивирования с мелафеном количество берберина составляло 138,1 мг/л, в то время как при использовании классических стимуляторов роста – 50,1 мг/мл. Таким образом, применение мелафена приводило к увеличению выхода алкалоида в 2,8 раза.

Наличие или отсутствие в составе питательной среды углекислого газа. Содержание в среде углекислого газа должно определяться исследователем для каждого конкретно объекта культуры клеток растений. Существенным является соотношение между кислородом и углекислым газом, т.к. высокое соотношение $O_2 : CO_2$ ингибирует рост клеток в культуре и накопление вторичных метаболитов.

Наличие освещения и предшественников конечных продуктов. Так как, каллусные ткани не способны к фотосинтезу, то они могут расти в условиях слабого освещения или в темноте. В большинстве исследований установлено, что свет обладает активизирующим действием, как на рост клеток, так и на синтез вторичных метаболитов. В качестве источника света используют люминесцентные лампы (оптимум 1000 люкс). Более высокая освещенность подавляет рост культуры. В то же время добавление в культуральную среду предшественников вторичных метаболитов в большинстве случаев не приводило к усилению их синтеза.

Температура культивирования и pH среды. Данные литературы подтверждают влияние температуры на рост культуры и образование вторичных метаболитов. Так, например, авторами показано, что оптимум синтеза никотина в клетках табака находится при температуре 27 °С, а отклонение на 5 ° в любую сторону приводит к снижению синтеза никотина в 3 раза. Данные о влиянии величины pH на рост клеток и синтез вторичных метаболитов, имеющиеся в литературе, весьма противоречивы. Величина pH должна определяться исследователем для каждого конкретно объекта культуры клеток растений.

Наличие асептики. Культивирование фрагментов ткани, органа растения – эксплантов и отдельных клеток требуют соблюдения асептики на всех этапах культивирования, включая стерильность растительных тканей, оборудования и инвентаря, подачи стерильного воздуха и навыков работы

персонала в асептических условиях. Особой обработки требуют растительные ткани, которые могут служить источником заражения – на их поверхности всегда находится эпифитная микрофлора. *Стерилизацию проводят по следующей схеме:* часть растения, из которой будет извлечен эксплант, промывают водой с мылом и ополаскивают стерильной водой; затем подготовленный материал стерилизуют в растворах дезинфицирующих средств (10–12 % перекись водорода, 0,1 % сулема, 0,1 % диацид) путем выдерживания эксплантов в течение определенного времени (семена сухие – 10–20 мин, семена набухшие – 6–10 мин, ткани стебля – 20–40 мин, листья – 0,5–5 мин, апексы – 0,5–10 мин.); после выдерживания эксплантов в дезинфицирующих растворах их несколько раз промывают в дистиллированной воде и скальпелем удаляют наружный слой клеток на срезах эксплантов (так как он может быть поврежден при стерилизации); микроорганизмы могут находиться и внутри растительной ткани, что требует применения антибиотиков, которые способны убить микрофлору внутри ткани. Указанные операции необходимо проводить в зоне ламинара при подаче стерильного воздуха.

В настоящее время промышленное получение фармакологически активных вторичных метаболитов – весьма перспективное направление биотехнологии. Синтез вторичных метаболитов проходит, главным образом, в суспензионной культуре клеток, в регулируемых условиях, поэтому не зависит от климатических факторов и повреждения насекомыми. Производственные площади для выращивания культуры минимальны, по сравнению с природным массивом плантаций соответствующих растений. Культуры клеток растений могут синтезировать практически все классы соединений вторичного обмена, причем довольно часто в количествах, в несколько раз превышающих их синтез в интактных растениях. Например, выход аймалицина и серпентина в культуре клеток *Catharanthus roseus*, составляет 1,3 % от сухой массы, а в целом растении – 0,26 %. В культурах клеток может начаться синтез веществ не характерных для исходного растения, либо расширится набор синтезируемых соединений. В ряде случаев в клеточной культуре образуются вещества, которые синтезировались интактным растением на ювенильной фазе развития, либо вещества, содержащиеся в клетках филогенетически более ранних групп растений. Так,

например, в культуре клеток мака прицветникового (*Papaver bracteatum*) содержится вторичный метаболит – сангвирин, характерный для ювенильных растений, и не обнаруживается тебаин, синтезируемый взрослыми растениями.

Синтез вторичных метаболитов может коррелировать с процессом дифференцировки в культуре клеток. Например, в суспензионной культуре мака снотворного *Papaver somniferum* максимальный синтез алкалоидов начинается только после дифференциации достаточно большого количества специализированных клеток млечников, предназначенных для депонирования метаболитов. В то же время, культуры клеток табака (никотин) и моркови (антоцианин) синтезируют большое количество метаболитов при слабо дифференцированных клетках. Сегодня невозможно однозначно ответить на вопрос существует ли связь между ростом клеток и накоплением вторичных метаболитов. Деление клеток, приводящее к увеличению клеток биомассы, и синтез вторичных метаболитов разобщены во времени. Синтез вторичных метаболитов возрастает в фазе замедленного роста клеточной популяции (ростовые процессы особенно активны) и достигает максимума в стационарной фазе (прирост клеточной массы прекращается). Однако есть культуры, например, культура клеток *Catharanthus roseus*, у которых синтез вторичных метаболитов сопровождает весь период роста.

Важная особенность культивируемой популяции клеток – её стабильность в отношении синтеза и накопления продуктов вторичного синтеза. Так, в отделе биологии клетки и биотехнологии института физиологии растений РАН, под руководством известного специалиста в биотехнологии растений Р.Г. Бутенко, были получены разные штаммы клеток *Dioscorea deltoidea*, в том числе штамм-сверхпродукцент ИФР ДМ-0,5. Все эти штаммы сохраняли стабильность в отношении синтеза фураностаноловых гликозидов около 26 лет. Интересная особенность большинства клеток в культуре состоит в том, что обычно эти клетки не транспортируют синтезируемые метаболиты в питательную среду или другие клетки, хотя некоторые культуры составляют исключение, в частности культура клеток мака, которые депонируют алкалоиды в млечники. Синтез вторичных метаболитов в культивируемых клетках связан с внутриклеточными органеллами, в основном с пластидами и эндоплазматическим ретикуломом. В

клетках, не способных к транспорту метаболитов, продукты вторичного синтеза обычно накапливаются в вакуолях и свободном пространстве клеток. Для получения вторичных метаболитов возможно культивирование не только суспензионных клеток, но и каллуса на твердой питательной среде (например, каллус женьшеня). Так, например, технология производства биомассы женьшеня из каллуса освоена на Бобруйском республиканском унитарном предприятии «Гидролизный завод».

*На синтез вторичных метаболитов влияет целый ряд факторов. Прежде всего, выход продукта зависит от генотипа растения-донора. Показано, что культуры клеток, полученных от высокопродуктивных растений, продуцировали большее число метаболитов. Другой важный фактор – состав питательной среды и концентрация её компонентов, которые должны обеспечивать, с одной стороны, увеличение количества клеток-продуцентов, а с другой – усиливать сам процесс синтеза. На рост, т.е. на увеличение биомассы, существенно влияет природа и количество углеводов, соединений азота и фосфора, на синтез метаболитов – природа и концентрация фитогормонов. Так, при замене одного ауксина на другой, например, нафтилуксусной кислоты на 2,4-D, трехкратно увеличился синтез антрахинона суспензионной культурой *Morinda citrifolia*.*

Очень большое влияние на рост суспензионной среды оказывает её непрерывное перемешивание, которое обеспечивает достаточную аэрацию и предотвращает осаждение клеток. В лабораторных условиях перемешивание достигается благодаря использованию качалок или роллерных установок. При промышленном выращивании суспензионных культур применяют специальные системы (биореакторы), в которых идет увеличение биомассы и синтез вторичных соединений. *Эти системы обладают важными преимуществами: возможностью управлять процессом культивирования на основе показаний датчиков; большой объем культивируемого материала позволяет забирать значительные пробы, при этом стрессовых реакций у культуры клеток не возникает.*

В зависимости от способа перемешивания культуральной жидкости биореакторы делят на две группы:

I группа включает биореакторы, в которых суспензионная культура перемешивается только за счет подачи воздуха;

II группа – в этой группе биореакторов культура перемешивается механическим способом.

Выращивание культур растительных клеток в биореакторах проводится в двух режимах:

- *периодическое культивирование* – заключается в том, что по окончании процесса откачивают и используют всю суспензию клеток;

- *проточное культивирование* – в биореактор постоянно добавляют свежую питательную среду, и одновременно отбирают тот же объем либо суспензии (*открытое проточное культивирование*), либо одну отработанную питательную среду, оставляя клетки в реакторе (*закрытое проточное культивирование*).

Существует две разновидности открытого культивирования:

турбидостат – подразумевает измерение и автоматическое поддержание концентрации клеточной биомассы в реакторе на одном уровне путем изменения скорости потока;

хемостат – заключается в подаче в биореактор с постоянной скоростью питательного раствора при одновременном откачивании с той же скоростью клеточной суспензии.

Существует еще одна современная технология получения вторичных метаболитов с помощью иммобилизованных клеток культуры, т.е. помещение их в определенный носитель или адсорбция в нем. Носитель с клетками помещают в питательную среду. Клетки остаются живыми. Они прекращают рост, но продолжают синтез метаболитов, выделяя их в среду.

Установлено, что часто синтез вторичных метаболитов в суспензионной культуре останавливается на промежуточных этапах, не доходя до необходимого продукта. Получение продукта возможно благодаря процессу *биотрансформации*. Сущность его состоит в изменении промежуточных метаболитов с помощью культур других растений или клеток бактерий. Биотрансформация высокоэффективна в клетках бактерий, поэтому растительные клетки используют, когда процесс не осуществляется в клетках микроорганизмов. Вводимые в эти культуры вещества могут подвергаться гидроксилрованию, эпоксидированию, гликозилированию, этерификации, а также присоединяться к аминокислотам. Например, культура клеток женьшеня корневого происхождения способна трансформировать

(гликозилировать) фенольные соединения – продукты деятельности суспензионной культуры клеток корня женьшеня (*Panax ginseng*). Культуры клеток лебеды и картофеля могут биотрансформировать индолил-3-уксусную кислоту в индолил-3-ацетил-L-аспарагиновую кислоту. Еще один пример – биотрансформация карденолидов, гликозиды которых используют в медицине для лечения болезни сердца. Растения наперстянки (*Digitalis lanata*) в большом количестве синтезируют дигитоксин вместо необходимого дигоксина. Для соответствующей биотрансформации с успехом используют недифференцированную суспензионную культуру наперстянки. Иммобилизованные клетки этой культуры способны долгое время с постоянной скоростью трансформировать β -метилдигитоксин в β -метилдигоксин.

Первоначальным источником получения алкалоидов являются растения различных семейств, произрастающие эндемично в различных странах. Так, например, Раувольфия змеиная (*Rauwolfia serpentina Benth*) произрастает в Индии, Бирме и Африке; Стефания гладкая (*Stephania glabra (Roxb.) Miers*) – многолетнее тропическое травянистое растение семейства луносемянниковых – произрастает преимущественно в субтропических районах, корни и корнеплоды растения содержат алкалоиды стефаглабрин (стефарин), циклеанин, пальматин, коридин, гиндарин и др.; Тисс коротколистный (*Taxus brevifolia*) или Тисс остроконечный (*Taxus cuspidate*) произрастает в Корее, является продуцентом таксолов, обладающих высокой противоопухолевой активностью по отношению к различным линиям злокачественных клеток, в том числе и меланомных.

Приводим несколько примеров культур продуцентов, которые накапливают фармакологически активные вторичные метаболиты:

- алкалоиды барвинка розового (*Vinca rosea*, синоним – *Cathazanthus rosea*), которые активно применяются в качестве противоопухолевых препаратов, оказывающих цитостатическое действие на опухолевые клетки благодаря способности блокировать митоз на стадии метафазы. Эти алкалоиды входят в состав препарата «Розевин». В настоящее время созданы культуры-продуценты этих алкалоидов, превосходящие по синтетической активности исходные растения. Среди них штаммы, в кото-

рых произошло смешение синтеза в сторону одного из конечных метаболитов – серпентина или аймалицина;

➤ таксол и другие таксаны – вторичные метаболиты, полученные в суспензионной культуре тиса (*Taxus canadensis*), которые активно применяются в качестве противоопухолевых препаратов, оказывающих цитостатическое действие на опухолевые клетки;

➤ индольные алкалоиды (резерпин, аймалин, аймалицин, раувольфин, серпентин, иохимбин и др.), полученные в суспензионной культуре раувольфии змеиной (*Rauwolfia serpentine Benth*), применяются в медицине в качестве гипотензивных, антиаритмических, успокаивающих центральную нервную систему веществ. Данные вторичные метаболиты в комплексе или по отдельности входят в лекарственные препараты: «Резерпин» – применяется в терапии гипертонической болезни и психических расстройств); «Раунатин», «Аймалин» – антиаритмическое средство, снижает возбудимость миокарда, удлиняет рефракторный период, тормозит внутрижелудочковую проводимость; «Раувазан», «Иохимбин» – сильное местно-анестезирующее вещество, расширяет сосуды кожи и слизистых оболочек, антиметаболит серотонина применяется для лечения импотенции у мужчин и др.;

➤ алкалоиды барбариса, полученные в суспензионной культуре (*Berberis parvifolia*), используются для понижения артериального давления, повышения тонуса мускулатуры матки;

➤ алкалоиды мака прицветникового (*Papaver bracteatum*) – сангвинарин – применяется в медицине в качестве антимикробного средства. Алкалоид в культурах ткани синтезируется в количествах превосходящих содержание в интактных растениях.

➤ алкалоиды мака снотворного (*Papaver somniferum*) – опиатные алкалоиды (морфин, папаверин, кодеин), относящиеся к наркотическим веществам, полученные на суспензионной культуре тканей;

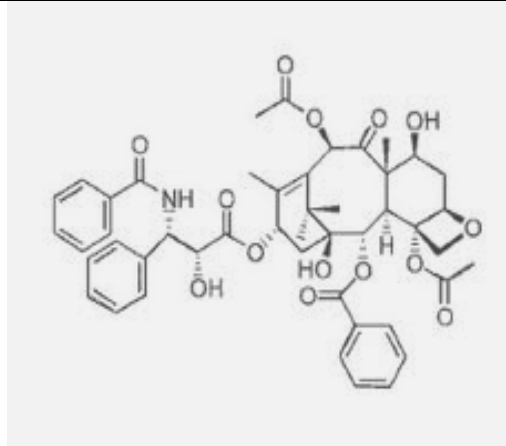
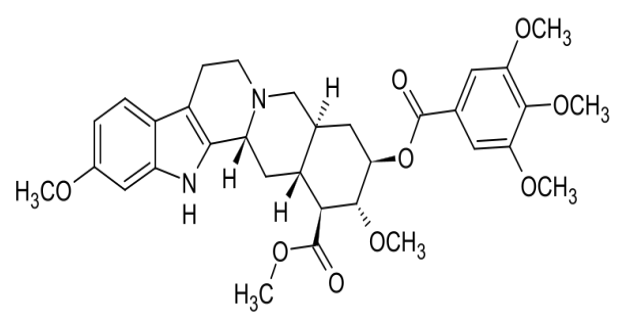
➤ кардиотропные гликозиды, полученные в суспензионной культуре наперстянки (*Digitalis lanata*) – применяются при нарушении моторики сердца. Суспензионные культуры способны к синтезу вторичных метаболитов, превышающие интактные растения, как по количеству, так и по разнообразию гликозидов;

➤ тритерпеновые сапонины (гликозиды) женьшеня (*Panax ginseng*) получают из суспензионных и каллусных культур. Используются в медицине при гипотонии, усталости, невращении и других заболеваниях;

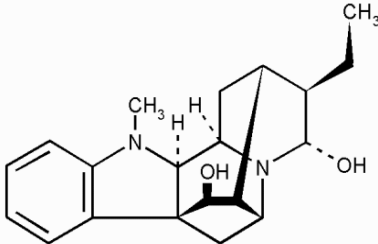
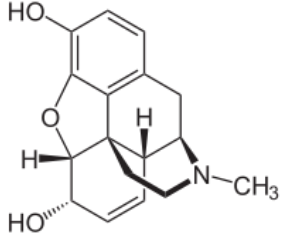
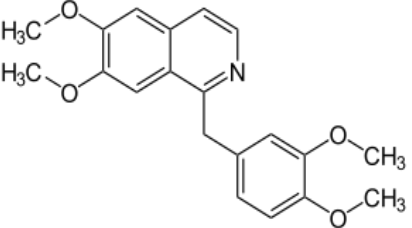
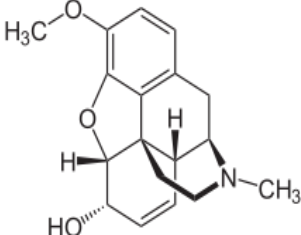
➤ убихиноны получают в промышленных масштабах из суспензионных культур *N. Tabacum*. Убихиноны используются в медицине и косметологии.

В табл. 4 представлены химические структуры алкалоидов.

Таблица 4 – Химическая структура алкалоидов

Алкалоиды	Химическая структура
1	2
Таксол	
Резерпин	

Продолжение таблицы 4

1	2
Аймалин	
Морфин	
Папаверин	
Кодеин	

Таким образом, использование суспензионных культур для синтеза вторичных метаболитов в промышленных масштабах имеет большие перспективы, и не только с точки зрения экономической выгоды – получения

более дешевой продукции в запланированных количествах. Важно то, что использование культуры клеток спасет от уничтожения тысячи дикорастущих растений, ставших уже редкими, которые синтезируют необходимые человеку вещества. В настоящее время показано, что культивируемыми клетками растений могут быть синтезированы практически все классы соединений вторичных метаболитов.

В связи с ограниченностью природных ресурсов со всей остротой встает проблема природного сырья. Выращивание этих культур в теплицах и на плантациях сдерживается климатическими условиями и дороговизной получаемых продуктов из-за низкого содержания алкалоидов в культивируемых растениях. Таким образом, становится очевидной необходимость замены плантационного, а тем более, дикорастущего сырья на гарантированно получаемую промышленным способом биомассу культивируемых клеток и тканей, содержащую необходимые алкалоиды в достаточном количестве.

Приводим несколько примеров биотехнологического получения ряда алкалоидов.

Пример 1. Алкалоиды из тиса – получают в несколько стадий.

Стадия а – получение живых зиготных эмбрионов растений различных видов тиса и дезинфицирование их. Для асептического культивирования эмбрионов зрелые или незрелые семена тиса, собранные в период времени с августа по ноябрь дезинфицируют и стерилизуют их поверхность. Например, семена помещают в 70 %-ный этанол на 30–60 секунд, а затем 2–3 раза промывают стерильной водой и стерилизуют 1–3 %-ным (по объему) раствором гипохлорита натрия в течение 24 часов. Стерилизованные семена промывают не менее 5 раз стерильной водой и отделяют эмбрионы, которые используют в качестве эксплантов.

Стадия б – культивирование указанных дезинфицированных эмбрионов в культуральной среде для получения каллуса из эмбрионов. Эмбрионы, полученные на *Стадии а*, помещают на твердую питательную среду для индукции каллуса. Индукцию соматических эмбрионов проводят с помощью двух методов, выбираемых на усмотрение исследователя: методом преэмбриогенных детерминированных клеток (PEDC – Pre-Embryogenic Determined Cell) или методом индуцированных эмбриогенных детермини-

рованных клеток (IEDC – Induced Embryogenic Determined Cell). Предпочтительнее использовать метод PEDC. Индукцию эмбрионов проводят, культивируя на твердой питательной среде с добавлением 1-нафталенуксусной кислоты, 2,4-дихлорфеноксиксусной кислоты и кинетина с целью увеличения индукции каллуса.

Стадия в – культивирование каллуса, полученного на *Стадии б* для получения соматических эмбрионов из каллуса. Полученные на *Стадии б* кусочки каллуса размножают путем субкультивирования на питательной среде, содержащей оптимальное количество витаминов, макро- и микроэлементов. Для этой стадии используют коммерческие среды: модифицированную среду Гамборга В₅ или среду Дурзана. При использовании метода IEDC для получения эмбрионов культивирование проводят в указанных средах, в которые добавлены гормоны роста растений (фитогормоны). Когда на поверхности эмбрионов формируется каллус и клеточная масса увеличивается в 10–20 раз, субкультивирование обычно продолжают на той же самой среде, содержащей половинную концентрацию ауксина. Поскольку большая часть каллуса теряет ростовые свойства из-за выделения непролиферирующими клетками фенольных соединений, в питательную среду добавляют 0,5 % активированного угля или 1–2 % поливинилпирролидона. Каллус субкультивируют на среде, свободной от регулятора роста, в течение 2–4 месяцев для формирования соматических эмбрионов из меристемных тканей каллуса. Культивирование проводят при 26 °С в условиях светового режима 16 ч света / 8 ч темноты. Культивирование в биореакторах осуществляется при использовании двух различных культуральных сред: одной – для роста клеток (ростовая среда) и другой – для получения таксанов. В качестве ростовой среды преимущественно используют среду Гамборга В₅ с добавлением 2–4 ppm 2,4-дихлорфеноксиксусной кислоты, а в качестве среды для получения продукта используют среду Мурасиге и Скуга с добавлением 2–10 ppm 1-нафталенуксусной кислоты. В среду для получения продукта добавляют стимуляторы для увеличения выхода таксола, которые могут быть получены из грибов. Примером грибов, из которых получают стимуляторы, служат *Cystospora abietis* ATCC N 38688 и *Penicillium minioluteum* NRRL 18467.

Стадия г – культивирование дезинфицированных эмбрионов (*Стадия а*) или соматических эмбрионов, полученных на *Стадии в*, для получения эмбрионного каллуса;

Стадия д – культивирование соматических эмбрионов (*Стадия в*) или эмбрионного каллуса (*Стадия г*);

Стадия е – выделение таксола (таксанов) из культуральной среды и клеточной суспензионной массы. Полученный эмбрионный каллус содержит большое количество таксола и может быть непосредственно использован для экстракции таксола и таксанов. Таксол обнаруживается в самих клетках и секретруется в культуральную среду. Отделение клеток от культуральной среды осуществляют путем центрифугирования (например, 1000 g в течение 5–10 минут). Таксаны получают из соматических эмбрионов или эмбрионного каллуса, а также из культуральной среды путем экстракции с помощью смеси метанола и метилхлорида в соотношении 1 : 1. Осадок клеток, образовавшийся в результате центрифугирования, может быть разрушен ультразвуком и использован для экстракции. Выход составляет до 0,15 % таксола по сухому весу суспензионных клеточных культур. Для сравнения приводим выход таксола из коры растения *Taxus brevifolia*, который не превышает 0,02 % в пересчете на сухой вес коры.

Пример 2. Алкалоиды из Стефании гладкой. Фармакологическая активность, которой обладает Стефания гладкая, зависит в основном от содержания алкалоидов гиндарина и стефарина. Алкалоиды Стефании гладкой эффективны при функциональных расстройствах ЦНС (неврастения, невроз навязчивых состояний), остаточных явлениях травматических и сосудистых заболеваний головного мозга, шизофрении, эпилепсии, хроническом алкоголизме. На базе алкалоида стефарина был создан эффективный препарат под названием «Стефаглабрин сульфат», уменьшающий трофические расстройства денервированных конечностей, способствующий ранней и более полной регенерации поврежденных нервов, а также обладающий антихолинэстеразным действием. «Стефаглабрин сульфат» был клинически апробирован при сирингомиелии, прогрессирующей мышечной дистрофии, миастении, рассеянном склерозе, невритах лицевого нерва, полиневритах и др.

В связи с ограничением природного сырья для получения стефарина в настоящее время перспективным источником для выделения алкалоидов является суспензионная культура клеток Стефании гладкой. Известно, что в большинстве случаев клеточные культуры различных алкалоид-

содержащих растений при длительном выращивании не способны накапливать алкалоиды в детектируемых количествах, либо достаточно быстро теряют способность к их синтезу в процессе культивирования. В 1992 году в ИФР РАН была создана культура клеток Стефании гладкой, из которой в результате обработки мутагеном нитрозометилмочевинной на среде с парафторфенилаланином были получены штаммы, характеризующиеся стабильными ростовыми характеристиками и присутствием стефарина в биомассе. Было показано, что в сумме алкалоидов основная доля приходится на стефарин, тогда как гиндариин, циклеанин и остальные алкалоиды присутствовали в следовых количествах. Подобная избирательность синтеза облегчает выделение и очистку целевого продукта. В биомассе клонов Стефании гладкой оценивали синтез алкалоидов; для работы оставляли клоны, содержащие не менее 0,2–0,3 % стефарина.

Получение алкалоида осуществляли следующим образом:

1. Культуры выращивали на модифицированной среде Мурасиге и Скуга с добавлением сахарозы и регуляторов роста. Для всех вариантов культивирования начальная плотность культуры составляла 1,4–1,8 г/л (по сухой биомассе клеток) при жизнеспособности культур 85–96 %.

2. Культивирование проводили в колбах (объем – 0,5 л с 70–100 мл суспензии; продолжительность цикла субкультивирования – 2 недели; культивирование проводили в темноте при температуре $26 \pm 0,5$ °С и влажности 70–75 %; частота вращения 80–100 об/мин) и в биореакторах (барботаж и механическое перемешивание – 30–65 об/мин; рабочие объемы – 15 л или 50 л; выращивание в течение 14 суток). Концентрацию растворенного кислорода pO_2 поддерживали на уровне 10–40 % от насыщения при отсутствии интенсивного пенообразования. Барботажный реактор дает лучшие результаты, а при механическом перемешивании обнаружены следовые количества алкалоидов. Содержание стефарина (от сухой биомассы) полученного в колбах составляет 0,09–0,3 %; полученного в реакторах при барботаже – 0,05–0,16 %, а полученного при механическом перемешивании – следовые количества.

3.2. Получение иммунобиологических препаратов с использованием генной инженерии растений

3.2.1. Генная инженерия растений

Продукция рекомбинантных белков в растениях в качестве фармакологически активных субстанций имеет ряд несомненных преимуществ перед другими системами экспрессии чужеродных генов. Культивирование растений является более экономичным по сравнению с другими клетками продуцентами рекомбинантных продуктов. Все, что требуется для нормальной жизнедеятельности растений – это минеральные соединения, содержащиеся в почве, вода, энергия солнечного света и углекислый газ. Кроме того, в растениях возможно посттрансляционная модификация синтезируемых чужеродных полипептидов. Обязательным условием образования функционально активных белков является правильная укладка полипептидной цепи. У млекопитающих за это отвечают, по крайней мере, два шаперона – Bip/GRP78 и GRP94. В высших растениях сигнальные последовательности (например, Lys-Arg-Glu-Leu на С-конце полипептида) направляют белки в эндоплазматический ретикулум, где обнаружены шапероны, гомологичные Bip/GRP78 и GRP94. *Важной особенностью растений по сравнению с культурами клеток млекопитающих и трансгенными животными является то, что в них не могут развиваться такие патогены человека и животных, как вирусы, прионы и другие контаминанты, что обеспечивает большую безопасность генно-инженерных продуктов, выделенных из растений.*

Белки, продуцируемые в семенах, клубнях, плодах обладают значительной стабильностью и могут сохраняться в них (без выделения) длительное время. Технологии сбора и обработки растений в больших масштабах уже существуют, что значительно упрощает и удешевляет работу с посевами трансгенных растений.

При синтезе некоторых белков в зернах риса, пшеницы, плодах томата, бананов и других растениях, становится возможным их введение в организм с пищей без предварительной очистки, что снижает стоимость таких препаратов и делает эти продукты (например, «съедобные» вакцины) более доступными для населения.

В настоящее время генная инженерия располагает комплексом наиболее перспективных и нестандартных методов для получения новых форм растений с искомыми и селекционно-полезными признаками. Это направление исследований представляет собой дальнейшее развитие классических методов генетики. В связи с тем, что создание нового направления – генной инженерии – обусловило ряд достижений в области молекулярной биологии и генетики растений, оно отождествляется с технологиями рекомбинантной ДНК. Технологии рекомбинантной ДНК основаны на способности ферментов эндонуклеаз рестрикции распознавать определенные участки в молекулах ДНК, что приводит к образованию разрывов на этих участках и «пришиванию» полученных фрагментов к другим молекулам ДНК. Такие фрагменты могут быть воспроизведены (клонированы) в больших количествах в специальных векторах (плазмидах бактерий и ДНК бактериофагов). В том случае, если при создании генетических конструкций для трансформации в качестве матрицы используется молекула РНК, прежде всего, необходимо получить копии ДНК (комплементарные копии ДНК) при помощи фермента обратная транскриптаза.

Помимо технологий рекомбинантных ДНК в генной инженерии растений используются и другие подходы и методы молекулярной биологии, иммунологии, биохимии, культуры тканей и клеток растений (биохимические мутанты как источники маркерных генов, изолирование протопластов и регенерация растений *in vitro* и т.д.).

Создание генетических конструкций и их переноса требует наличия:

1. *Ферментов – эндонуклеаз рестрикции*, которые способны расщеплять молекулу ДНК на отдельные нуклеотидные последовательности в точно определенном месте независимо от её происхождения. В настоящее время известно более 300 ферментов различной специфичности. Наиболее интенсивно используются EcoRI и BamHI. Полученные фрагменты нуклеиновых кислот имеют одинаковые 5'- и 3'- концы ДНК, что обуславливает комплементарность оснований этих концов и обеспечивает соединение двух различных молекул ДНК, предварительно обработанных одной и той же рестриктазой. В последние годы быстрому развитию молекулярно-генетических исследований в области генной инженерии способствует ме-

тод PCR (Polymerase Chain Reaction) – ПЦР (полимеразная цепная реакция).

2. *Методов получения и идентификации фрагментов ДНК*. Для этих целей используют электрофорез в агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

3. *Ферментов – лигаз*, которые соединяют нуклеотидные фрагменты, полученные после обработки эндонуклеазами.

4. *Надежных систем клонирования генов различного происхождения*. Наиболее эффективны плазмиды *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis*. В последнее время особое значение приобретает метод YAC (Yeast Artificial Chromosom), который позволяет клонировать фрагменты ДНК размером до 450 тыс. п. н.

5. *Эффективных методов переноса генетических конструкций и методов отбора трансформированных клеток*. В настоящее время в основном используются два вида векторов – плазмиды и вирусы. Плазмиды являются внехромосомным генетическим материалом бактерий, размножающимся автономно. Особенно удобны для генетической трансформации плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium Rhizogenes*.

Успех использования методов генной инженерии в селекционно-генетических работах по улучшению сельскохозяйственных растений, прежде всего, зависит от возможности изолирования генов, определяющих ценные признаки. Размеры растительных генов значительно превышают таковые у бактерий, что делает пока невозможным их перенос.

Одна клетка бактерий в среднем содержит около 5000 генов, в то время как геном растения в целом в 1000 раз больше, т.е. приблизительно такой же, как и геном человека. Размер геномов растений значительно варьирует в зависимости от того, к какой таксономической группе принадлежит данный вид растения. Известно также, что у табака около 10000 генов и только 5 % ядерной ДНК участвует в синтезе белков, тогда как функции остальных 95 % не выяснены.

Установлено, что клетки отдельных органов растений (корней, листьев, стеблей и цветков) содержат одинаковое количество потенциально активных генов. Более того, клетки каждого из этих органов имеют набор генов, которые экспрессируются только в этом органе. Например, в чаше-

листьях и листьях экспрессируется около 70 тысяч специфических генов, а в семяпочках и пыльниках около 10 тысяч. Кроме того, во всех органах растения экспрессируются общие гены, названные хозяйскими, которые кодируют ферменты, необходимые для всех клеток растения.

Генная инженерия растений позволяет создать растения: с улучшенным аминокислотным составом запасных белков растения; с повышенной эффективностью процесса фотосинтеза и усвоения азота; с устойчивостью к фитопатогенам, гербицидам и насекомым и т.д. Однако нашей задачей является рассмотреть достижения генной инженерии при получении трансгенных растений – продуцентов фармакологически активных субстанций.

К настоящему времени ведущими биотехнологическими центрами мира модифицировано более 150 видов растений. По данным Дейнеко Е.В. созданы трансгенные растения устойчивые к гербицидам, насекомым вредителям, вирусам и болезням, растения со сбалансированным составом аминокислот и измененным составом жирных кислот. Созданы трансгенные растения, пригодные для биодegradации полимеров, детоксикации тяжелых металлов, для очистки окружающей среды от различного рода загрязнений. В настоящее время альтернативной системой экспрессии гетерологичных белков для фармакологии используют ряску, мох, некоторые виды водорослей, а также клетки генетически модифицированных растений, культивируемые в суспензионной культуре.

Суспензионные клеточные культуры на основе генетически модифицированных растений привлекают внимание исследователей как перспективные потенциальные системы для наработки фармацевтических белков. Такие культуры могут быть получены из рыхлых каллусных тканей, индуцированных из генетически модифицированных эксплантов, либо на основе сокультивирования клеточной суспензии и *Agrobacterium tumefaciens*.

Разрабатываются клеточные линии для наработки рекомбинантных белков для коммерческих целей на основе клеточных культур моркови и риса (например, компания «Protalix», Израиль). В 2006 году в США компанией «Dow AgroSciences» лицензирована вакцина против возбудителя болезни Ньюкасла (азиатская чума кур) на основе суспензионной клеточной культуры табака.

Хотелось бы отметить, что особенностью клеточных культур как системы экспрессии для наработки рекомбинантных белков по сравнению с использованием для этого целых растений является возможность унифицировать клеточные культуры по ростовым характеристикам, размерам и типу клеток.

В настоящее время существует ряд фирм («Planet Biotechnology», «Biolex», «Novoplant», «Protalix», «Dow AgroSciences» и др.), в интересы которых входит наработка белков медицинского назначения на основе генетически модифицированных растений. Для создания трансгенных белков используют табак, рис, люцерну, подсолнечник, ячмень, картофель, кукурузу и др. Большая часть разработок рекомбинантных белков основана на использовании генетически модифицированных растений с ядерной трансформацией, т.е. доставкой чужеродного гена в ядерный геном растения. Такие фирмы как «Chlorogen» и «Bayer» для получения рекомбинантных белков используют трансплазматные растения с доставкой чужеродного гена и в хлоропластный геном растения, а также метод агроинфильтрации, основанный на транзientной (временной) экспрессии чужеродных генов в растительных клетках. Для примера рассмотрим наработку фармакологически активного белка апротинина. Обычно белок получают из легких крупного рогатого скота. Предложен способ получения рекомбинантного апротинина (РА) с использованием штамма продуцента – *Saccharomyces cerevisiae*. Сравнение системы экспрессии показало, что в тканях табака при ядерной трансформации обнаруживалось 0,03 % РА, в тканях люцерны – 0,1 % РА, в семенах кукурузы – 8,9 % РА, в тканях табака при агроинфильтрации – 4,2 % РА. Полученный рекомбинантный апротинин не отличался от соответствующего белка выделенного из легких крупного рогатого скота. Фирмы: «ProdiGene», «Medicago», «Large Scale Biology Corporation» получают коммерческие препараты рекомбинантного апротинина из табака, кукурузы и люцерны.

Возникает закономерный вопрос, – каким образом возможно введение чужеродной генетической информации в клетки высших растений? Сегодня наука располагает несколькими хорошо апробированными методами. Остановимся на основных методах введения генетической информации в клетки растений.

Метод микроинъекций ДНК. Для переноса чужеродной ДНК в растительные клетки применяются стеклянные микроиглы, которые с помощью микроманипулятора вводятся в клетку. Затем гидравлической системой из микроиглы выдавливается ДНК в соответствующем буферном растворе. Примерный объем инъекции в каждую растительную клетку составляет 10^{-8} – 10^{-9} мл. *Преимуществом данного метода трансформации является возможность использовать в качестве мишеней, как единичные культивируемые клетки, так и клетки соматических тканей.* Метод микроинъекций ДНК, не являясь видоспецифичным, значительно расширяет круг потенциальных объектов трансформации.

Трансформация растительных клеток методом микроинъекций при использовании различного типа векторных ДНК происходит с эффективностью 10–20 %. Частоту трансформации можно повышать, вводя чужеродную ДНК непосредственно в ядро, а не в цитоплазму растительной клетки.

Метод электропорации. Данный метод впервые был применен по отношению к клеткам животных, а затем модифицирован и для растительных протопластов. Процедура электропорации заключается в том, что растительные протопласты в высоких концентрациях подвергаются действию высоковольтных электрических импульсов, которые обратимо усиливают проницаемость биомембран. Молекулы нуклеиновых кислот, добавляемые в среду для электропорации, поглощаются клетками преимущественно через поры в клеточных мембранах. Так, с помощью метода электропорации удалось ввести РНК вируса табачной мозаики в протопласты *Nicotiana tabacum*. При этом с целью повышения частоты трансформации проводилось последующее за процедурой электропорации 10-ти и 30-ти минутное охлаждение суспензии протопластов и вирусной РНК. В случае 10-ти минутного охлаждения частота трансформации составляла 29 %, а при 30-ти минутном охлаждении – 55 %.

Экспрессия вводимой в протопласты чужеродной ДНК (или РНК) при электропорации определяется уже через несколько часов.

Метод бомбардировки микроснарядами. Данный метод заключается в бомбардировке растительных клеток высокоскоростными вольфрамовыми микроснарядами, несущими нуклеиновые кислоты. Захват нуклеино-

вых кислот вольфрамовыми микроснарядами происходит в результате добавления раствора, содержащего нуклеиновую кислоту, к суспензии вольфрамовых частиц и последующего центрифугирования. Суспензия микроснарядов помещается в специальное устройство, на переднюю поверхность цилиндрического макроснаряда. Перемещаясь по осевому валу устройства, макроснаряд способствует ускорению микрочастиц. Высокоскоростные вольфрамовые микроснаряды проходят через отверстие в стальной пластинке устройства и проникают в растительные клетки-мишени, расположенные на расстоянии 10–15 см. Экспрессия введенных маркеров наблюдается в 30–40 % клеток, подвергшихся бомбардировке.

Данный метод является одним из альтернативных способов преодоления проблемы ограниченного круга растений, чувствительных к трансформации. Метод бомбардировки микроснарядами не требует использования культуры клеток и предварительной обработки реципиентных клеток.

Метод бомбардировки высокоскоростными золотыми частицами, покрытыми ДНК. Впервые этот метод был использован для трансформации клеток, выделенных из зародышей сои. Суспензию золотых частиц, покрытых плазмидной ДНК, готовят следующим образом. Выделенные из *Agrobacterium* плазмиды добавляют к суспензии, содержащей золотые частицы диаметром от 1 до 5 мкм, затем суспензию высушивают потоком азота и ускоренными в электрическом поле золотыми частицами бомбардируют растительные протопласты. Полученные результаты показывают, что бомбардировка высокоскоростными золотыми частицами, покрытыми ДНК, приводит к стабильной трансформации клеток. Этот метод применим по отношению к различным растительным тканям.

Метод трансформации при помощи наночастиц – липосом. В данном разделе нет необходимости останавливаться на структуре липосом, их составе и способах получения, так как ранее мы подробно освещали эти вопросы. На первых этапах данный метод трансформации был использован для введения нуклеиновых кислот в культуру животных клеток. Впоследствии, используя протопласты, появилась возможность введения генетического материала в растительные клетки.

Инкапсулирование нуклеиновых кислот носит случайный характер, поэтому выход липосом, пригодных для последующей трансформации, в

значительной степени зависит от количества исходных реагентов. Тип фосфолипидов имеет важное значение для взаимодействия липосом с протопластами разных видов растений. В зависимости от фосфолипидов, входящих в состав мембраны, липосомы могут быть либо катионными или анионными, либо нейтральными. В процессе поглощения липосом и их содержимого протопластами растений выделяют три этапа: 1) ассоциацию липосом с растительными протопластами; 2) эндоцитоз липосом; 3) разрушение мембраны липосом и высвобождение нуклеиновых кислот. На эффективность этого метода трансформации оказывает влияние ряд факторов: концентрация ПЭГ; концентрация ионов металла в инкубационном буфере; время инкубации липосом с протопластами.

Основными преимуществами метода трансформации с помощью липосом, являются:

- ✓ обеспечение сохранности нуклеиновых кислот от расщепления нуклеазами, присутствующими в клеточной культуральной среде;
- ✓ крайне низкая токсичность липосом по отношению к растительным клеткам;
- ✓ возможность применения метода к различным видам растений.

Метод агробактериальной трансформации. Использование природных векторов, таких как Ti-плазида *Agrobacterium tumefaciens* и Ri-плазида *Agrobacterium Rhizogenes* – широко распространенный подход к введению чужеродной генетической информации в клетки высших растений. В качестве растений обычно используют стерильные растения или экспланты различных органов. Данный метод имеет ряд существенных недостатков. Одним из них является ограниченный круг хозяев агробактерий. Существует возможность прямого переноса агробактериальной ДНК в растительные клетки, что способствует трансформации однодольных растений, недостижимых для плазмидной системы *A. tumefaciens* и *A. Rhizogenes*. Разработка способов прямого переноса ДНК в растения до недавнего времени была ограничена в связи с клеточной стенкой растений. Эта проблема была решена путем использования растительных протопластов, т.е. клеток, лишенных стенок. Однако прямой перенос агробактериальной ДНК в растения имеет ряд недостатков: низкая частота трансформации; методы получения протопластов разработаны не для всех культур-

ных растений; регенерировать целые растения из протопластов пока еще невозможно для ряда культур.

3.2.2. Растительные вакцины

Вакцины растительного происхождения представляют собой вакцины на основе трансгенных растений, в геном которых был встроены соответствующий фрагмент генома патогенного микроорганизма.

Первая такая вакцина получена в 1992 году Ч. Артзеном. Трансгенное растение табака стало продуцировать «Австралийский антиген» (HBs-Ag) – антиген вируса гепатита В. Полученный из растений и частично очищенный антиген, введенный мышам, вызывает иммунный ответ подобный вакцинации против гепатита В. В 1998 году с помощью картофеля, продуцирующего В-субъединицу холерного антигена, была получена защита у мышей при заражении возбудителем холеры. Аналогичная вакцина была получена на табаке, продуцирующем антигены вируса кори. Проведены работы по получению вакцины против бешенства на томатах. На настоящий момент клубни картофеля трансгенных сортов, экспрессирующие бактериальные токсины и антигены гепатита В (уровень антител при использовании картофеля превысил уровень защитного титра у людей – 10 МЕ/мл) и вируса Норфолка, в сыром виде представляющие собой съедобные вакцины, успешно прошли I фазу клинических испытаний. Вакцина против вируса Норфолка, полученная на трансгенном картофеле была изучена на 20 добровольцах, 19 из которых (95 %) показали высокий уровень иммунного ответа. Начаты работы по созданию вакцин против туберкулеза в листьях салата. Проводятся интенсивные исследования российских ученых (Новосибирск, ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор») по созданию съедобной растительной вакцины против СПИДа и гепатита В. Ими получен химерный ген, который встроены в плазмиду кишечной палочки. После проверки возможности производства данного химерного белка была подключена бактерия *Agrobacterium tumefaciens* (предварительно в неё была внедрена плазида), которой были заражены проростки томатов итальянского селекционного сорта «Вентура», отличающиеся высоким содержанием белка. Химерный ген встраивался в геном растения, и

начиналось продуцирование нужного белкового антигена. Полученный из сублимированных томатов порошок растворяли в воде и скармливали мышам. Через определенное время в крови животных обнаруживались антитела против антигенов гепатита В и СПИДа. Обнадеживающие результаты получены при создании коревых вакцин на трансгенных растениях. Мышей кормили листьями табака с гемагглютинином из вируса штамма кори Эдмонтон. Титры антител превысили защитный титр в 5 раз. Следующим этапом было изучение таких вакцин на приматах. Трансгенный рис, салат и детское питание против кори находится на стадии разработки. Применение съедобных вакцин растительного происхождения значительно облегчает процессы производства препаратов и их доставки в организм. Учитывая, что большинство патогенов попадает в организм через слизистые оболочки, создание и поддержание полноценного местного иммунитета слизистых оболочек должно обеспечить защиту человека от большинства инфекционных заболеваний. Особенно привлекательным выглядит пероральное применение растительных вакцин, т.к. оно позволяет избежать использования инъекционных процедур. Кроме того, растительные вакцины не содержат животных белков и патогенов животного происхождения. Трансгенные растения, такие как картофель, томаты, бананы, в состав которых входят необходимые для вакцинации антигены можно выращивать в промышленных масштабах и при этом нет необходимости в создании дорогостоящих технологических процессов и уникального оборудования. Одним из критериев приемлемости является съедобность плодов растений в сыром виде, что позволит избежать потери антигенной активности при термической обработке растений. В то же время, *для практического использования растительных вакцин придется ответить на ряд существенных вопросов:*

- возможность сохранения антигенов в кислой среде желудка;
- способность переносить хранение и изучение температурных режимов хранения;
- детальное изучение возможности развития иммунологической толерантности слизистой оболочки ротовой полости при употреблении съедобных вакцин;

- разработка протоколов приема растительных вакцин;
- изучение и подбор адъювантов, повышающих эффективность таких вакцин;
- подбор оптимального метода введения генного материала: либо с помощью генных пушек при бомбардировке эмбриональных клеточных культур растений, либо с помощью бактерии *Agrobacterium tumefaciens* для доставки в геном растений плазмиды с встроенной ДНК.

Сегодня в РФ в Сибирском институте физиологии и биохимии растения АН совместно с НПО «Вектор» (г. Новосибирск) и учеными из США проводятся совместные работы по созданию вакцин для перорального применения. На основе трансгенных растений разрабатываются инновационные вакцины против опасных инфекций в форме капсул. Предложены следующие кандидаты вакцин: 1 – комбинированная вакцина против СПИДа и гепатита В; 2 – вакцина против гепатита В; 3 – вакцина против цервикального рака.

Механизм иммунизации «съедобными вакцинами» основан на антиген-представляющей способности перитонеальных макрофагов тонкого кишечника млекопитающих. В кишечнике чужеродный белок, обладающий антигенными свойствами, распознается специальными М-клетками, которые широко представлены в толще слизистого эпителия. М-клетки транспортируют захваченный антиген к перитонеальным макрофагам и В-лимфоцитам, находящимся в лимфоидных образованиях тонкого кишечника (пейеровых бляшках). В результате презентации антигена на поверхности антиген-представляющих клеток происходит активация Т-лимфоцитов – хелперов, которые в сочетании с антигеном активируют В-лимфоциты. Дифференцированные В-клетки выходят из лимфоидных фолликулов слизистой оболочки и поступают через общую циркуляцию в мезентеральные лимфатические узлы, где происходят их созревание и превращение в плазматические клетки, синтезирующие специфические антитела. Плазматические клетки способны снова мигрировать к слизистым оболочкам дыхательных путей, желудочно-кишечного и мочеполового трактов. Секреторные иммуноглобулины IgA транспортируются на по-

верхность слизистых оболочек, где они связываются с чужеродными антигенами и препятствуют их проникновению в организм.

Следует отметить, что мукозная вакцинация стимулирует как иммунный ответ слизистых оболочек – первого защитного барьера на пути патогенных агентов, так и общий иммунный ответ организма. Так, например, описана работа по изучению иммуногенности «съемной вакцины» на основе трансгенных растений томатов, экспрессирующих HBsAg-антиген вируса гепатита В. Было показано, что при пероральном введении мышам гомогената плодов трансгенных растений томатов уровень антител в сыворотке крови возрастал после второго кормления и оставался высоким до конца эксперимента.

Таким образом, вакцины с использованием трансгенных растений (картофель, рис, томаты, салат, листья табака) позволяют надеяться на создание в ближайшем будущем эффективных препаратов против гепатита В, ВИЧ, сибирской язвы, вируса папилломы, холеры, кори и ряда других инфекционных заболеваний.

3.2.3. Растения – продуценты иммуноглобулинов

Учитывая потенциальные преимущества генно-инженерной системы растений, оправданным было бы заменить клетки млекопитающих при производстве антител на растительные.

В 1989 году были созданы первые трансгенные растения табака, продуцирующие функционально активные моноклональные антитела IgG1. Для этого ДНК-копии матричных РНК, выделенных из мышинной гибридомы 6D4 и кодирующих легкую (каппа) и тяжелую (гамма) цепи иммуноглобулина IgG1, встроили в агробактериальный бинарный экспрессирующий вектор. Полученные гибридные конструкции для каждой цепи иммуноглобулина перенесли в клетки табака, на селективной среде отобрали трансгенные растения и охарактеризовали продукцию соответствующих целевых белков. Трансформанты, продуцирующие индивидуальные цепи иммуноглобулина, скрестили и получили потомство, экспрессирующее обе цепи. В таких растениях цепи обоих типов объединялись и образовывали

функционально активные молекулы, специфически связывающиеся с соответствующими антигенами. Функциональные антитела накапливались в количестве, достигающем 1,3 % суммарного белка листьев. Экспериментально было установлено, что для сборки молекулы иммуноглобулина необходима секреция обеих цепей, т.е. каждая цепь должна синтезироваться в виде пребелка, на N-конце которого находится сигнальный пептид.

В дальнейшем в ряде лабораторий были получены трансгенные растения, которые продуцировали различные полноразмерные иммуноглобулины, либо так называемые одноцепочечные переменные фрагменты (scFv – single-chain variable fragment) иммуноглобулинов, представляющие собой переменные области тяжелой и легкой цепей, соединенные линкерным пептидом. При испытаниях на добровольцах было показано, что антитела против *Streptococcus mutans* (основной агент, вызывающий кариес зубов), произведенные в растениях табака, после нанесения на зубы защищают их от кариеса, по крайней мере, в течение четырех месяцев. Синтезированные в растениях сои и кукурузы антитела против вируса герпеса (тип 11) в эксперименте предотвращали генитальный герпес у мышей. Эти результаты указывают на большую перспективность исследований по созданию растений, продуцирующих специфические иммуноглобулины.

Уровень продукции чужеродных полипептидов может существенно зависеть от вида растения или ткани, в которых они синтезируются. Например, один и тот же вид рекомбинантных антител в листьях трансгенного табака накапливался лишь до 0,04 % суммарного белка, в то время как в листьях арабидопсиса – до 3,0 %.

Различия в гликозилировании белков, синтезированных в клетках растений и млекопитающих – главная проблема при использовании их в медицине. Гликопротеины, продуцированные в растениях, имеют две дополнительные углеводные детерминанты: $\beta(1,2)$ -ксилозу и $\alpha(1,3)$ -фукозу. Было высказано предположение, что такие олигосахаридные остатки, не найденные в N-гликанах млекопитающих, могут оказаться аллергенными для человека, так как в крови экспериментальных животных обнаружены специфические IgE против растительных углеводных детерминант. Хотя

это не может напрямую расцениваться как показатель аллергии, тем не менее, лучше избегать возможных побочных эффектов при использовании рекомбинантных белков в клинической практике. Сравнение процессов синтеза N-гликанов в клетках растений и млекопитающих показало, что ключевым ферментом, способным превращать растительные N-гликаны в N-гликаны млекопитающих, является $\beta(1,4)$ – галактозил-трансфераза. Было проведено скрещивание трансгенных растений табака, экспрессирующих этот фермент, с растениями, продуцирующими одновременно тяжелую и легкую цепи иммуноглобулина. В потомстве, продуцирующем три чужеродных белка, до 30 % молекул иммуноглобулина содержали галактозилированные N-гликаны.

Полученные результаты позволяют надеяться на то, что в ближайшие годы большинство проблем с модификацией белков человека, синтезируемых в трансгенных растениях, будет решено и «растительные антитела» будут широко использоваться в клинике. Такому прогнозу должно способствовать и то, что по произведенным оценкам, антитела, синтезированные в трансгенных растениях, заметно дешевле по сравнению с этими же антителами, произведенными в культуре клеток млекопитающих или молоке трансгенных животных.

В 1955 году датский исследователь Нильс Эрне разработал новый теоретический метод, который обеспечивал огромное разнообразие антител, защищающих организм от инородных клеток и молекул. В своей так называемой клонально-селекционной теории (селекционной гипотезе образования антител) он постулировал, что каждая иммунная клетка (лимфоцит) несет информацию, необходимую для образования специфического антитела. В процессе иммунной реакции клетки, производящие соответствующие антитела, усиленно делятся, предохраняя тем самым организм от проникновения чужеродных элементов. Из этого открытия следовало, что если в клеточной культуре вырастить потомство лимфоцитов, то можно выделить специфические вещества, например, антитела, оказывающие сильное терапевтическое воздействие. Лимфоциты весьма чувствительны и быстро погибают в искусственной среде. С другой стороны, хорошо из-

вестно, что раковые клетки способны размножаться на протяжении достаточно долгого времени. Это обстоятельство и было использовано аргентинским иммунологом Ц. Мильштейном (С. Milstein) и немецким ученым Г. Келером (G. Kohler), работающими в Кембридже. Им удалось добиться слияния лимфоцитов со злокачественными клетками миеломы (1975 г.). Полученные гибридные клетки (гибридомы) могли производить антитела, и в то же время их в изобилии можно было выращивать в искусственной среде. Выбор опухолевых клеток не случаен. Плазмцитомы происходят из «юных» плазматических клеток – из тех клеток, которые способны к синтезу антител. Способность вырабатывать, а затем и секретировать в кровь иммуноглобулины сохраняется в опухолях. Кроме того, опухоли возникают из одной мутантной клетки (опухоль развивается как клон) и могут образовывать иммуноглобулины. Технология получения моноклональных антител сводилась к следующему: предварительно в организм мышей вводили антиген, вызывая иммунный ответ; извлекали лимфоидную клетку, продуцирующую соответствующие антитела; лимфоидную клетку объединяли с клеткой опухоли (миеломы); получали непрерывно делящийся клеточный гибрид (гибридома), способный синтезировать антитела с заданной специфичностью. Обычно гибридомы получают путем слияния В-лимфоцита, вырабатывающего антитела с заданной специфичностью и клеток опухоли лимфоидной ткани (плазмцитомы). За свое открытие ученые в 1984 году были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине. Образованные гибридами моноклональные антитела имеют сходное молекулярное строение и обладают одинаковой специфичностью. Таким образом, с 1975 года начинается эпоха создания и использования моноклональных антител. В настоящее время уже созданы десятки препаратов моноклональных антител успешно применяющиеся в клинике при заболеваниях различной этиологии. Гибридомы, синтезирующие определенные виды антител, отбирают на селективных ростовых средах. Затем отобранные гибридомы помещают на культуральную среду, в которой они размножаются и образуют много родственных клеток (клон). Такие клоны могут синтезировать антитела в неограниченных количествах. Обычно

препаративные количества моноклональных антител получают в виде асцитной жидкости, которая вырабатывается в организме мышей в ответ на внутрибрюшинное введение гибридом. Асцитная жидкость содержит гомогенные моноклональные антитела в достаточно высоких концентрациях. После очистки, например, аффинной хроматографией, моноклональные антитела используются либо при конструировании тест-систем в виде конъюгата с ферментом или для непосредственной сорбции на планшете, либо для получения лекарственных препаратов.

Несколько лет назад в медицинскую практику был введен коммерческий препарат Трастузумаб (Герцептин), созданный фирмой Genentech (США) и производимый фирмой Hoffman La Roche (Швейцария). Это лекарство создано на основе гуманизированных моноклональных антител, производимых мышинной гибридомой. Этот препарат представляет антитела, специфически взаимодействующие с онкогеном HER2/neu. HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, также Neu, ErbB-2) является протоонкогеном семейства рецепторов эпидермального фактора роста – рецепторных тироксинкиназ. HER2 кодируется трансмембранным рецептороподобным белком с молекулярной массой 185 кДа, который структурно подобен другим членам семейства рецепторов эпидермального фактора роста. Амплификация гена HER2 приводит к гиперэкспрессии белка HER2 на мембране клеток опухоли, что в свою очередь вызывает постоянную активацию рецептора HER2. Показано, что использование Герцептина снижает риск развития отдаленных метастазов и увеличивает продолжительность жизни пациентов при раке молочной железы. Обычно моноклональные антитела против HER2/neu получают, используя культуру клеток животных: клетки яичника китайского хомячка и клетки миеломы мыши. Уровень продукции моноклональных антител достаточно высок и может достигать 3 г антител на один литр культуры животных клеток. Однако его высокая стоимость складывается из затрат на животных, оборудование, систему выполнения требований GMP. В связи с этим весьма перспективным является использование генетически модифицированных растений для получения рекомбинантных белков медицинского назначения, вклю-

чая получение моноклональных антител. Растения имеют ряд несомненных преимуществ по сравнению с клетками бактерий, дрожжей и млекопитающих. Растения не содержат патогенных для человека вирусов и прионов; не требуют применения дорогостоящей аппаратуры. Стоимость выращивания опытных растений несравнимо ниже стоимости культивирования клеток бактерий, дрожжей и млекопитающих. Например, новый противоопухолевый препарат («Антитела к HER2»), полученный при помощи биотехнологии растений в 5–6 раз дешевле своего аналога, полученного на клетках млекопитающих. Растительная клетка, экспрессирующая антитело, может быть в виде изолированной клетки, лишенной клеточной стенки (протопласт), или в составе культивируемого экспланта (ткань, орган) или целого растения. Культивирование клеток в искусственных условиях проводится в стерильной среде известного состава, в контролируемых условиях при постоянной температуре (26–28 °С) и освещенности. Выращивание проводят в культивируемых клетках, как в виде суспензионной культуры, так и растительных эксплантах, культивируемых на твердой среде, или же в целом растении, выращиваемом в подходящей среде, такой как природный субстрат (например, почва, заменители почвы), или в гидропонной культуре. Антитело может накапливаться внутри растительной клетки или с помощью введения в его состав сигнальной последовательности может быть экспортировано в культуральную среду. Извлечение антитела может происходить из внутриклеточного содержимого путем разрушения клеток культуры или непосредственно из культуральной среды в том случае, когда за счет включения в состав антитела сигнальной последовательности обеспечивается секреция в культуральную среду.

При получении моноклональных антител используются невирусные векторы для синтеза в растительной клетке антитела. Эти векторы не конкурируют между собой в цитоплазме. Однако их синтез и стабильность в цитоплазме находятся под контролем механизма «умолкания» (сайленсинга) генов, что может приводить к снижению уровня продукции целевого антитела. В этом случае, когда обнаруживается снижение продукции целевого белка (антител) в результате сайленсинга генов предлагается исполь-

зовать антисайленсинговые белки. Авторами предложено в качестве антисайленсингового белка использовать белок Р19 вируса кустистой карликовости томатов, который специально синтезирован. Такой же антисайленсинговый эффект могут оказывать короткие некодирующие РНК, синтезируемые под контролем РНК-полимеразы III.

Рассмотрим *технологические стадии получения моноклональных антител в листьях табака (Nicotiana benthamiana)*.

1. ДНК, кодирующая цепи антитела, может быть введена в растительную клетку известными вышеописанными способами, например, с помощью электропорации, бомбардирования микроснарядами, микроинъекций и посредством инфицирования вирусом. Кроме того, в растительную клетку ДНК может быть доставлена с помощью *Agrobacterium tumefaciens*. Для транзientной экспрессии чужеродного гена в листовой ткани чаще используют метод агроинфильтрации и агроинокуляции. Трансформация растительных клеток может быть стабильной, сопровождающейся интеграцией вводимой ДНК в клеточный геном. Желаемый эффект также может быть достигнут при введении в ядро ДНК и транзientном (временном) синтезе РНК без стабильной интеграции ДНК в хозяйский геном.

2. Из культуры клеток гибридомы IC085 генно-инженерными методами были выделены последовательности, кодирующие вариабельные участки антитела, аффинные к онкогену HER2/neu. Полученные фрагменты были встроены в конструкции, содержащие последовательности, кодирующие участки антител класса G.

3. Отдельные гены легкой и тяжелой цепи антитела против онкогена HER2/neu были клонированы в субклон рFF19, содержащий 35S-промотор по сайтам NcoI и XhoI. На следующем этапе гены по отдельности клонировали в вектор Bin 19 по сайтам HindIII-EcoRI с получением векторов соответственно, рА 11860 и рА 11903. *Agrobacterium tumefaciens* с бинарными векторами, экспрессирующими тяжелую или легкую цепь антитела против онкогена HER2/neu, засеивали в жидкую среду 2-УТ и выращивали ночь при температуре 28 °С. Ночную культуру осаждали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 3 минут. Затем осадок ресуспендировали в

буфере для агроинфильтрации, содержащем 10 мМ MgCl₂ и 10 мМ MES (рН – 5,0), и вводили в лист табака в соответствующем разведении. Установлено накопление легкой цепи (L-цепь) и тяжелой цепи антитела против онкогена HER2/neu в листьях *Nicotiana benthamiana* через 3 дня после агроинъекции бинарным вектором рА 11866. В этих экспериментах использовали конструкцию, кодирующую антисайленсинговый белок Р19 вируса кустистой карликовости томатов, ген которого был специально синтезирован.

Таким образом, при одновременной совместной инъекции векторов рА 11903 и рА 11860 в листья табака, в них накапливаются легкая и тяжелая цепи антитела, которые в дальнейшем выделяли и очищали аффинной хроматографией на колонке с протеин G-сефарозой. Из 1 кг листьев *Nicotiana benthamiana* можно выделить до 300–500 мг очищенного моноклонального антитела. Синтезированное в растительной клетке антитело способно связываться с онкогеном HER2/neu на поверхности раковых клеток.

В заключение необходимо отметить, что с помощью методов генетической инженерии стало возможным создавать новые типы растений, в тканях которых могут синтезироваться и накапливаться белки из различных гетерологичных систем. К настоящему времени созданы трансгенные растения, контролируемые синтез соответствующих рекомбинантных белков, важных в терапии различных заболеваний. Сегодня реальным становится создание на основе трансгенных растений антигенов и вакцин, моноклональных антител и ингибиторов ферментов, фармакологически активных веществ различного действия.

Контрольные вопросы

1. В чем преимущества использования растений как продуцентов фармацевтических субстанций?
2. Классификация вторичных метаболитов растений.
3. Что представляет собой каллусная ткань и каковы условия её выращивания?
4. Влияние условий выращивания суспензионных культур (температура, pH, свет, аэрация и др.) на клетки растений.
5. Влияние состава питательной среды на биосинтез вторичных метаболитов растений.
6. Какова роль фитогормонов и стимуляторов роста при выращивании клеток растений?
7. Охарактеризуйте основные фазы развития клеток растений в суспензионной культуре.
8. Какие особенности необходимо учитывать для получения культуры растений с высоким потенциалом биосинтеза активных компонентов?
9. Опишите влияние асептики при производстве фармакологически активных субстанций из культуры растений и методы стерилизации исходного растительного материала.
10. Что представляют собой алкалоиды и приведите систему их классификации?
11. Какие основные лекарственные формы алкалоидов и сердечных гликозидов?
12. Каким образом проводят получение алкалоидов?
13. Привести методы производства алкалоидов на примере получения таксанов.
14. Описать основные принципы работы для получения генно-инженерных растений.
15. Какие преимущества у трансгенных растений как продуцентов фармацевтических субстанций?
16. Что требуется для создания эффективных генных конструкций?
17. Охарактеризовать методы ввода генной информации в клетку.
18. Продукты трансгенных растений: мукозальные вакцины и моноклональные антитела.

ГЛАВА 4. ФОСФОЛИПИДЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Вопросу получения липидов биотехнологическими методами посвящен значительный объем литературы. В последнее время во многих исследовательских центрах развернут широкий фронт работ фундаментального и прикладного характера, направленный на всестороннее изучение обширной группы природных биологически активных соединений, объединенных общим названием «фосфолипиды». Представления, основанные на результатах структурно-функциональных исследований, отводят им, их надмолекулярным клеточным образованиям (биологическим мембранам) важнейшую роль в функционировании биохимических механизмов, определяющих физиологическое состояние клетки, ее реакции и взаимодействие, как с соседними клетками, так и с факторами окружающей среды. И как следствие, изучение таких сторон медицинской биотехнологии, связанных с ролью фосфолипидов, как биология, биохимия, биофизика, иммунология, физиология, фармакология и др. В прикладном варианте это явилось основой того, что определенные типы фосфолипидов, их фрагменты и модифицированные синтетические аналоги привлекают внимание исследователей как перспективный источник для конструирования диагностических и лекарственных препаратов и их использования в практической медицине

Возникает закономерный вопрос – в связи с чем, фосфолипидам придается такое большое значение? Приведем несколько основных причин биологической значимости фосфолипидов.

4.1. Фосфолипиды в биологических мембранах

Говоря о роли фосфолипидов в функционировании биологических мембран, следует отметить, что клеточные мембраны, включая плазматическую мембрану и внутренние мембраны эукариотических клеток, представляют собой ансамбли фосфолипидных и белковых молекул. Содержание других компонентов составляет менее 5 %.

Различают ряд функций мембранных фосфолипидов, наиболее важные из которых биологические функции.

Структурная функция – смесь фосфолипидов должна быть способна образовывать стабильный бислой для функционирования мембранных белков (к таким фосфолипидам относятся фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, сфингомиелин, а также ряд гликолипидов), и в то же время в мембране присутствуют некоторые фосфолипиды, которые способны к образованию небислойных структур (фосфатидилэтаноламин, кардиолипин, фосфатидная кислота и основной метаболит фосфолипидов – диацилглицерин). Образование таких сильно искривленных участков мембраны необходимо при контакте между мембранами (процесс слияния клеток) или при связывании определенных белков в мембране и обеспечивает существование мембраны в функционально активном состоянии (см. рис. 4).

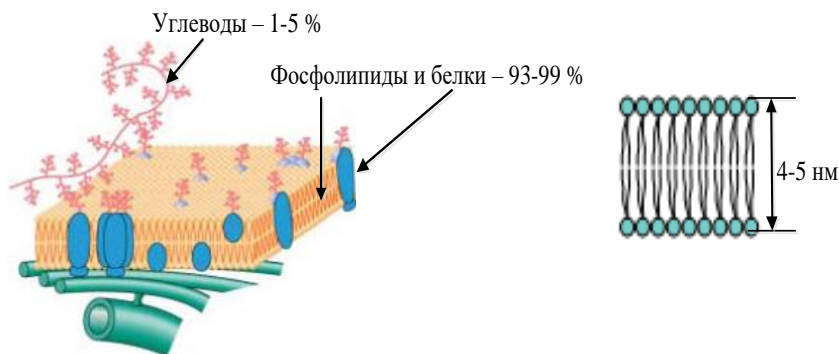


Рисунок 4 – Структура биологических мембран и функции мембранных фосфолипидов

Фосфолипидные структуры обеспечивают такие функции в мембране, как слияние, эндоцитоз, трансмембранный транспорт. Фосфолипиды некоторых типов – важнейшие биорегуляторы. Примером биорегуляторов служат фосфоинозитиды, которые, хотя и являются минорными компонентами фосфолипидных пулов, активно участвуют в важнейших метаболических процессах. Эти соединения участвуют в регуляции структуры мембран, связываются с лекарственными веществами и ферментами. Важными результатами считаются: установление роли фосфоинозитидов в первых актах стимуляции тромбоцитов; участие в гликогенолизе после воздей-

ствия вазопрессина и других кальций мобилизующих агентов на гепатоциты; тесная связь метаболизма фосфоинозитидов с регуляцией начальной стадии пролиферации и др. Наиболее изучена регуляторная роль фосфоинозитидов и их метаболитов в плазматических мембранах эукариот (см. рис. 5). Некоторые мембранные фосфолипиды служат предшественниками вторичных посредников при передаче гормонального сигнала. Так, фосфатидилинозит дифосфат под действием фосфолипазы C гидролизуется до диацилглицерина – активатора протеинкиназы C и 1,4,5-трифосфата миоинозита – регулятора кальциевого обмена в клетке. Диацилглицерин, 1,4,5-трифосфат миоинозита, протеинкиназа C и Ca^{+2} – участники фосфоинозитидной системы передачи сигнала, причем два первых соединения образуются из мембранных компонентов клетки, третий является мембраносвязанным белком и последний (Ca^{+2}) – ион, проникающий через специальные каналы на клеточной мембране.

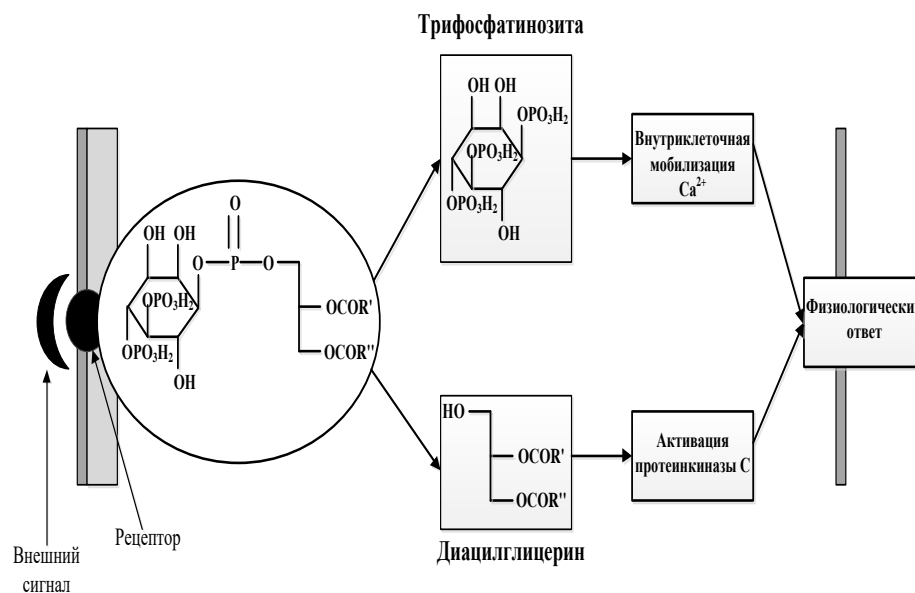


Рисунок 5 – Схема фосфоинозитидного цикла:
R' и R'' – углеводородные цепи в высших жирных кислотах

Фосфолипиды могут быть *аллостерическими активаторами мембранных ферментов*. В качестве примера на рис. 6 продемонстрированы следующие данные. Протеинкиназа С катализирует фосфорилирование белков. В неактивной форме протеинкиназа С находится в цитозоле. Однако, после стимуляции клетки (повышения в клетке ионов кальция) фермент активируется ионами кальция и оказывается связанным с мембраной. Функционально активная протеинкиназа С – комплекс, содержащий мономер фермента, молекулу диацилглицерина, один или более ионов кальция и четыре молекулы фосфатидилсерина.

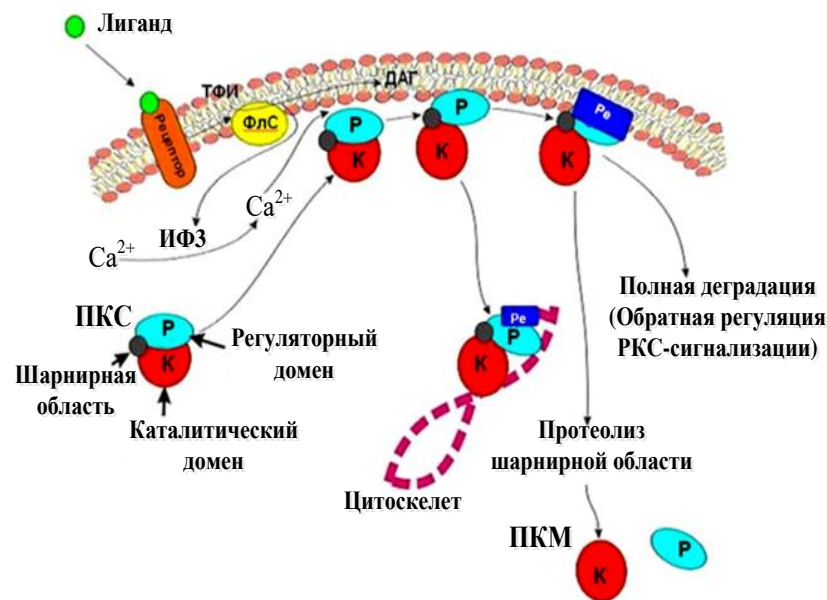


Рисунок 6 – Поведение протеинкиназы С в процессах регуляции клеточной активности:

ПКС – протеинкиназа С; ТФИ – фосфатидилинозитдифосфат;
ФлС – фосфолипаза С; ДАГ – диацилглицерин;

Ре – рецептор активированной протеинкиназы С; ПКМ – протеинкиназа М

В литературе накоплено достаточное количество фактов свидетельствующих о путях изменения состава липидов, преимущественно фосфолипидов плазматической мембраны. Особенно важная роль при иммунном ответе придается фосфатидилсерину и фосфатидилинозитолу. Данные свидетельствуют о тесной связи между мембранными липидами и способностью лимфоцитов реагировать на внешний сигнал. Стимуляция лимфоцитов приводит к значительному повышению метаболизма липидов в плазматической мембране. Особенно заметно увеличение обмена фосфатидилинозитола. Можно отметить два момента: во-первых, изменение свойств липидов мембраны по типу фазового перехода может иметь ключевое значение в механизме формирования сигнала, передающего внутрь клетки информацию о взаимодействии лиганда с клеточной поверхностью; во-вторых, возможна искусственная регуляция активности лимфоцитов путем модификации состава и свойств липидной матрицы плазматической мембраны. Именно это позволяет использовать липидные и липосомальные препараты, содержащие фосфолипиды для направленной регуляции активности клеток иммунной системы.

Учитывая, что фосфолипиды принимают участие в дифференциации, размножении и регенерации клеток, улучшении ионного обмена, влияют на процессы внутреннего дыхания, биологического окисления, энергетического обмена в клетках их роль в стимулировании звеньев клеточного и гуморального иммунитета хорошо известна. Подтверждением этому могут служить исследования фармакологической активности эссенциальных фосфолипидов, применение которых при снижении иммунитета позволяет повысить реакции как гуморального, так и клеточного иммунитета.

Еще одна группа биологических эффектов фосфолипидов связана с их появлением на несвойственной для нормальной локализации внешней стороне мембраны. Как известно, внешний фосфолипидный монослой плазматической мембраны электронейтрален и может приобрести отрицательный заряд только при некоторых особых состояниях клетки. Например, выход фосфатидилсерина на внешний монослой является характерным процессом при активации тромбоцитов или при апоптозе. При этом поверхность клетки модифицируется, вследствие чего «узнается» белками свертывания крови и макрофагами. Полагают, что с патологическими по-

следствиями появления анионных фосфолипидов, в частности фосфатидилсерина, на поверхности мембран, связаны иммунные нарушения, называемые *антифосфолипидным синдромом* (АФС). При этом клетки могут экспрессировать на поверхности фосфатидилсерин, который связывается с В2-гликопротеином, что приводит к удалению таких клеток макрофагами с помощью рецепторов, специфических к фосфолипидам. В литературе имеются описания влияния фосфолипидов и фосфолипидсодержащих частиц на регуляцию иммунной системы. Так, например, с 1997 года по настоящее время проводятся доклинические и клинические испытания технологии «Celacade»TM, основанной на эндогенных фосфолипидах. Эта технология является не медикаментозным лечением, а проведением иммуномодуляции. Технология разработана канадскими учеными для лечения хронической сердечной недостаточности. Проведены клинические испытания в семи странах мира на 2400 больных. Суть технологии следующая: 10 мл венозной крови больного в специальном картридже подвергается последовательным воздействиям: термической обработке при 42,2 °С; УФ-облучению; обработке озоном. Полученный препарат из крови больного вводят этому же больному внутримышечно. В результате указанных воздействий произведенный стресс стимулирует клеточный апоптоз, в ходе которого фосфатидилсерин, как правило, присутствующий на внутренней поверхности мембран клеток, переходит на наружную поверхность клеток. Молекулы фосфатидилсерина взаимодействуют с фосфатидилсерин-рецепторами на поверхности антигенпредставляющих клеток иммунной системы, в том числе макрофагов и дендритных клеток, что приводит к синтезу противовоспалительных цитокинов, например, интерлейкина-10. Таким образом, использование технологии «Celacade» позволяет уменьшить воспаление сердечной мышцы и снизить риск летальных исходов у больных сердечной недостаточностью.

Фосфолипиды играют важную роль в иммунологических процессах, в реакциях связанных с системой свертывания крови, в пролиферации и регенерации клеток. Рассмотрим *роль фосфолипидов на примере их иммунологических свойств*: иммуногенности, антигенности и адьювантности.

Иммуногенность фосфолипидов

В настоящее время обнаружено семейство антител против многих наиболее распространенных фосфолипидов – наличие антител у человека и животных против кардиолипина, фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилхолина, фосфатидилглицерина и других фосфолипидов. Антитела выявляют при помощи ряда иммунологических реакций. Существуют коммерческие тесты для определения антител к таким фосфолипидам как фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, фосфатидилэтаноламин, кардиолипин, фосфатидилхолин и др. В основе методов лежит ELISA. В качестве антигенов используются соответствующие высокоочищенные фосфолипиды.

Антитела против фосфолипидов обнаруживаются:

➤ при ряде инфекционных заболеваний – наличие антител против фосфолипидов при сифилисе, туберкулезе, лептоспирозе, гепатите и других заболеваниях. У здоровых людей встречается 2–4 % антифосфолипидных антител, причем чаще у лиц пожилого возраста, чем у молодежи. Антифосфолипидные антитела встречаются практически у всех больных сифилисом, хроническим гепатитом С и гепатитом В (против кардиолипина), туберкулезом (против фосфатидилинозита), лейшманиозом, лептоспирозом и при других инфекционных заболеваниях. Обнаружена закономерность между содержанием противоллипидных антител и числа тромбообразований у больных, например, хроническими гепатитами;

➤ при аутоиммунных заболеваниях (против тканей) – наличие аутоантител при красной волчанке, инфаркте миокарда, патологической беременности, тромбозах и других заболеваниях. Так, например, обнаружены антитела к фосфолипидам у человека при аутоиммунных заболеваниях – антифосфолипидный синдром (АФС), действие которого направлено против основных компонентов клеточных мембран – фосфолипидов и соответственно против собственных клеток и тканей организма, при этом фосфатидилсерин и кардиолипин наиболее антигенны. Антитела к фосфолипидам клеток эндотелия сосудов нарушают равновесие между свертывающей и противосвертывающей системой в сторону образования тромбов. У мужчин высокий титр антител к фосфолипидам часто сопровождается риском развития тромбоза вен, инфаркта миокарда, а у женщин повторным

выкидышем. Кроме того, АФС может сопровождаться нарушением мозгового кровообращения с развитием инсульта, неврологической патологии, гипертонии и раннего атеросклероза. Высокий уровень антифосфолипидных антител характерен для АФС, при котором поражаются сосуды сердца, почек, печени, головного мозга, надпочечников.

Внимание привлечено к противифосфолипидным антителам при АФС у беременных, при котором аутоиммунные реакции оказывают влияние на процессы имплантации, роста, развития эмбриона и плода и исход родов. АФС может вызвать не вынашивание в любом триместре, тромбоз сосудов плаценты, недоразвитие плаценты. Недостаточное кровоснабжение плода за счет тромбозов сосудов плаценты и может быть причиной потери беременности. Тромбоз может быть вызван недостаточностью активной формы эндогенного антикоагулянта (протеина С), в норме активируемого фосфолипидами. Антифосфолипидные антитела обнаруживаются у 22 % женщин с привычным не вынашиванием беременности. Частота АФС повышается на 15 % с каждым следующим выкидышем. Таким образом, АФС является не только причиной, но и осложнением привычного невынашивания беременности. Гемокоагуляционные нарушения, связанные с АФС приводят к раннему и тяжелому повреждению маточно-плацентарного кровотока с задержкой развития плода, преждевременными родами сформированного гестоза, включая особенно тяжелые его формы.

Фосфолипиды являются важной составляющей всех биологических мембран, поэтому появление антифосфолипидных антител может расстроить функцию клеток и стать причиной воспалительной реакции, вызвать нарушение свертывания крови. Заболевание сопровождается увеличением риска артериальных и венозных тромбозов, способствует нарушению условий развития эмбриона и самопроизвольному аборту. В этих случаях антитела к фосфолипидам – это аутоиммунные антитела IgG и IgM, действие которых направлено против основных компонентов клеточных мембран – фосфолипидов. Антитела к фосфолипидам нарушают нормальное функционирование эндотелия кровеносных сосудов, вызывая сужение сосудов и образование сосудистых тромбов. При АФС антифосфолипидные антитела связываются эндотелием сосудов в присутствии β -2-гликопротеина, стимулируют синтез фактора Виллербранда, индуцируют активность тка-

невого фактора эндотелиальными клетками, стимулируют процесс гемокоагуляции.

АФС проявляется острым респираторным дистресс-синдромом, нарушением мозгового и коронарного кровообращения, ступором, дезориентацией, возможно развитие острой почечной и надпочечниковой недостаточности, тромбозом крупных сосудов.

Присутствие антифосфолипидных антител наблюдается также у половины пациентов с системной красной волчанкой (СКВ). В рамках СКВ часто развивается антифосфолипидный синдром. Поскольку фосфолипиды входят в состав мембран всех клеток, из которых построен человеческий организм, то эта болезнь приобретает особо тяжелую форму. Частота АФС значительно выше у женщин, чем у мужчин. Наиболее часто встречаются антитела к кардиолипину. Антитела к эндотелиальным фосфолипидам коррелируют с активностью болезни при красной волчанке и васкулите.

Антигенность фосфолипидов

Изучение и *диагностическое использование фосфолипидных антигенов* начато 100 лет назад и продолжается до сегодняшнего дня:

- фосфолипидные антигены для диагностики инфекционных заболеваний – наличие коммерческих антигенных препаратов для диагностики сифилиса, туберкулеза, гонореи, лептоспироза и др., используемых в иммунологических реакциях *in vitro* для выявления антифосфолипидных антител;
- фосфолипидные антигены для диагностики аутоиммунных заболеваний – наличие коммерческих антигенов для выявления антифосфолипидных антител, возникающих при аутоиммунных процессах (красной волчанке, тромбозах, антифосфолипидном синдроме).

Нами обнаружено, что *фосфолипиды обладают антигенной активностью*: фосфатидилинозит и маннофосфатидилинозит микобактерий; кардиолипин трепонем; фосфатидилглицерин гонококков. Высокой антигенной активностью обладают фосфолипиды микоплазм, коринебактерий, нокардий, листерий, стрептококков сальмонелл и др. Обнаружены антитела к фосфатидилглицерину, кардиолипину, фосфатидилэтаноламину, фосфатидилинозитам, фосфатидилхолину и другим фосфолипидам.

Фосфолипидные антигены используются при иммунодиагностике инфекционных заболеваний и патологических состояний. Ранее нами были разработаны фосфолипидные антигены для диагностики сифилиса, туберкулеза, дифтерии. Предложен кардиолипидный антиген для диагностики сифилиса, представляющий собой многослойную липосому, состоящую из иммунохимически активного фосфолипида и вспомогательных липидов. Для чувствительного и специфичного антигена необходимо знание оптимальных концентраций и соотношений компонентов, так как антигенная детерминанта должна находиться на поверхности липидной частицы. Необходимо также проводить исследования по оптимизации жирнокислотного состава фосфолипидов, входящих в антиген. Следует отметить, что для создания фосфолипидных антигенов для массовой иммунодиагностики различных заболеваний необходимо располагать методами выделения или синтеза индивидуальных антигенных компонентов. Высокая степень очистки липида является в значительной степени гарантией специфичности. Разработаны тесты и созданы тест-системы для определения антител к большинству известных фосфолипидов.

Адьювантность фосфолипидов

Фосфолипиды обнаруживают *выраженное адьювантное действие*, а именно:

✓ фосфолипидные адьюванты в липосомальной форме, содержащие антигены. Созданы коммерческие вакцины: против гриппа (антигены – нейраминидаза и гемагглютинины), против гепатита А с липосомальными адьювантами; на разных стадиях клинических испытаний находятся вакцины против гепатита В (HBsAg), дифтерии, столбняка и других бактериальных и вирусных антигенов;

✓ фосфолипидные адьюванты – использование аналогов лизофосфатидилхолина приводит к стимуляции гуморального и клеточного иммунитета при введении антигенов различной структуры.

Адьювантное действие фосфолипидов (липосом) по отношению к различным антигенам установлено для антигенов вирусов, бактерий, белков крови, ферментов. Использование фосфолипидов позволяет придать высокую иммуногенность антигенам, которые при введении самостоятельно приводят к низкому иммунному ответу. Некоторые аналоги лизофосфа-

тидилхолина оказались мощными стимуляторами гуморального и клеточного иммунитета.

Невозможно в данном ограниченном объеме информации привести полное описание роли фосфолипидов и их применения в фармации. Их функции разнообразны. Для примера остановимся на нескольких фактах.

Факт 1. Эссенциальные фосфолипиды восстанавливают защитную сурфактантную систему легких, что позволяет активизировать иммунную систему. Основу сурфактанта составляют фосфолипиды – именно они обуславливают поверхностно-активные свойства сурфактанта. Фосфолипиды обеспечивают стабилизацию альвеол, процессов дыхания, а также участвуют в регуляции иммунного ответа. Сурфактант играет жизненно важную роль в функционировании легких. Он уменьшает силы поверхностного натяжения на границе раздела фаз воздух – жидкость в альвеолах, способствует поддержанию альвеолярного гомеостаза, обладает целым рядом иммуномодулирующих свойств.

Факт 2. Изучение влияния фосфолипидов на иммунные реакции показало зависимость их активности от жирнокислотного состава. Препараты на основе фосфолипидов печени байкальской нерпы и фосфолипидов яичного желтка исследовали при изучении показателей иммунитета мышцей. Показано, что фосфолипиды обладают иммуномодулирующими свойствами в отношении макрофагального, клеточного и гуморального иммунитета. Наблюдается максимум иммуностимулирующего действия в отношении антителообразования, причем, более активны фосфолипиды печени нерпы, чем фосфолипиды яичного желтка. Установлено, что использование фосфолипидов с омега-3-жирными кислотами активизирует в организме противовоспалительные и иммунные реакции.

Факт 3. Липополисахариды бактерий являются мощным стимулом, в том числе и воспалительных реакций, и могут приводить к сепсису. Установлено, что окисленные фосфолипиды снижают способность липополисахаридов связываться со специфическими рецепторами и CD14. Взаимодействие окисленных фосфолипидов с липополисахаридами уменьшает повреждение ткани и резко сокращает уровень летальности в модельных экспериментах. Липополисахариды способны связываться с CD14 на поверхности самых разнообразных клеток, в том числе и CD14 на клетках

эндотелия. В модельных экспериментах использовали окисленный фосфолипид (1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine), введение которого животным значительно снижало адгезию липополисахаридов. Последнее повышало защитные иммунные реакции организма и снижало проявления заболевания сепсисом, что приводило к уменьшению повреждения тканей организма. Вопрос о том, переносима ли данная концепция использования окисленных фосфолипидов на больных сепсисом людей, находится в стадии обсуждения.

Применение иммобилизованных фосфолипидов

Одним из важнейших направлений современной биотехнологии является создание продуктов на основе иммобилизованных биологически активных соединений, в частности, иммобилизованных фосфолипидов.

Создание иммобилизованных фосфолипидов преследует несколько целей:

- изучение взаимодействия между белками и фосфолипидами как компонентами биологических мембран;
- аффинное выделение соответствующих белков, имеющих сродство к иммобилизованному фосфолипиду;
- для получения сенсоров и биосенсоров;
- диагностика ряда инфекционных и патологических состояний с помощью выявления образующихся при патологии антилипидных антител (сифилис, красная волчанка, туберкулез, АФС и ряд других).

По мнению ведущих ученых, работающих в этом направлении, существует несколько *способов получения иммобилизованных фосфолипидов.*

1. *Физическая иммобилизация* – этим способом получают сорбенты с конденсированной липидной фазой. Использование их связано с моделированием природных липидных слоев: изучение связи липид – белок; исследование роли в катализе третичной структуры белка и каталитических эффектов, связанных с образованием в слоях ферментных комплексов различного состава; получение биоспецифических сорбентов для гетерогенного иммуноферментного анализа и радиоиммунологического анализа на антилипидные антитела; модификация поверхности химических сенсоров и биосенсоров. В качестве носителей для адсорбционной иммобилизации фосфолипидов используют силикагели, алюмогели, поливинилхлоридные

плашки, октилсефарозу и другие. В большинстве случаев для нанесения используют липиды в виде растворов в различных растворителях (этанол, смеси хлороформ – метанол, бензоле) или водной дисперсии. Для модификации используют: фосфатидилхолин, дифосфатидилглицерин, фосфатидилинозит, фосфатидилсерин, фосфатидную кислоту, сфингомиелин, фосфатидилэтанолламин и др. На липидных полумембранах адсорбировали различные ферменты: щелочную фосфатазу, каталазу, цитохром С, кислую фосфатазу и ряд других ферментов.

2. *Химическая иммобилизация* – метод ковалентного связывания молекул липидов. Позволяет получить более устойчивые образования, чем при физической иммобилизации. Для иммобилизации используют различные функциональные группы: NH_2 , COOH , OH , $\text{Si}(\text{OR})_3$, как имеющиеся в липидах, так и вводимые путем модификации липидных молекул, а также соединения с двойными связями.

3. *Иммобилизация по полярной части молекулы.* Наиболее простой способ предполагает использование функциональных групп липидов, находящихся на полярной их части. Через аминогруппу связывали фосфатидилэтанолламин с карбоксигруппами СН-сефарозы 4В, с эпоксигруппами эпоксисефарозы 6В, с аминогруппами частично гидролизованного полиамида через глутаровый альдегид; фосфатидилсерин связывали с карбоксилсодержащими СН-сефарозой 4В и аффигелем. В качестве матриц использовали аминоалкилагарозу, агарозу с поли-L-лизином, альбуминами, аминопропилсиликагель и аффигель 102. Полученные сорбенты использовали для аффинного выделения белков: фосфолипаз D, A₂, B, протеинкиназы C, холерного токсина, антигиполипидных антител.

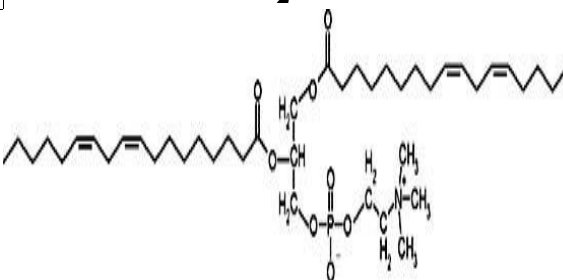
4. *Иммобилизация по гидрофобной части молекулы* является более предпочтительной. Это объясняется тем, что ориентация липидов с направлением полярных головок в водную среду (как в мембранах или липопротеинах) наиболее желательна. Для создания функциональной группы в гидрофобной области липидов окисляют по двойным связям жирные кислоты и сфингозиновые основания до карбоксигруппы, либо проводят замещение одного (или более) из жирнокислотных остатков на кислоты, имеющие в своем составе удобные для связывания с сорбентом группы: - COOH , - NH_2 , - OH , кремнийорганические, тиолановые. Липиды, имму-

билизованные по своей гидрофобной области, используют для аффинного выделения фосфолипаз A₂ и C, сфингомиелиназ, липидпереносящих белков, при получении сорбентов для разделения пептидов, для получения латексов, для исследования взаимодействия липидов с различными веществами. Имобилизовали фосфатидилхолин, дифосфатидилглицерин, фосфатидилинозит, фосфатидилэтаноламин.

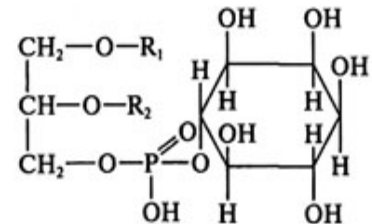
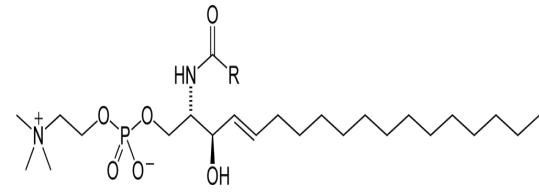
4.2. Биотехнологическое получение фосфолипидов

Фосфолипиды, хотя и в небольших количествах, распространены в клетках органов и тканей всех типов организмов, причем их повышенные концентрации наблюдаются в таких органах, как головной и спинной мозг, сердечная мышца, печень, легкие и др. Химическая структура основных мембранных фосфолипидов представлена в табл. 5.

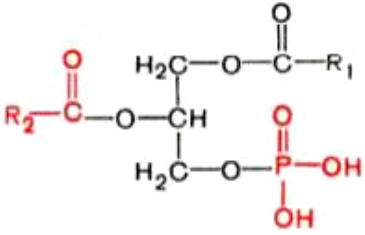
Таблица 5 – Химическая структура мембранных фосфолипидов

Мембранный фосфолипид	Химическая структура
1	2
Фосфатидилхолин	
Фосфатидилэтаноламин	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{O}-\text{R}_1 \\ \\ \text{CH}-\text{O}-\text{R}_2 \\ \\ \text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \end{array}$

Продолжение таблицы 5

1	2
Фосфатидилсерин	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{O}-\text{R}_1 \\ \\ \text{CH}-\text{O}-\text{R}_2 \\ \\ \text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHNH}_2-\text{COOH} \end{array}$
Фосфатидилинозит	
Сфингомиелин	
Кардиолипин	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{O}-\text{R}_1 \\ \\ \text{CH}-\text{O}-\text{R}_2 \\ \\ \text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}'_1 \\ \\ \text{OH} \end{array}$

Продолжение таблицы 5

1	2
Фосфатидилглицерин	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{O}-\text{R}_1 \\ \\ \text{CH}-\text{O}-\text{R}_2 \\ \\ \text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH} \end{array} $
Фосфатидная кислота	

Строение фосфолипидов характеризуется присутствием гидрофобных и гидрофильных фрагментов в составе одной молекулы, а также разнообразием строения каждого из этих фрагментов, что в значительной степени определяет роль фосфолипидов в целом ряде клеточных процессов.

Применение фосфолипидов для целей практической медицины основано на их биологической значимости и проводится с учетом конкретного вида функциональной активности, проявляемой тем или иным типом фосфолипидов в биологических системах. Препараты фосфолипидной природы начинают осваиваться в медицинской практике, поэтому для данного нового класса лекарственных веществ актуальным становится вопрос о сырьевых источниках и методах получения фосфолипидов.

В настоящее время существует *два подхода решения проблем доступности* этих соединений. *Во-первых*, химический или биотехнологический (ферментативный) синтезы (и сочетание этих методов), исходя из низкомолекулярных соединений. *Во-вторых*, выделение фосфолипидных

фракций и их смесей из природного сырья (животные и растительные объекты, микробная масса) с использованием биотехнологических приемов.

Синтетические исследования в ряду фосфолипидов проводятся на протяжении многих лет. В ходе этих работ классическими методами биорганической химии осуществлены синтезы всех структурных типов фосфолипидов. Развитие синтетических исследований в области фосфолипидов привело к развитию подходов к получению фосфолипидов с включением в свой состав остатков других биологически активных веществ (например, ретиноидов, нуклеозидов). В рамках этого направления проведен синтез конъюгатов нуклеозидов с фосфатидилинозитом. Например, синтезирован конъюгат фосфатидилинозита с азидотимидином (известный лекарственный препарат против СПИДа). Такая модификация повышает противовирусную активность нуклеозидов и улучшает внутриклеточный транспорт этих препаратов.

Более перспективным представляется *полусинтетический подход к получению фосфолипидов на основе доступного природного фосфатидилхолина* (рис. 7). На ключевых стадиях используются ферменты фосфолипидного метаболизма – фосфолипазы А₂ и D. Этим методом синтезированы: фосфатидная кислота, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, фосфатидилглицерин с различным жирнокислотным составом.

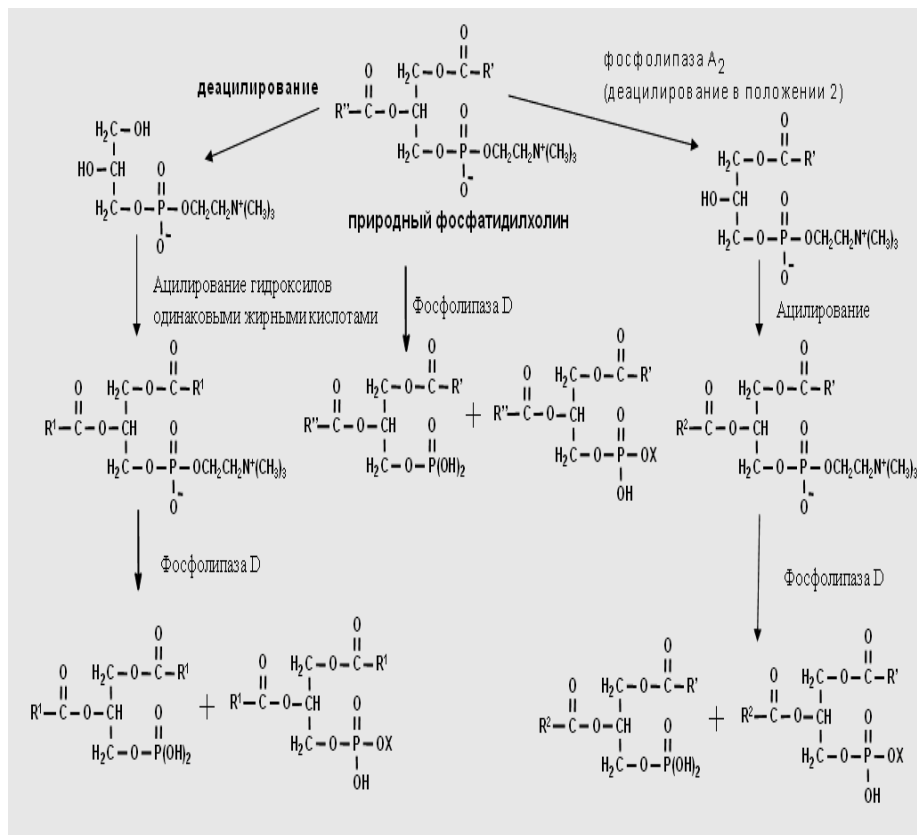


Рисунок 7 – Схема полусинтетического метода получения фосфолипидов: R' и R'' – остатки природных высших жирных кислот; R¹ и R² – остатки введенных жирных кислот, в том числе модифицированных; X – остатки этаноламина

Метод синтеза флуоресцентно-меченых фосфолипидов состоит в модификации природных фосфолипидов по реакции Фриделя – Крафта с последующим транс-фосфатилированием в присутствии фосфолипазы D на все возможные полярные компоненты фосфолипидов. С помощью этой методологии получен ряд модифицированных фосфолипидов, которые

нашли использование при биотехнологических исследованиях липидзависимых систем.

Кроме того, были получены полимеры, содержащие ароматические группы (Ar) с присоединенными остатками фосфолипидов (рис. 8). Полимеры, модифицированные фосфолипидами, можно использовать в аффинной хроматографии для выделения белков, ферментов и низкомолекулярных соединений, имеющих сродство к фосфолипидам. Полимер с иммобилизованным фосфатидилсерин применялся для выделения протеинкиназы С.

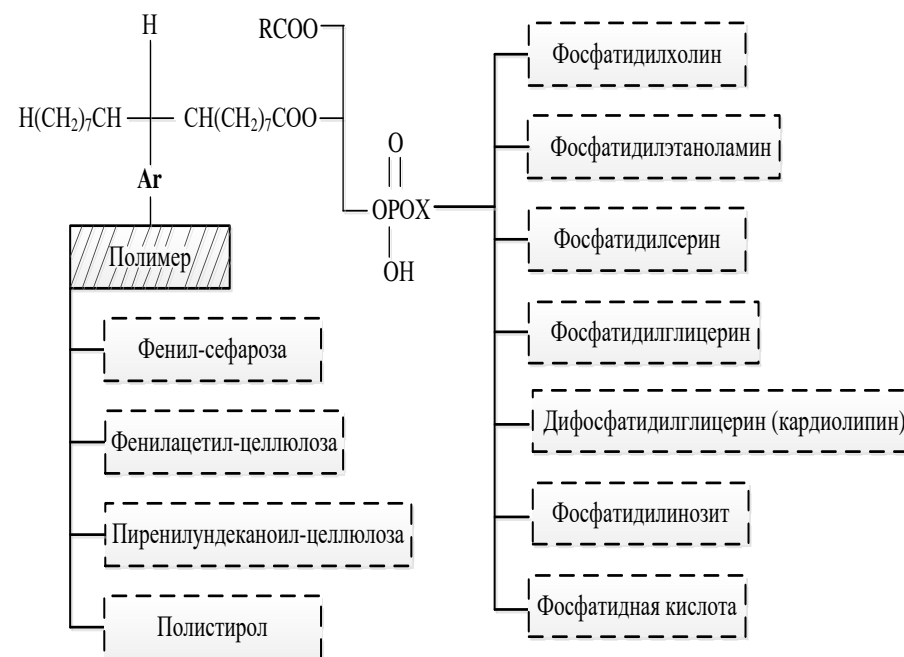


Рисунок 8 – Схема фосфолипидов, иммобилизованных на арилсодержащих полимерах

Был получен ионофорный кардиолипин, на основе которого созданы иммуносpezifичные электроды, которые использованы для диагностики некоторых заболеваний (красная волчанка, сифилис).

Синтетические методы получения фосфолипидов дали возможность создать все известные типы этих веществ в индивидуальной форме. Следует отметить, что синтез фосфолипидов отличается многостадийностью (иногда до 25 стадий), трудоемкостью выделения индивидуальных веществ и завершаются получением целевых соединений в небольших количествах. Препаративное значение этих методов невысоко. Роль этого направления в другом: оно дало возможность реализовать структурные проблемы в области фосфолипидов, т.е. решить задачу окончательного установления строения фосфолипидов, синтезировать модифицированные фосфолипиды. Все это позволило связать структуры фосфолипидов с их функциями, предсказывать их биологическое значение, в частности, с помощью компьютерного обчета.

Задача получения фосфолипидов в препаративных количествах решается выделением их из природных объектов на основе биотехнологических приемов. Мы участвовали в разработке этих приемов. Нами реализованы промышленные методы выделения фосфатидилхолина из яичного желтка и подсолнечника, кардиолипина из сердечной мышцы, фосфатидилинозита из пекарских дрожжей, сфингомиелина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина из мозга животных, лизофосфатидилхолина из яичного фосфатидилхолина с использованием фосфолипазы А₂ и ряда других фосфолипидов. Проведены работы, направленные на создание технологий получения фосфолипидных субстанций для конструирования диагностических и лекарственных препаратов.

Помимо перечисленных препаратов производятся фосфолипидные фракции из ряда животных, растительных и микробиологических источников. Исследования этих продуктов включает определение биологической активности, способов стабилизации и длительности хранения, стандартизации физико-химических параметров. Реализовано изучение влияния на биологическую активность фосфолипидов строения молекулы и ее заряда, степени ненасыщенности жирнокислотных остатков и продуктов перекисного окисления фосфолипидов и других факторов.

Проведение работ, связанных с исследованием роли фосфолипидов в клетке возможно только при наличии высокоочищенных индивидуальных

фосфолипидов или их модельных смесей. В связи с этим активно развивается технология выделения и очистки липидов.

В качестве сырьевых источников для выделения липидов используют микроорганизмы (дрожжи, бактерии), животное и растительное сырье.

Выделение индивидуальных липидов из исходного материала обычно включает несколько этапов:

- разрушение ткани;
- экстракция нейтральных липидов;
- экстракция суммы фосфо- и гликолипидов с последующим фракционированием и выделением индивидуальных веществ.

Полнота извлечения липидов обеспечивается максимальным размельчением материала. Липиды наиболее эффективно экстрагируются полярными растворителями, такими, как этанол или метанол, которые разрушают водородные связи и ослабляют электростатическое взаимодействие липидов с белками. Кроме того, использование спиртов для экстракции фосфолипидов удобно и тем, что они дезактивируют большинство липолитических ферментов, которые в активной форме вызывают деградацию липидов. При изучении свойств спиртов (метанола, этанола, *n*-пропанола, *n*-бутанола) обнаружена четкая зависимость между числом атомов углерода в молекуле спирта и его способностью экстрагировать фосфолипиды из митохондриальной мембраны. Также показана избирательность при экстракции липидов различными растворителями. Например, кардиолипин и фосфатидилэтаноламин предпочтительнее растворяются в метаноле, а фосфатидилхолин в этаноле. При экстракции липидов, помимо спиртов, используются диэтиловый эфир, петролейный эфир, хлороформ, гексан, а также их смеси. Длительность экстракции и полнота экстрагирования определяется в каждом конкретном случае.

Выбор метода очистки во многом зависит от использованного исходного материала, так как имеются различия липидного спектра в животных, растительных тканях и микроорганизмах. При экстракции смесью растворителей, содержащих полярные компоненты, в экстракт переходят аминокислоты, полипептиды, сахара и другие балластные компоненты. Удаление не липидных примесей осуществляют отмывкой экстракцией водными растворами солей. Однако при этом возможно образование

эмульсии, так как липиды являются поверхностно активными веществами. Для прекращения эмульгирования возможно проведение центрифугирования или добавление к смеси незначительного количества спирта.

Используемые *методы очистки липидов* можно разделить на три группы:

- фракционирование, основанное на различной растворимости липидов в органических растворителях при осаждении целевых продуктов солями минеральных кислот;
- хроматографическое фракционирование;
- сочетание этих методов.

Степень растворения липидов в определенных органических растворителях и их смесях лежит в основе разделения суммарных липидных экстрактов. В ряде случаев использование растворителей для разделения липидов имеет препаративное значение. Это, например, относится к широко применяемому *методу отделения фосфолипидов от нейтральных липидов при помощи осаждения ацетоном*. Метод основан на свойствах большинства фосфолипидов не растворяться в охлажденном ацетоне, в то время как нейтральные липиды легко растворяются в ацетоне. Ацетон обычно применяется при предварительной обработке тканей для обезжиривания или в составе экстрагирующих смесей.

Эффективным для фракционирования липидов являются хроматографические методы, из которых наиболее часто используют *колоночную хроматографию*. Для колоночной хроматографии применяют несколько видов адсорбентов: кремневую кислоту, окись алюминия, силикагель, сорбенты с аминогруппами, окись магния и др. Обычно применяют *три типа колоночной хроматографии*:

❖ *адсорбционную*, при использовании которой разделяемые вещества образуют с твердым адсорбентом водородные, ионные связи или связи, обусловленные действием Ван-дер-ваальсовых сил. Таким образом, разделение липидных смесей происходит в соответствии с относительной полярностью их компонентов, которая определяется числом и типом полярных, неполярных или гидрофобных групп в молекуле. Для элюирования обычно используют системы растворителей с возрастающей полярностью, чаще всего – смесь хлороформа с метанолом в различных соотношениях.

Поскольку в липидных смесях имеются компоненты с близкими свойствами, однократное хроматографирование обычно не приводит к полному разделению полярных липидов и для окончательной очистки необходимо использование хроматографии другого типа;

❖ *ионообменную* для предварительного разделения, например, кислых и нейтральных фосфолипидов на диэтиламиноэтил (ДЭАЭ) – триэтиламиноэтил (ТЭАЭ) – целлюлозе. Для разделения липидов используют хроматографию на сефадексе – сшитом декстрановом геле;

❖ *распределительную* – наиболее эффективно сегодня используется метод жидкостной хроматографии высокого давления. Разделение проводят на стальных колонках, заполненных силикагелем различных марок: Biosil HA, Poligosil 60-1525, Ultrasil-NH₂ и др. При этом удается не только получить фосфолипиды в индивидуальном состоянии, но и разделить различные фракции на субфракции, обогащенные определенными молекулярными видами, различающимися по степени ненасыщенности и длине цепи ацильных остатков.

В ряде случаев используется другой *способ очистки липидов – сочетание фракционирования растворителями с хроматографией*. При этом применяется набор различных методов, отличающихся как последовательностью стадий очистки, так и разнообразием используемых сорбентов, органических растворителей и солей неорганических кислот.

В качестве примеров получения высокоочищенных фосфолипидов мы приводим *несколько методов выделения и очистки липидных субстанций* по предложенным и апробированным нами технологиям.

Метод выделения фосфатидилинозита из S. cerevisiae с использованием хроматографии на аминокислороде.

Дрожжи *S. cerevisiae* в количестве 10 кг измельчали и инкубировали в течение 7 ч при 40 °С в присутствии 200 мл ксилола. Полученные лизированные дрожжи (8 литров) охлаждали до температуры 0–2 °С, смешивали с 8 л ацетона, охлажденного до минус 20 °С и смесь перемешивали в течение 1 ч при минус 10 °С. Дрожжевые клетки отделяли фильтрацией. К осадку прибавляли 4 л ацетона, охлажденного до минус 20 °С и смесь перемешивали в течение 1 ч при минус 10 °С. Дрожжевые клетки отделяли фильтрацией. К осадку дрожжей (2,5 кг) добавляли смесь хлороформа и

метанола (соотношение 1 : 1) в количестве 20 л. Смесь перемешивали в течение 7 часов при 20 °С в атмосфере азота. Экстракт отфильтровывали, перемешивали с 4-мя литрами 0,1 М КСl и выдерживали в течение 16 часов при 20 °С. Нижний хлороформный слой (10 л) обезвоживали 2 кг Na₂SO₄, фильтрат упаривали на роторном испарителе в вакууме при температуре 30–35 °С до получения липидного масла в количестве около 100 грамм. Липидное масло растворяли в 1 л смеси хлороформ : метанол в соотношении 1 : 1. Выпавший осадок удаляли. Полученный раствор липидов наносили на хроматографическую колонку, заполненную 1 л аминсилохрома, уравновешенную системой хлороформ : метанол (1 : 1) со скоростью 10 мл/мин. Затем колонку промывали 3 л метанола, 3 л 0,005 М HCOONH₄, 8 л 0,015 М и 4 л 1 М HCOONH₄. К 8 л фракции с 0,015 М HCOONH₄ постепенно при перемешивании добавляли 4 л 0,1 М КСl. После расщепления нижний слой (2,35 л) дважды промывали 1,2 л смеси 96 % этанол – 0,1 М КСl (2 : 3), обезвоживали Na₂SO₄ и фильтрат концентрировали в вакууме до объема 100 мл.

Полученный раствор смешивали с 820 мл смеси хлороформ – метанол (1 : 1) и 100 мл 6 М NaCl и энергично встряхивали в течение 30 с, а затем добавляли 200 мл смеси хлороформ – метанол – вода (86 : 14 : 1) и вновь встряхивали 30 секунд; хлороформный слой отделяли, а водный слой повторно экстрагировали 50 мл той же смесью растворителей. Объединенные хлороформные экстракты обезвоживали Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме, получая 0,5 %-ный раствор натриевой соли фосфатидилинозита в хлороформе. *Выход составлял:* 0,5 грамма фосфатидилинозита из 1 кг дрожжей *S. Cerevisiae*; степень очистки – 99,0 %; индекс окисленности – 0,01.

Указанным методом также предложено выделять дифосфатидилглицерин из *S. cerevisiae*. *Выход составлял:* 0,4 грамма натриевой соли дифосфатидилглицерина из 1 кг дрожжей; степень очистки – не менее 92,0 %; индекс окисленности – 0,6.

Данный подход представляет значительный интерес, поскольку наряду с большими возможностями аффинной хроматографии этот метод не требует применения специального дорогостоящего оборудования, необходимого, например, для препаративной высокоэффективной жидкостной

хроматографии. Предлагаемый метод, сочетающий элементы ионообменной и биоаффинной хроматографии, позволил разработать технологические схемы для промышленного получения ряда анионных липидов.

Метод выделения дифосфатидилглицерина из протопластов *Micrococcus lysodeikticus* с использованием хроматографии на силикагеле

1. Выращивание клеток *Micrococcus lysodeikticus* и получение протопластов.

Выращивание клеток проводят на питательной среде следующего состава (г/л): глюкоза – 10, пептон – 5, натрия хлорид – 5, агар-агар – 30, бульон Хоттингера – 30; воды до 1 л, при pH 7,2 и температуре 30 °С в колбах объемом 1 л при постоянном перемешивании. Через 18 часов клетки собирают центрифугированием и осадок (100–125 г; 15–20 г сухого веса) суспендируют в 1 mM трис-HCl буферном растворе (pH – 7,4), содержащем 0,8 М сахарозы и 2мM MgCl₂ (2 мл раствора на 1 г сырых клеток). Клетки обрабатывают лизоцимом и ДНКазой (на 1 г сырых клеток – 1 мг лизоцима и 0,1 мг ДНК-азы в общем объеме 2 мл) при 37 °С в течение 40 мин, после чего суспензию охлаждают до 0 °С, разбавляют 1,5 объемами исходного буферного раствора и затем протопласты осаждают центрифугированием при 1200 г в течение 40 мин.

2. Экстракция липидов и выделение дифосфатидилглицерина.

Сырой осадок протопластов, полученный из 120 г сырой биомассы, экстрагируют двумя порциями по 300 мл смеси хлороформ – метанол (2 : 1) перемешивая в течение 1 часа. Липидные экстракты отделяют от осадка фильтрованием через стеклянный фильтр № 2 под вакуумом, объединенный липидный экстракт промывают 0,2 объема 0,9 %-ного раствора натрия хлорида. После разделения слоев, нижний отделяют и упаривают на вакуумном роторном испарителе при температуре не выше 35 °С. Выход суммарной фракции липидов 900–950 мг. Сухой остаток липидов растворяют в 3 мл хлороформа и наносят на колонку, заполненную 50 г силикагеля, которую элюируют порциями по 100 мл хлороформа и смесей хлороформ – метанол (96 : 4; 92 : 8; 90 : 10; 85 : 15; 80 : 20; 70 : 30; 65 : 35). Элюаты собирают по 20 мл, состав которых анализируют методом ТСХ. Основное количество дифосфатидилглицерина содержится в 3-й и 4-й

порции элюата. Выход хроматографически чистого липида составляет 250–300 мг.

Метод выделения лизолецитина с использованием фосфолипазы A₂

Пальмитоил-L- α -лизолецитин получают из дипальмитоиллецитина гидролизом под действием фосфолипазы A₂ и очищают переосаждением.

Дипальмитоиллецитин (5 г) растворяют в 800 мл абсолютного диэтилового эфира при 28–30 °С, прибавляют раствор 50 мг змеиного яда (*Naja naia Crotalus adamanteus*) в 10 мл 0,2 М боратного буфера с pH 7,4. Смесь встряхивают при указанной температуре 10–15 мин. Смесь достаточно быстро мутнеет за счет образующегося хлопьевидного осадка. После охлаждения смеси хлопьевидный осадок отделяют центрифугированием, промывают 200 мл эфира, и растворяют при 40 °С в минимальном количестве абсолютного этанола. Раствор разбавляют 300 мл абсолютного эфира, выдерживают 1 час при минус 20 °С и отделяют осадок центрифугированием. Осаждение повторяют еще 2 раза под контролем ТСХ на силикагеле. Выход хроматографически чистого лизолецитина составляет около 3 грамм. Необходимо отметить, что, используя эту методику, можно получить до 90 % липида от взятого в реакцию дипальмитоиллецитина.

Метод выделения суммарных фосфолипидов дрожжевых клеток с использованием методов экстракции и осаждения

Микробные липиды выделяют из биомассы дрожжей. Потом дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* измельчали на небольшие кусочки (1,5 x 2 см) и инкубировали в течение 7 ч при 40 °С в присутствии ксилола. Полученные лизированные дрожжи охлаждали до температуры 0–2 °С, смешивали с ацетоном, охлажденным до минус 20 °С и смесь перемешивали в течение 1 ч при минус 10 °С. Процесс экстракции осуществляют в реакторе с мешалкой. Дрожжевые клетки отделяли фильтрацией на нутч-фильтре или центрифугированием на проточной центрифуге. К осадку прибавляли новую порцию ацетона, охлажденного до минус 20 °С и смесь перемешивали в течение 1 ч при минус 10 °С. Дрожжевые клетки отделяли фильтрацией. Необходимость дальнейших обработок ацетоном и температурный режим обработки определяют при использовании ТСХ (тонкослойная хромато-

графия) в системе для нейтральных липидов и фосфолипидов. На указанном этапе удаляют нейтральные липиды (холестерин, жирные кислоты, глицериды и др.). Метод основан на растворении в ацетоне нейтральных липидов и на малой растворимости фосфолипидов в охлажденном ацетоне.

К полученному осадку прибавляют смесь хлороформ : метанол в соотношении 1 : 1 или 1 : 2. Соотношение растворителей и время экстракции определяются экспериментальным путем. После проведения экстракции в реакторе, раствор липидов отделяют фильтрацией. Необходимость дальнейших обработок смесью растворителей и температурный режим обработки определяют при использовании ТСХ в системе и для фосфолипидов, например, хлороформ : метанол : вода (65 : 25 : 4). Полученные экстракты фосфолипидов объединяют. Осадок клеток удаляют. Для удаления водорастворимых балластных примесей, к объединенному раствору фосфолипидов прибавляют водный раствор солей. Количество водного раствора определяется экспериментально – с таким условием, чтобы произошло разделение фаз – на воднометанольную и хлороформную. Нижний хлороформный слой отделяют, прибавляют для обезвоживания Na₂SO₄ и концентрируют в вакууме на роторном испарителе при температуре 30–35 °С. Полученное липидное масло суммарных фосфолипидов дрожжей хранят при температуре ниже минус 10 °С. Из 100 кг дрожжей получают до 7 кг фосфолипидного масла. Для снижения стоимости конечного продукта необходимо проводить регенерацию воднометанольного раствора и хлороформа.

Фосфолипиды *Saccharomyces cerevisiae* находят широкое применение в косметической промышленности и фармации. Так, известно, что фосфолипиды, выделенные из дрожжевых клеток, обладают рядом фармакологических эффектов: цитопротекторным, антиоксидантным и антигипоксическим. В зависимости от условий культивирования в составе суммарных фосфолипидов обнаруживают: фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, а также в меньших количествах обнаруживают: фосфатидную кислоту, фосфатидилинозит, дифосфатидилглицерин и фосфатидилглицерин.

Для промышленных микроорганизмов важное значение имеет способность клеток накапливать липидные компоненты. Накапливать липиды могут не многие дрожжи. У большинства дрожжей процесс образования липидов проходит в две стадии:

- первая характеризуется быстрым образованием белка в условиях активного снабжения культуры азотом и сопровождается медленным накоплением фосфолипидов и нейтральных липидов;

- вторая характеризуется прекращением роста дрожжевых клеток и усилением накопления липидов, в основном, нейтральных липидов.

На сдвиг биосинтеза в сторону образования липидов или белка влияет соотношение углерода и азота в питательной среде. Так, например, повышение в питательной среде азота вызывает снижение синтеза липидов, а недостаток азота при наличии в среде углерода ведет к снижению синтеза белковых компонентов и высокому содержанию липидов. Установлено, что оптимальным для синтеза липидов является углеводородное сырье с соотношением азот : углерод – 1 : 30, а для углеводного сырья 1 : 40. Регулируя в питательной среде содержание азота и углерода можно осуществлять направленный биосинтез липидов. Образование фосфолипидов возможно только при наличии в питательной среде компонентов, содержащих фосфор. На образование фосфолипидов влияет рН питательной среды и температура культивирования дрожжей. Повышение рН среды ведет к увеличению содержания фосфолипидов. Рост синтеза фосфолипидов также увеличивается при увеличении содержания в среде солей, например, при увеличении в питательной среде натрия хлорида. Важным являются условия аэрации, интенсивность которой во многом определяет синтез липидов (фосфолипидов, триацилглицеридов и жирных кислот). Увеличение аэрации снижает синтез дрожжами фосфолипидов практически в два раза. При интенсивной аэрации возрастает степень ненасыщенности липидов и увеличивается относительное количество всех групп ненасыщенных кислот.

Обнаружены штаммы микроорганизмов, которые способны к сверхсинтезу липидов. Такими микроорганизмами являются дрожжи: *Cryptococcus* и *Terricolus*. Эти штаммы могут синтезировать большое количество

липидов – до 60 % от сухой клеточной массы. Так, например, наибольший промышленный интерес представляют дрожжи *C. Guiltier mondi*, утилизирующие алканы. Они синтезируют в основном фосфолипиды, которые накапливаются в количестве 50 % от сухой клеточной массы.

В настоящее время десятки фирм («Lipoid», «Avanti», «Sigma», «Merk» и др.) производят как высокоочищенные липиды, так и смеси липидов из различных источников: микроорганизмов, животных и растительных тканей. При производстве фармацевтических лекарственных препаратов к субстанциям липидов предъявляются особые требования. На первом этапе необходимо провести изучение органических растворителей, применяемых в технологии получения липидов. Растворители (этанол, метанол, хлороформ, эфир и др.), используемые в ходе производственного процесса должны контролироваться на наличие примесей, в том числе, и токсических. Содержание эндотоксинов и тяжелых металлов в липидных субстанциях, их контаминация микроорганизмами должны контролироваться в соответствии с требованиями, предъявляемые к субстанциям для лекарственных препаратов. Для снижения контаминации липидных субстанций возможна стерилизующая фильтрация липидов в растворе органического растворителя, например, в этаноле или метаноле. Кроме того, одним из методов снижения контаминации липидных субстанций может быть их обработка органическими растворителями, например, хлороформом. Особое внимание необходимо уделять процессам разложения субстанций под воздействием света, нагревания, величины рН, кислорода воздуха и ряда других факторов, влияющих на структуру липидов. Также важно привести краткое описание продуктов, которые рассматриваются как потенциальные примеси, возникающие в результате выделения и очистки липидов из природных источников.

Рассмотрим основные требования, предъявляемые к контролю липидных субстанций, таких как дифосфатидилглицерина, фосфатидилинозита дрожжей и фосфатидилхолина, выделенного из яичного желтка.

1. Наличие характерных функциональных групп в липидах доказано с помощью инфракрасной спектроскопии (ИК-спектр), протонной магнит-

но-резонансной спектроскопии (ПМР-спектр) и данных о дисперсии оптического вращения (ДОВ):

❖ для дифосфатидилглицерина ИК-спектр: =C-H – (2950–3000); COOR – (1740); C=C – (1640, 1660); CH_2 – (1400, 1500); P-O-C – 1100 cm^{-1} . ПМР-спектр (м.д.): 1,29 (CH_2)_n; 0,89 (CH_3); 2,2 ($\text{CH}_2\text{-C=O}$); 4,1 (мультиплет $\text{CH}_2(\text{O})\text{-CH(O)}$); 5,3 (триплет H-C=C). Данные ДОВ: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 5,4^\circ$ (0,1 мл хлороформ : метанол – 1 : 1).

❖ для фосфатидилинозита ИК-спектр: OH – (3500); CH_2 – 1400; C=C – 1640; P=O – 1250; P-O^- – 1080 cm^{-1} . ПМР-спектр (м.д.): 1,05 (CH_2)_n; 0,65 (CH_3); 5,25 (триплет H-C=C). Данные ДОВ: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 7,5^\circ$ (0,1 мл хлороформ : метанол – 1 : 1).

❖ для фосфатидилхолина ИК-спектр: OH – (3500); =C-H – (3040, 3060); =C-H – (2950–3000); COOR – (1740); CH_2 – (1500, 1400); P=O – (1250); P-O-C – (1100); P-O^- – (1080); $(\text{CH}_3)_3\text{-N}$ – 980 cm^{-1} . ПМР-спектр (м.д.): 1,29 (CH_2)_n; 0,89 (CH_3); 2,2 ($\text{CH}_2\text{-C=O}$); 3,5 ($(\text{CH}_3)_3\text{-N}$); 4,1 (мультиплет $\text{CH}_2(\text{O})\text{-CH(O)}$); 5,3 (триплет H-C=C). Данные ДОВ: $[\alpha]_{589}^{20} + 3,8^\circ$, $[\alpha]_{435}^{20} + 6,7^\circ$.

2. Обязательным является определение жирнокислотного состава липидных субстанций. Изучение жирнокислотного состава фосфолипидов является необходимым, так как состав определяет биологическую активность липида в составе лекарственного препарата и его стабильность. В табл. 6 приводится жирнокислотный состав некоторых фосфолипидов.

Таблица 6 – Жирнокислотный состав фосфолипидов

Жирные кислоты	Дифосфатидил-глицерин %	Фосфатидилхолин %		Фосфатидил-инозит %
		Фирма «Биолек»	Фирма «Lipoid»	
Миристиновая C _{14:0}	-	-	-	0,5
Пентадекановая C _{15:0}	-	-	-	1,0
Пальмитиновая C _{16:0}	0,6	29,3	31,5	30,0
Пальмитолеиновая C _{16:1}	3,1	-	< 3	20,0
Стеариновая C _{18:0}	0,8	16,6	13,5	2,0
Олеиновая C _{18:1}	7,2	30,4	32,0	42,0
Линолевая C _{18:2}	83,0	17,4	16,0	1,0
Линоленовая C _{18:3}	5,3	-	-	-
Арахидоновая C _{20:4}	-	6,3	3,5	3,5

Как видно из табл. 6 технология получения липидов, в частности, фосфатидилхолина может влиять на состав жирных кислот. Содержание основного вещества в высокоочищенных липидных субстанциях не менее 95 %. Например, для фосфатидилхолина E PC S фирмы «Lipoid» установлены следующие требования: фосфор – 3,8–4,0 %; вода – не более 2,0 %; этанол – не более 0,2 %; ацетон – не более 0,02 %; тяжелые металлы, ppm – не более 10; йодное число – 54–65; перекисное число – не более 3. Иден-

тификацию проводят методом ТСХ в системе хлороформ – метанол – вода (65 : 25 : 4).

Продукт проходит контроль на микробиологическую чистоту:

✓ *не допускается* наличие *E. Coli*, *Salmonellae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*;

✓ *разрешается* наличие дрожжей (не более 10 КОЕ/г);

✓ *обязательным является* определение эндотоксинов, количество которых не должно превышать 6 ЕД/г.

Как видно из представленных данных использование фосфолипидов в фармацевтическом производстве требует всестороннего изучения липидных субстанций. Проведение указанной сертификации продукта в значительной степени гарантирует высокое качество при получении готового лекарственного средства и его эффективность при клиническом использовании. Одним из приоритетных направлений использования фосфолипидов в фармации является создание лекарственных препаратов, включенных в наночастицы (в частности в липосомы).

Создание липосомальных систем является перспективным направлением фармацевтической биотехнологии. Применение липосом в качестве носителей лекарственных веществ позволяет повысить селективность их действия и снизить токсичность. Использование липосом актуально при лечении злокачественных образований и внутриклеточных инфекций, когда оптимизация биораспределения сильнодействующих препаратов является решающим фактором для повышения их результативности и улучшения качества жизни пациента.

Показано, что эффективность использования липосом определяется их способностью оптимизировать фармакокинетику и биораспределение лекарственных препаратов. Возможность контролируемого применения лекарственных веществ предопределяет перспективность липосомальных препаратов. *Важным преимуществом использования липосом является гибкость технологий их создания*, позволяющая варьировать свойствами носителей лекарственных препаратов в зависимости от характера и локализации очага патологии.

В настоящее время на мировом рынке фармацевтической продукции присутствует 30 липосомальных препаратов, причем 5 из них реализованы с нашим участием в Украине. В странах СНГ, в России производится единственный липосомальный препарат «Фосфоглив» – липосомы из соевого фосфатидилхолина, нагруженного глицеризиновой кислотой. Это эффективный гепатопротекторный препарат. Липосомальным препаратам посвящена работа: Ю.М. Краснопольский, А.С. Дудниченко, В.И. Швец Фармацевтическая биотехнология: Бионанотехнология в фармации и медицине – Х.: НТУ «ХПИ», 2011.– 228 с.

Считается, что эффективность липосомальных препаратов может существенно увеличиться, если их нацеливать на клетки-мишени, присоединяя к ним «молекулярный адрес» – молекулы, специфически связывающиеся с клетками-мишенями. Например, были сконструированы липосомы, загруженные доксорубицином против градиента сульфата аммония, на поверхности которых экспонированы цепи ПЭГ-2000 и антитела к глиофибрилярному белку. Данный «молекулярный адрес» выбран неслучайно. В качестве векторов для направленного транспорта лекарственных препаратов в очаги нарушения гематоэнцефалического барьера необходимо использовать нейроспецифические антитела (например, к основному белку миелина, глиофибрилярному белку, нейроспецифической енолазе и др.). Препарат ПЭГилированных иммунолипосом связывался с антигенами эмбриональных астроцитов мозга крысы. Проводятся работы по направленному иммунолипосомальному транспорту других антрациклиновых антибиотиков, интерлейкинов, ростовых факторов, генно-инженерных препаратов (плазмиды, ДНК-вакцины, антисмысловые нуклеотиды, малые интерферирующие РНК).

В настоящее время имеется набор липосом, включающий термочувствительные, стерически стабилизированные для увеличения времени циркуляции в крови, нацеливаемые с помощью «молекулярного адреса» в определенный очаг патологии, жесткие не текущие и другие.

В настоящее время известны современные направления конструирования липосомальных препаратов. Представлена конструкция на основе

липосомы для направленной доставки генетического материала (основа генной терапии). Направленность доставки обеспечивает «молекулярный адрес», присоединенный к поверхности липосомальной частицы через гибкую полиэтиленгликолевую цепочку, при этом ее длина больше длины подобных «пустых» цепочек, также присоединенных к липосоме для увеличения времени циркуляции. В мембрану встроены молекулы белка слияния для облегчения входа терапевтического гена в цитозоль. ДНК для компактизации и компенсации отрицательного заряда вводится в комплексе с положительно заряженными фосфолипидами и полимерами. Легко увидеть, что приведенная конструкция напоминает схему оболочки вируса, т.е. эффективной машины для введения чужеродной ДНК в клетку, причем следует отметить, что такие работы по загрузке оболочек вируса лекарственными субстанциями в настоящее время уже развиваются. Но следует понимать и *недостатки липосомального транспорта*. Необходимо иметь в виду определенную ограниченность их использования. Вот только *основные ограничения*:

- небольшая эффективность загрузки гидрофобных и большинства высокополярных субстанций (в том числе белков);
- «протекаемость» для многих веществ средней гидрофобности;
- химическая нестабильность фосфолипидов;
- агрегационная нестабильность липосомальных дисперсий;
- высокая цена.

Сфера применения бионанотехнологий в этой области расширяется и уже сейчас может представлять интерес для практической медицины и бизнеса. И хотя проблемы в этой области еще далеки от законченных, уже сейчас очевидно, что это направление позволит в перспективе поднять на новый уровень разработки методов для диагностики и лечения тяжелых болезней человека, и при этом необходимо отметить, что биотехнологические исследования в области фосфолипидов являются основой этого направления.

В заключении хочется отметить, что значимость фосфолипидов определяется ролью последних в биологических мембранах. Нами в данной главе рассмотрен ряд функций фосфолипидов и приведены основные требования к производству данной группы соединений. Объем данного издания не позволяет остановиться на всех свойствах полярных липидов, но даже, из приведенного материала определена роль фосфолипидов в биотехнологии.

Считаем необходимым, указать ***основные свойства фосфолипидов, которые определяют их перспективность для фармацевтической биотехнологии:***

- ✓ торможение процессов перекисного окисления липидов;
- ✓ ускорение регенерации поврежденных клеточных мембран, например, гепатоцитов. В большинстве случаев при поражении печени применение фосфолипидов является патогенетически обоснованным методом лечения, оказывающим положительное влияние на метаболизм белков и липидов и повышающим детоксикационную функцию печени;
- ✓ использование фосфолипидов в качестве «строительного» материала для поврежденных органов и тканей;
- ✓ изменение процессов метаболизма;
- ✓ наличие эмульгирующих свойств. Высокая поверхностная активность фосфолипидов активно используется в лекарственных препаратах, в которых фосфолипиды применяются в качестве эмульгаторов, например, в препаратах биологически активных эмульсий;
- ✓ антигенная, иммуногенная и адъювантная активность. Создание антигенных препаратов для диагностики инфекционных и патологических процессов. Использование фосфолипидных структур в роли адъювантов в составе вакцин, например, препаратов для профилактики гриппа или гепатита;
- ✓ противоопухолевая активность аналогов лизоформ, например, аналогов лизофосфатидилхолина.

Указанные свойства фосфолипидов делают их незаменимыми компонентами фармацевтических препаратов, в частности, полученных на основе фармацевтической биотехнологии.

В настоящее время препараты на основе фосфолипидов занимают важное место в арсенале фармакологических средств. Достаточно указать на ряд высокоэффективных лекарственных средств, которые используются в клинической практике: более 40 препаратов липосом с включенными в них цитостатиками, антибиотиками, антиоксидантами, гормонами и другими фармакологически активными соединениями (США, Германия, Украина, Швейцария и др.); группа эссенциальных фосфолипидов, представленных липидами, выделенными из соевых семян – гепатопротектор (Германия, Франция, Россия); оригинальный препарат «Фосфоглив», содержащий фосфатидилхолин растительного происхождения и тринатриевую соль глициризиновой кислоты – гепатопротектор, лечение кожных заболеваний (псориаза, нейродермита, экземы) (Германия); «Липосом-форте», содержащий фосфолипиды, выделенные из базальных ядер головного мозга новорожденных свиней (гипоталамуса) – терапия метаболической аномалии в результате церебрального нейроэндокринного расстройства (Fidia Farmaceutical); «Фосфосер-мемори» – фосфатидилсерин и фосфатидилхолин, полученный путем ферментационной обработки соевых бобов с помощью сока капусты – восстанавливает и улучшает деятельность нервных клеток, улучшает память, восстанавливает сниженные интеллектуальные способности, применяется для лечения болезней Паркинсона и Альцгеймера, снимает депрессивные состояния (Hankintatukka Oy, Финляндия) и ряд других препаратов. Представленные препараты выпускаются в различных лекарственных формах: для внутривенного и внутримышечного введения, для ингаляторного введения, таблетки, капсулы, гели и порошки для приема per os.

При помощи современных методов биотехнологии ежегодно на мировом фармацевтическом рынке появляются новые препараты, содержащие в своем составе в качестве активной фармакологической субстанции – фосфолипиды.

Контрольные вопросы

1. По каким критериям классифицируют фосфолипиды?
2. Какова роль фосфолипидов в биологических мембранах?
3. Укажите, какие вопросы решает биотехнология фосфолипидов.
4. Охарактеризуйте основные свойства фосфолипидов (иммуногенность, антигенность, адьювантность).
5. С какой целью применяют иммобилизованные фосфолипиды?
6. Опишите механизмы иммобилизации фосфолипидов.
7. Опишите основные методы выделения и очистки фосфолипидов.
8. Проведите анализ метода выделения дифосфатидилглицерина из *Micrococcus lysodeikticus*.
9. Опишите метод выделения фосфатидилинозита из пекарских дрожжей. Какова роль в этом процессе автолиза дрожжей и метода аффинной хроматографии?
10. Какие аналитические методы контроля фосфолипидов Вам известны? Приведите примеры.

ГЛАВА 5. ТРЕБОВАНИЯ К ПРОИЗВОДСТВУ И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

В данном пособии представлены, в основном, препараты, в составе которых в качестве активной фармацевтической субстанции используются рекомбинантные белки. Для получения этих препаратов используются различные штаммы продуцентов: бактериальных и дрожжевых клеток. Каждый из этих клеток-продуцентов имеет свои преимущества и недостатки. Нам кажется необходимым остановиться на этих вопросах. *Преимущества штамма-продуцента*, прежде всего, *определяются особыми требованиями*, предъявляемыми к рекомбинантным белкам, используемым в фармацевции для создания высокоэффективных лекарственных препаратов.

Эти требования можно представить как:

- ✓ высокая степень очистки;
- ✓ точная копия природного белка или научные доказательства безопасности мутаций для пациента;
- ✓ проверенный, стабильный и безопасный продукт;
- ✓ как можно более полное удаление всех биополимеров и пирогенов продуцента (ДНК не более 10 пг/мл);
- ✓ раствор рекомбинантного продукта или его лиофилизированная масса должна сохранять свои свойства не менее 1 года.

Продукты, полученные при помощи технологии рекомбинантной ДНК, изготавливают, используя генетические модификации. При них ДНК, которая кодирует целевой продукт, вводится, как правило, при помощи плазмиды или вирусного вектора в подходящий микроорганизм или культуру клеток, в которых данная ДНК экспрессируется и транслируется в белок. Целевой продукт экстрагируют, а затем проводят очистку. Клетка или микроорганизм до введения вектора называется *клеткой-хозяином*. Стабильная структура двух организмов, используемых в производственных процессах, называют *системой хозяин-вектор*.

В соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Украины *система банка клеток* определяется как:

Главный банк клеток – гомогенная суспензия исходных клеток, трансформированных экспрессирующим вектором, в который включен целевой ген, расфасованных в равных объемах в отдельные контейнеры для хранения (например, при минус 196 °С в жидком азоте);

Рабочий банк клеток – гомогенная суспензия клеточного материала, полученного из главного банка клеток или банка клеток на уровне финишного пассажа, расфасованных в равных объемах в отдельные контейнеры для хранения (например, при минус 196 °С в жидком азоте).

Контейнеры обоих банков клеток хранят в одинаковых условиях. Взятые в работу из хранилища контейнеры не могут быть возвращены в банк клеток.

Производство рекомбинантных белков основано на валидированных системах посевных серий с использованием комбинации хозяин-вектор. В системе посевных серий используют главный банк клеток и рабочий банк клеток, полученных из главной посевной серии хозяин-векторной комбинации.

Крайне важным является *требование контроля сырья человеческого и животного происхождения*, используемого для производства рекомбинантных продуктов, на контаминацию вирусами.

Обязательными требованиями для клеток-хозяина являются знания об источнике их получения, фенотипе, генотипе, питательной среде для культивирования клеток. Для характеристики рекомбинантного вектора необходима следующая информация: происхождение и характеристика гена; анализ нуклеотидной последовательности клонированного гена, клонированные последовательности должны быть минимальны и все важные экспрессированные последовательности должны быть четко идентифицированы и подтверждены на уровне РНК. ДНК последовательность клонированного гена обычно подтверждается на стадии посевной серии, до и после удвоения популяции при полномасштабном культивировании; устанавливается конструкция, генетика и структура всего экспрессирующего вектора.

Характеристика системы хозяин – вектор включает:

- механизм переноса вектора в клетки-хозяина;

➤ число копий, физическое состояние и стабильность вектора внутри клетки-хозяина;

➤ мероприятия, используемые для промоции и контроля экспрессии.

Производство рекомбинантных белков проводят двумя методами: с ограниченным числом пассажей (А) и с неограниченным числом пассажей – в непрерывной культуре (В).

А – метод определяется ограниченным числом пассажей или удвоенной культуры, которые не могут быть превышены в ходе производства. Устанавливается максимальное число удвоений или уровней пассажей, в течение которых производственный процесс удовлетворяет установленным критериям.

В – метод определяется неограниченным числом пассажей или удвоений культуры с момента начала производства. Необходимо контролировать культуру в течение её жизни; частота и виды контроля зависят от природы производственной технологии и системы. Необходимо обладать информацией о молекулярной целостности встроенного гена, характеристике фенотипа и генотипа клеток-хозяина после длительного культивирования.

Для успешного производства рекомбинантных продуктов в соответствии с требованиями GMP необходимо проводить валидацию банков клеток, включающую:

➤ изучение стабильности путем определения жизнеспособности и сохранения вектора;

➤ идентификацию клеток по характеристикам их фенотипа;

➤ исследования, подтверждающие отсутствия онкогенов или постоянных инфицирующих агентов (вирусных, бактериальных, грибковых, микоплазменных). Особое внимание уделяют вирусам, которыми обычно контаминированы виды, из которых получены клеточные линии. Некоторые клеточные линии содержат эндогенные вирусы, например, ретровирусы, которые крайне сложно удалить из клеток полностью. В таких случаях необходимо аттестовать экспрессию в этих организмах в разных условиях, в которых возможна индукция этих вирусов;

➤ получение данных (для клеток млекопитающих) о возможной канцерогенной активности банка клеток.

В процессе получения субстанции рекомбинантного белка проводят соответствующую валидацию стадий экстракции и очистки. В процессе очистки из продукта должны быть удалены посторонние агенты. В исследованиях включают, например, вирусы, для которых известны наиболее важные физико-химические свойства и для каждой критической стадии определяют степень уменьшения контаминации. Из продукта максимально должны быть удалены векторы, клетки-хозяина, остатки питательной среды и используемых реактивов, уменьшено содержание ДНК и белков животного происхождения.

В конечном продукте определяют следующие характеристики:

✓ анализ концевой аминокислотной последовательности (результаты секвенирования позволяют подтвердить правильность процессинга N-концевых участков и установить потерю аминокислот на C-конце);

✓ пептидное картирование (проводят с использованием химического и / или ферментативного гидролиза рекомбинантного белка с последующим анализом двумерным гель-электрофорезом, капиллярным электрофорезом, жидкостной хроматографией; не должно быть обнаружено отличий между исследуемым образцом и препаратом сравнения);

✓ химическая чистота (чистоту белкового продукта анализируют в сравнении с препаратом сравнения при помощи жидкостной хроматографии, капиллярного электрофореза, электрофореза в полиакриламидном геле с использованием натрия додецилсульфата);

✓ общий белок (определяют выход белка);

✓ остаточные количества белков клеток-хозяина (определение проводят иммунохимическими методами с использованием поликлональных антител, радиоиммуноанализом и др.);

✓ остаточная ДНК клеток-хозяина и вектора (определяют методом гибридизации).

Сегодня разработаны основные требования к производству продуктов биотехнологии, в частности, к рекомбинантным продуктам.

Требования к производству биотехнологических препаратов изложены в ряде документов по надлежащей производственной практике GMP, в разделах посвященных производству биологических и генно-инженерных продуктов. Мы остановимся на основных положениях изложенных в этих документах, а именно **требованиях, предполагающих наличие всех средств для GMP:**

- обученный персонал, имеющий необходимую квалификацию;
- соответствующие помещения и площади;
- необходимое оборудование и правильное его обслуживание;
- соответствующие вещества, первичная упаковка и этикетки;
- утвержденные методики и инструкции;
- соответствующее хранение и транспортирование.

Способы, с помощью которых производятся, контролируются и вводятся в организм биологические препараты, обязательно требуют соблюдения некоторых особых предосторожностей. В отличие от препаратов, получаемых и контролируемых воспроизводимыми химическими и физическими методами, биотехнологические препараты производятся с использованием биологических процессов и материалов, таких как: культуры клеток, живые микроорганизмы (вирусы, бактерии, грибы, фаги), кровь или плазма человека и животных и т.п. Эти процессы отличаются присущей им вариабельностью, так что диапазон и природа побочных продуктов также варьируется. Кроме того, контроль препаратов осуществляется на лабораторных животных, культуре клеток, живых микроорганизмах, что также приводит к определенной вариабельности полученных результатов. По этой причине при производстве генно-инженерных препаратов необходимо следование принципам GMP на всех стадиях производства.

Требования к персоналу

1. Предприятием, производящим биологические препараты (вакцины, генно-инженерные продукты, витамины, антибиотики и др.) и его персоналом должны управлять люди, хорошо изучившие методы, применяемые при производстве биотехнологических препаратов, и обладающие научными знаниями, на которые опирается производство этих продуктов.

2. Весь персонал, работающий в зонах, где производятся биотехнологические препараты, должен пройти дополнительное обучение, которое специфично для выпускаемой продукции и их работы. Персонал должен получить соответствующую теоретическую и практическую подготовку по микробиологии, санитарии, вирусологии, генетике, фармации, ветеринарной медицине и т.д. Операторы должны быть обучены правильному выполнению методик.

3. Персонал, работающий в чистой и асептической зонах должен быть подобран особенно тщательно: следует убедиться, что он будет соблюдать все предписанные правила, а также, что он не подвержен каким-либо заболеваниям или состояниям, которые могут нарушить микробиологическую чистоту продукта. Важным является установление надлежащего уровня чистоты, гигиены и опрятности. Персонал должен быть проинструктирован о том, что следует немедленно сообщить о проявлении у него любых симптомов болезни (например, насморк, кашель, диарея и др.), которые могут вызвать увеличение количества или изменение типов микроорганизмов в рабочей среде. Необходимо систематически проверять состояние здоровья персонала, которое может неблагоприятно сказаться на качестве продукта и должно служить основанием для отстранения от работы в производственной или контрольной зонах.

4. В чистых и асептических зонах в процессе работы должно находиться лишь минимальное количество персонала. Инспекционные проверки и контрольные функции следует по возможности осуществлять из вне.

5. В течение рабочего времени персонал, который проводит работы с живыми микроорганизмами или животными, не должен входить в помещения, где проводится работа с другими микроорганизмами или продуктами, не приняв четко установленных мер по удалению загрязнений, в частности, таких как смена обуви и одежды.

6. Персонал, занятый в производственных процессах не должен контактировать с теми, кто ухаживает за животными.

7. Следует систематически проводить обучение кадров, вести документацию по подготовке кадров и периодически оценивать эффективность программы обучения.

8. Весь персонал, занятый в производстве и контроле, в том числе персонал (включая инспектора), работающий с животными, должен быть вакцинирован соответствующими вакцинами.

9. Любые изменения в иммунологическом статусе персонала, которые могут отрицательно повлиять на качество продукции, должны исключать возможность работы в производственной зоне.

Требования к помещениям и оборудованию

1. Внутренние поверхности (стены, полы, потолки) должны быть гладкими и без трещин; их должно быть легко мыть и дезинфицировать. По возможности следует избегать наличия дренажей, а в асептической зоне дренажи и водопроводные раковины должны отсутствовать.

2. Освещение, отопление, вентиляция и кондиционирование воздуха должны обеспечивать надлежащую температуру, относительную влажность воздуха, и сводить до минимума загрязнение с учетом удобства персонала.

3. Степень контроля окружающей среды, загрязнения частицами и микробной контаминацией производственных помещений должна соответствовать требованиям к продукту и конкретному этапу производства, при этом, необходимо учитывать уровень загрязнения исходных материалов и риск для конечного продукта.

4. Работу с живыми организмами следует проводить на оборудовании, которое позволяет поддерживать чистоту культуры и сохранять её во время производственного процесса.

5. В случае производства препаратов в порядке производственной кампании планировка и конструкция помещений и оборудования должны быть такими, чтобы их обеззараживание, а также санитарная обработка и очистка после окончания кампании не представляла проблем.

6. Партии посевов и банк клеток, используемые для производства биологических препаратов должны храниться отдельно от других материалов. Доступ к ним должен быть разрешен уполномоченному на это персоналу.

7. Такие препараты, как убитые вакцины (в частности, полученные путем генной инженерии), анатоксины и бактериальные экстракты, после инактивации можно перемещать в контейнерах точно так же, как и любые другие стерильные биологические препараты.

8. Специальные помещения необходимо использовать (вплоть до завершения процесса инактивации) для производства биологических препаратов.

9. Для производства препаратов цельной крови или плазмы человека и животных должны быть отдельные помещения и отдельное оборудование. Производство препаратов из крови человека и крови животных должно быть разделено.

10. Помещения и оборудование при производстве биологических препаратов должно быть сконструировано таким образом, чтобы исключить пересечение потоков и возможность перекрестного загрязнения.

11. Для обработки стерильных продуктов следует использовать зоны с избыточным давлением, однако в специальных зонах, где работают с патогенными микроорганизмами, допускается и отрицательное давление.

12. Система труб, клапаны и вентиляционные фильтры должны быть сконструированы надлежащим образом для упрощения очистки и стерилизации. Рекомендуется использование систем CIP (clean in place) и SIP (sterile in place). Клапаны на сосудах ферментации должны полностью стерилизоваться паром. Воздушные фильтры должны быть гидрофобными, проходить инспекцию согласно утвержденному графику в процессе использования.

13. В зонах производства для работы с патогенными микроорганизмами должны быть устройства для обработки. Воздух должен отводиться через специальные фильтры. Стоки, которые могут содержать микроорганизмы, должны эффективно обрабатываться.

14. Одновременное производство в одной и той же зоне с использованием закрытых систем биоферментеров может быть приемлемым для таких продуктов, как моноклональные антитела, и продуктов, получаемых методом рекомбинантной ДНК-технологии.

Требования к производству

1. Для всех производственных операций должны существовать стандартные рабочие методики, стандартные операционные процедуры, стандарты предприятия.

2. В спецификации на исходное сырье должны быть включены подробные описания их источников происхождения и метода производства, а также применявшихся методов контроля, в частности, микробиологической чистоты.

3. Питательные среды и культуры следует вводить в биореакторы или ферментеры в тщательно контролируемых условиях, обеспечивающих исключение загрязнения. После проведения операции необходимо убедиться в герметичности соединений. По возможности питательные среды необходимо стерилизовать *in situ*. Возможно применение стерилизующих фильтров непрерывного действия для введения в биореактор газов, кислот, щелочей, растворов углеводов или дополнительных количеств питательных сред.

4. Если в процессе производства осуществляется инактивация (например, при получении анатоксинов или вакцин), то следует принять меры, которые позволят избежать риска перекрестной контаминации инактивированного и не инактивированного продуктов.

5. Для того, чтобы избежать нежелательного дрейфа свойств, который может наблюдаться при повторяющемся субкультивировании или множественном воспроизведении, производство препаратов, получаемых с помощью микробных культур (например, вакцина БЦЖ), клеточных культур (например, вакцины против кори или полиомиелита), или размножением в эмбрионах или животных, должно основываться на системе главных и рабочих партий посевного материала или банка клеток (генно-инженерные продукты).

6. Количество поколений (удвоений) между партией посевного материала или банком клеток и конечным продуктом должно согласовываться с дозой препарата. Масштабирование процесса не должно менять этого фундаментального соотношения. Партии посевного материала и банки клеток должны быть созданы, храниться и использоваться таким образом,

чтобы свести к минимуму риск загрязнения или изменения. Должен проводиться постоянный мониторинг температуры хранения материала с фиксацией полученных результатов. Любые отклонения от установленных пределов и любые предпринятые действия по корректировке должны протоколироваться.

7. Только уполномоченному персоналу должна быть разрешена работа с материалами. Эта работа должна выполняться под контролем ответственного лица. Доступ к хранящемуся материалу должен контролироваться. Различные партии посевного материала или банки клеток должны храниться таким образом, чтобы предотвратить путаницу или перекрестное загрязнение.

8. Центрифугирование, сепарирование или смешивание продуктов может привести к образованию аэрозолей. При этом необходимо принимать меры предосторожности для предотвращения переноса живых микроорганизмов.

9. Для хроматографической очистки ряда препаратов (например, интерфероны, интерлейкины, рекомбинантные гормоны, вакцины против гепатита В или полиомиелита) используется целый ряд оборудования и, как правило, такое оборудование должно быть предназначено для очистки одного продукта, должно стерилизоваться и проходить санитарную обработку между партиями. Не рекомендуется использование одного и того же оборудования на различных этапах обработки. Должны быть определены критерии приемлемости, срок службы и способы санитарной обработки и стерилизации колонок.

10. Все производственные процессы должны быть точно определены и их следует систематически актуализировать с учетом накопленного опыта.

11. Критические стадии производственного процесса биологических препаратов и существенные изменения производственного процесса должны пройти валидационные исследования.

12. Во время производства необходимо составлять протоколы рукописным способом и / или с использованием записывающего прибора, который документально подтверждает, что действительно проведены все

стадии, требуемые установленными методиками и инструкциями, а также, что количество и качество продукции соответствует запланированным нормам. Любые значительные отклонения должны быть полностью запротоколированы и исследованы. Протоколы производственного процесса, позволяющие исчерпывающе проследить историю серии, следует составлять в полной и доступной форме.

13. Необходимо учитывать, что изменения, которые для фармацевтических препаратов относятся к изменениям типа I, для вакцин и препаратов крови относятся к существенным изменениям типа II. К этим изменениям типа II относятся изменения объема серий, даже незначительные изменения в производственном процессе, смена производителя активной субстанции, изменения в спецификации и ряд других.

14. Если в ходе разработки продукта вносятся изменения в производственный процесс, эти изменения и сопутствующие им модификации тестирования в ходе процесса должны подробно описываться. Следует отметить, что новый продукт может требовать дополнительных доклинических исследований, подтверждающих его исходное клиническое применение. Необходимо включать информацию о процессе очистки и предоставлять данные о стабильности, показывающие стабильность продукта в течение клинических испытаний. В дополнение к этому, может возникнуть потребность в проведении исходных клинических испытаний на небольших исследуемых группах или с повышением дозы вакцины с целью установления безопасности продукта. Кроме того, может быть необходимо провести прямое сравнение старых и новых продуктов в ходе рандомизированных клинических испытаний, чтобы установить взаимосвязь между функционированием двух продуктов.

Требования к животным

Животные используются как для получения биологических препаратов (например, обезьяны – для получения полиомиелитной вакцины; лошади – для получения специфических иммуноглобулинов и антитоксических сывороток; эмбрионы японских перепелов – для получения вирусных вакцин; коровы – для получения рекомбинантного гормона), так и для их

контроля (морские свинки – вакцина БЦЖ, мыши, морские свинки, кролики – вакцина АКДС, обезьяны – вирусные вакцины).

Помещения для животных, используемых при производстве и контроле препаратов, должны быть отделены от помещений производственного процесса. Проводится обязательный контроль на контаминацию животных бактериальными, вирусными, микоплазменными и другими инфекциями. Строго регламентируется состав кормов для каждого вида животных. На предприятиях, производящих биотехнологические препараты, должны быть специалисты по ветеринарной медицине. Животные каждого вида должны находиться в отдельных помещениях. Обязательным является контроль и регистрация состояния здоровья животных. Должны быть утверждены правила работы с животными и требования по эксплуатации. Общие требования к помещениям для животных и уходу за ними изложены в Директиве ЕС 86/609/ЕЕС. Сегодня для содержания и обслуживания животных создана специальная индустрия, обеспечивающая проведение процессов в соответствии с требованиями GMP / GLP. Фирма TECNIPLAST (имеет сертификат ISO 9001) является одной из ведущих в мире фирм-изготовителей различной продукции для содержания лабораторных животных и ухода за ними. Так, например, TECNIPLAST в соответствии с директивами ЕС 86/609/ЕЕС и руководству по содержанию лабораторных животных ETS 123 Rev A, выпускает пластиковые клетки для содержания животных с индивидуальной вентиляцией, стеллажи для клеток (полочные и модульные), моечные машины, автоклавы для клеток, ламинарные станции, станции удаления используемых подстилок и другое оборудование, и инвентарь для животных.

Требования к контролю качества

1. Особо важную роль в обеспечении стабильности качества биологических препаратов играет межоперационный контроль. Отличительной особенностью данной группы препаратов является невозможность проведения контроля качества многих препаратов на стадии готового средства. Это диктует необходимость проведения контроля на всех стадиях производства. Так, например, для генно-инженерных продуктов и вакцинных препаратов (инсулин, вакцины, цитокины и др.) в соответствии с рекомен-

дациями ВОЗ контроль проводится на этапе очищенных концентрированных субстанций до добавления адьюванта или вспомогательных компонентов. Затем препарат контролируется как в форме *in bulk*, так и в форме готового препарата в первичной упаковке.

2. Для возможности проведения повторных контролей или подтверждения их результатов может быть необходимым хранение образцов промежуточных продуктов в достаточном количестве и при соответствующих условиях хранения.

3. Важнейшим вопросом производства биологических препаратов является обеспечение системы контроля качества стандартными образцами. Так, например, для контроля вакцин, препаратов, крови и других биотехнологических генно-инженерных продуктов используются рекомендованные ВОЗ образцы: международные биологические стандарты, международные биологические эталонные препараты и международные биологические эталонные реагенты. Сегодня существуют стандартные образцы к большинству производимых биологических препаратов: вакцинам, интерферонам, препаратам крови, интерлейкинам, гормонам и многим другим биотехнологическим продуктам. *Обеспечение* такими *стандартами* *осуществляют*:

❖ Национальный институт стандартизации и контроля биологических препаратов, Англия;

❖ Лаборатория стандартизации биологических препаратов Государственного института сывороток, Копенгаген, Дания;

❖ Государственный институт стандартизации и контроля им. Л.А. Тарасевича, Москва, Россия;

❖ Международный институт вакцин, Южная Корея.

Необходимо отметить, что *в Украине на сегодня не существует организации, обеспечивающей производителей национальными биологическими стандартами.*

Крайне важным и своевременным для проведения контроля качества вакцин или генно-инженерных препаратов, вводимых людям, явилось создание и выпуск в 2004–2011 г.г. дополнений к Государственной Фармако-

пеи Украины (ГФУ). В данном документе впервые на территории стран СНГ представлены требования к качеству и производству данной группы препаратов. Изложение национальных требований к рекомбинантным препаратам и вакцинам в ГФУ совпадает с требованиями Европейской фармакопеи. Изложены требования, как к производственному процессу, так и к контролю на всех этапах производства промежуточных продуктов, продукции *in bulk*, конечного продукта.

Контрольные вопросы

1. Санитарные требования к производству биотехнологических препаратов.

2. Как называется единая система требований по организации производства и контролю качества препаратов? Основные принципы этой системы.

3. Что называют «чистыми помещениями»?

4. Требования GMP к оборудованию и его санитарной обработке.

5. Требования GMP к персоналу и методы его подготовки.

6. Требования GMP к производственным процессам.

7. Технологические аспекты производства субстанций, полученных методом биотехнологии.

8. С какой целью на предприятиях по производству продуктов биотехнологии проводят «зонирование» помещений?

9. Каковы принципы разделения производственных помещений, используемых для выделения биотехнологических продуктов?

ГЛОССАРИЙ

АВИДНОСТЬ – степень сродства (мера прочности связывания) антител с антигеном. Определяется аффинностью взаимодействия между всеми антигенными детерминантами (эпитопами) и активными антигенсвязывающими участками антител (паратопами) при образовании комплекса антиген-антитело.

АДАПТАЦИЯ – процесс приспособления организмов к конкретным условиям окружающей среды.

АДАПТОР. 1. Синтетический двухцепочечный олигонуклеотид с одним тупым концом и одним липким. После пришивания адаптора тупым концом к ДНК-мишени последнюю можно встраивать в подходящий вектор, используя приобретенный ею липкий конец. 2. Синтетический одноцепочечный олигонуклеотид, у которого после самогибридизации появляются липкие концы и внутренний сайт для рестрицирующей эндонуклеазы. Когда адаптор встраивают в клонирующий вектор, у последнего появляется новый сайт рестрикции.

АДЬЮВАНТЫ – вещества, которые усиливают иммунный ответ на антиген при совместном с ним введении в организм. Наиболее вероятно, что они улучшают и пролонгируют представление антигена. В число адъювантов входят эмульсии минеральных масел, соли металлов (например, $Al(OH)_3$), липидные везикулы – липосомы, производные сапонина. В настоящее время проводится интенсивный поиск новых адъювантов: различные фракции клеточных стенок микобактерий (например, мурамилдипептид), растительные вещества, полиионы и др.

АЙМАЛИН – алкалоид ($C_{20}H_{26}N_2O_2$), выделяют из раувольфии змеиной (*Rauwolfia serpentine Benth*), существует в виде двух таутомеров – относится к антиритмикам. Применяется, например, при пароксизмальной наджелудочковой и желудочковой тахикардии. Блокирует быстрые натриевые каналы клеточной мембраны. Уменьшает скорость начальной деполяризации кардиомицитов.

АКТИВАТОР. 1. Вещество, стимулирующее транскрипцию специфического гена или оперона. 2. Белок, связывающийся с оператором и ускоряющий транскрипцию.

АКТИВНЫЙ УЧАСТОК АНТИГЕНА – участок, находящийся на поверхности антигена, способный вступать во взаимодействие с активным центром специфического антитела.

АЛКАЛОИДЫ – большая группа вторичных растительных веществ (вторичные метаболиты), которые содержат один или больше атомов азота, чаще в составе гетероциклического кольца, имеют основные свойства. Большинство из них обладают фармакологической активностью. Алкалоиды не являются гомологичной группой веществ и отличаются по химическим, биохимическим и фармакологическим свойствам. Кроме С, Н, О и N, молекулы алкалоида содержат атомы S, реже Cl или Br. Алкалоидам обычно дают названия растений, из которых их выделяют. Названия алкалоидам дают: по родовому названию растений (атропин – *Atropa*); по видовому названию растений (кокаин – *Erythroxylon coca*); по физиологической активности (морфин – от названия бога сна Морфея). Наиболее принятая классификация алкалоидов базируется на строении углеродно-азотного скелета: изохинолиновые, хинолиновые, пуриновые, имидазольные, индольные, тропановые, пиридиновые и др. В настоящее время в медицине используют около 100 алкалоидов, которые используют либо в чистом виде, либо они входят в состав комплексных препаратов. Выделение алкалоидов проводят путем экстракции хлороформом или смесью воды с метанолом или этанолом. Ряд легких алкалоидов получают путем перегонки с паром (например, никотин).

АНАЭРОБНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ – микроорганизмы, растущие в отсутствие кислорода.

АНИОННО/КАТИОННО - ОБМЕННЫЕ СМОЛЫ – нерастворимый полимер с фиксированными на нем группами катионов (анионов), применяются для хроматографического разделения.

АНТИГЕН – вещество, стимулирующее любую форму адаптивного иммунного ответа. Обычно в роли антигенов выступают чужеродные частицы (клетки, бактерии, вирусы и др.) или крупные молекулы (белки, полисахариды и др.) чужого организма, но в ряде случаев мелкие молекулы (гаптены) и даже «свои» компоненты могут быть антигенными. Основное, но далеко не единственное условие антигенности, – наличие поверхностных структур, генетически отличных от тканей организма-хозяина.

АНТИТЕЛА – сывороточные глобулины с широким спектром специфичности к различным антигенам. Обладают свойством специфически связываться с антигеном, активировать комплемент, усиливать фагоцитарную активность макрофагов и нейтрализовать бактериальные токсины и вирусы.

АПРОТИНИН – относится к антиферментным препаратам (ингибитор протеиназ), представляет собой одноцепочечный полипептид, содержащий 58 аминокислотных остатков, поперечно связанных тремя дисульфидными мостиками. Апротинин оказывает антипротеолитическое, антифибринолитическое и гемостатическое действие. Является поливалентным ингибитором протеолитических ферментов (трипсина, химотрипсина, плазмина и калликрейна). Применяют при остром панкреатите, некрозе поджелудочной железы, ангионевротическом отеке.

АТРОПИН – алкалоид ($C_{17}H_{23}NO_3$), выделяют из растений семейства пасленовых: красавка (*Atropa belladonna*), белена (*Hyoscyamus niger*), различные виды дурмана (*Datura stramonium*). Используют при спазме гладких мышц пищеварительного тракта, желчных протоков, бронхов; пептической язве желудка и двенадцатиперстной кишки, остром панкреатите; используют в виде капель в офтальмологии – для расширения зрачка и достижения паралича аккомодации с целью определения истинной рефракции глаза и лечения ряда заболеваний глаз.

АТТЕНУИРОВАННАЯ ВАКЦИНА (ОСЛАБЛЕННАЯ) – вакцина, приготовленная с использованием ослабленных тем или иным способом бактерий или вирусов.

АЭРОБНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ – микроорганизмы, растущие только в присутствии кислорода.

БАКМИДА – челночный вектор на основе генома АсМNPV, способный существовать в клетках *E. Coli* и в клетках насекомых.

БЕРБЕРИН – алкалоид ($C_{20}H_{19}NO_5$), выделяют из растений семейства лютиковых (*Ranunculaceae*), барбарисовых (*Berberidaceae*), рутовых (*Rutaceae*); в промышленных количествах получают из барбариса обыкновенного (*Berberis vulgaris*). Возможно получение берберина путем глубокого культивирования клеток растений. Так, например, в Японии налажено промышленное получение берберина из культуры клеток *Coptis Japonica*. Берберин применяется для снижения артериального давления, ослабления сердечной деятельности, для стимуляции сокращения гладкой мускулатуры матки, для лечения желудочно-кишечных заболеваний (алкалоид обладает желчегонной активностью).

БИБЛИОТЕКА кДНК – коллекция клонов кДНК, синтезируемых *in vitro* на матрицах мРНК, происходящих из одной ткани или клеточной популяции.

БИОМАССА – клеточная масса, образующаяся в результате жизнедеятельности живых организмов.

БИОРЕАКТОР (ФЕРМЕНТЕР) – устройство (сосуд), в котором протекают биохимические процессы при участии живых микроорганизмов, клеточных культур или ферментов.

БЛОТТИНГ – перенос разделенных молекул из одной среды (например, геля) на твердый носитель (бумагу, нитроцеллюлозный фильтр).

ВАКЦИНА ЖИВАЯ – это микроорганизм, способный к репликации в организме хозяина или способный инфицировать клетки, тем самым, функционируя в качестве иммуногена без стимуляции его природного заболевания.

ВАКЦИНА СУБЪЕДИНИЧНАЯ ИЛИ ИНАКТИВИРОВАННАЯ – это иммуноген, не способный к репликации в организме хозяина.

ВАКЦИНА НА ОСНОВЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ – ДНК не способна реплицироваться в организме человека, но поглощается клетками, в которых она направляет синтез вакцинных антигенов.

ВАКЦИНАЦИЯ – метод, позволяющий стимулировать иммунный ответ и создавать иммунитет к возбудителю в отсутствие заболевания. Название произошло от препарата vaccine (коровья оспа – variola vaccina).

ВАРИАБЕЛЬНЫЕ ДОМЕНЫ – участки полипептидных цепей антител, имеющие неодинаковую аминокислотную последовательность у молекул разных антител. Отвечают за антигенную специфичность антител.

ВЕКТОР – самореплицирующаяся молекула ДНК (например, бактериальная плазида), используемая в генной инженерии для переноса генов от организма донора в организм-реципиент, а также для клонирования нуклеотидных последовательностей.

ВЕСТЕРН-блоттинг – перенос белковых молекул, разделенных с помощью гель-электрофореза, на твердую подложку.

ВИНКРИСТИН – алкалоид ($C_{46}H_{56}N_4O_{10}$), выделяют из растения барвинок розовый (*Vinca rosea L.*). Винкрестин блокирует митотическое деление клеток на стадии метафазы путем денатурации тубулина. Применяют в виде соли винкрестина сульфата для лечения острых лейкозов, лимфогрануломатоза, неходжкинских лимфом, рака шейки матки, рака молочной железы и других форм рака у человека.

ВИРИОН – инертные формы, в которые превращается вирус при переходе из одной клетки хозяина в другую.

ВИРУЛЕНТНОСТЬ – характеристика патогенности микроорганизма.

ВРЕМЯ ГЕНЕРАЦИИ КЛЕТКИ – интервал времени между двумя последовательными клеточными делениями.

ВРЕМЯ УДВОЕНИЯ ПОПУЛЯЦИИ – интервал времени, за который число клеток в популяции увеличивается вдвое.

ВСТАВКА – сегмент ДНК, встроенный в клонирующий вектор.

ГЕН-РЕГУЛЯТОР – ген, кодирующий белок-репрессор, который связывается с оператором и регулирует транскрипцию «своего» оперона.

ГЕН-РЕПОРТЕР – ген, кодирующий легко выявляемый продукт. Такие гены используют, например, для того, чтобы убедиться, что данная генетическая конструкция успешно введена в клетку, орган или ткань.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД – система записи генетической информации в виде последовательности нуклеотидов, в которой каждые три нуклеотида, составляющие кодон, кодируют одну аминокислоту. Состоит из 64 кодонов, кодирующих все 20 аминокислот и три терминирующих кодона.

ГЕННАЯ ИММУНИЗАЦИЯ – индукция у организма иммунного ответа без введения антигена путем включения в клетки гена, кодирующего белок-антиген.

ГИБРИДИЗАЦИЯ – отжиг двух полинуклеотидных цепей, часто из разных источников, образованием ДНК/РНК – или ДНК/ДНК- гибридов, стабилизируемых водородными связями.

ГИБРИДОМА – гибридная клеточная линия, полученная при слиянии нормальных антителообразующих клеток (лимфоцитов) и миеломных клеток. Обладает способностью к неограниченному росту и синтезу моноклональных антител.

ГИПЕРВАРИАБЕЛЬНЫЙ УЧАСТОК – сайт варибельной части тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина, характеризующийся большей изменчивостью у антител разной специфичности по сравнению с другими её сегментами – каркасными участками.

ГЛИКОЗИДЫ СЕРДЕЧНЫЕ (КАРДИОГЛИКОЗИДЫ) – большая группа соединений, производных циклопентанпергидрофенантрена, которые избирательно действуют на сердечную мышцу. Среди природных стероидов занимают особенное место, поскольку не имеют синтетических аналогов. Растения, которые содержат гликозиды сердечные, а также полученные из них препараты являются основными препаратами при лечении сердечно-сосудистой недостаточности. Гликозиды представлены двумя группами: карденолиды (группа наперстянки, строфантина) и буфадиенолиды (группа морозника). Кроме кардиотонического действия, сердечные гликозиды обладают цитотоксическим эффектом, а также успокоительным действием на центральную нервную систему. Современная схема выделения гликозидов состоит в следующем: измельчение сырья, обезжиривание его бензином или петролейным эфиром; экстракция 30–70 % этанолом; концентрация экстракта; перевод гликозидов в водный раствор; осаждение смол и хлорофилла; экстракция гликозидов органическими растворителями, которые не смешиваются с водой; выпаривание; очистка водно-спиртового раствора ацетатом свинца или гидроксидом алюминия; экстракция гликозидов из водного раствора органическими растворителями разной полярности (диэтиловый эфир, хлороформ, смесь хлороформ – этанол 3:1 – 2:1); хроматографическое разделение и кристаллизация.

ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ – ковалентное присоединение сахарного остатка к белковой молекуле.

ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ – синтез антител В-клетками иммунной системы в ответ на присутствие в организме чужеродных антител.

ДЕДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ – переход специализированных, неделящихся клеток к пролиферации.

ДЕЛЕЦИЯ – выпадение участка хромосомы из её внутренней области.

ДЕНАТУРАЦИЯ – нарушение нативной структуры биологических макромолекул в результате разрушения водородных связей.

ДИГОКСИН – сердечный гликозид ($C_{41}H_{64}O_{14}$), получают из растения наперстянки (*Digitalis lanata*). Применяется в составе комплексной терапии при сердечной недостаточности, в основном, у пациентов с низким сердечным выбросом при нормальном ритме.

ДИСУЛЬФИДНАЯ СВЯЗЬ – ковалентная связь между двумя атомами серы, входящими в молекулу цистеина. Стабилизирует третичную структуру полипептидных цепей.

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ – комплекс процессов, приводящих к различиям между дочерними, а также между дочерними и материнскими клетками.

ДНК-ЗОНД – фрагмент ДНК, меченый тем или иным образом и используемый для гибридизации со специфическим участком ДНК. Позволяет идентифицировать комплементарные ему нуклеотидные последовательности.

ДНК-ЛИГАЗА – фермент, катализирующий образование фосфодиэфирной связи между 3'-гидроксильной группой и 5'-фосфатом соседних нуклеотидов в месте одноцепочечного разрыва молекулы ДНК.

ДНК-ПОЛИМЕРАЗА – фермент, катализирующий синтез полинуклеотидной цепи из отдельных нуклеотидов, с использованием другой цепи в качестве матрицы и ДНК-затравки со свободной 3'-ОН-группой.

ДНК-ПОЛИМЕРАЗА Tag – термостабильная ДНК-полимераза (сохраняет активность при 95 °С) бактерии *Thermus aquaficus*. Применяется в методе ПЦР.

ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТ НАТРИЯ – анионный детергент, использующийся для денатурации белков.

ЕСТЕСТВЕННЫЕ КИЛЛЕРЫ – лимфоцитоподобные клетки, способные уничтожать некоторые мишени, в основном, инфицированные клетки, но без рецепторов и узкой специализации, характерных для истинных лимфоцитов.

ИЗОЛИРОВАННЫЙ ПРОТОПЛАСТ – растительная клетка, лишённая клеточной оболочки (стенки) с помощью ферментативного разрушения или механическим способом.

ИЗОПРОПИЛ-β-D-ТИОГАЛАКТОПИРАНОЗИД, ИПТГ – индуктор lac-оперона (лактозного). В технологии рекомбинантных ДНК используется для индукции клонированных генов, находящихся под t-контролем системы lac-репрессор – lac-промотор.

ИММУНИЗАЦИЯ:

Активная – введение в организм вакцин, приводящее к стимулированию выработки антител и/или клеток иммунной системы, обладающих функцией памяти и эффекторными функциями, например, цитотоксические Т-клетки.

Пассивная – введение в организм препаратов антител, когда имеется необходимость в экстренной защите человека вследствие инфицирования вирусами и бактериями.

В ряде случаев применяют одновременно активную и пассивную иммунизацию. Так, например, при укусе животными с подозрением на бешенство вводят антирабическую вакцину и антирабический иммуноглобулин или при профилактике столбнячной инфекции применяют противостолбнячную сыворотку и адсорбированный столбнячный анатоксин.

ИММУННАЯ ПАМЯТЬ – это способность организма реагировать по вторичному типу, т.е. ускоренно и усиленно вырабатывать антитела при повторном введении антигена, которым индивидуум был иммунизирован ранее, при этом синтез антител осуществляется быстрее, иногда уже через 48 часов. К сохранению иммунной памяти причастны оба типа стимулированных антигеном лимфоцитов, то есть В- и Т-клетки. Иммунологическая перестройка лимфатической системы после первого контакта с антигеном может сохраняться в организме в течение длительного времени и даже пожизненно. Поэтому в ряде случаев через много лет после первичного введения антигена в ответ на его повторное введение происходит быстрое образование соответствующих антител в высоком титре.

ИММУННЫЙ ОТВЕТ – совокупность физиологических процессов в организме, индуцируемых при попадании в него чужеродных антигенов.

ИММУННЫЙ ОТВЕТ ГУМОРАЛЬНЫЙ – продукция специфических антител в ответ на воздействие чужеродного антигена. Основную роль в реализации гуморального ответа играют В-лимфоциты, которые под влиянием антигенного стимула дифференцируются в антителопродуцирующие клетки. В-лимфоциты, как правило, нуждаются в помощи Т-хелперов и антигенпрезентирующих клеток.

ИММУННЫЙ ОТВЕТ КЛЕТОЧНЫЙ – накопление в организме клона Т-лимфоцитов (цитотоксических лимфоцитов), несущих специфические для данного антигена антигенраспознающие рецепторы и отвечающие за клеточные реакции (распознавание и разрушение клеток мишеней). Например, разновидностью клеточного иммунного ответа является реакция гиперчувствительности замедленного типа.

ИММУНОАФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ – метод очистки и выделения, при котором фиксированное на матрице антитело связывает специфический белок (антиген), находящийся в смеси других белков.

ИММУНОСУПРЕССИЯ – потеря способности иммунной системы организма к иммунному ответу на антиген.

ИНДУКТОР – небольшая молекула, связывающаяся с регуляторным белком-репрессором, что приводит к дерепрессии соответствующих генов.

ИНДУКЦИЯ – дерепрессия гена или группы генов под действием индуктора.

ИНИЦИАЦИЯ – начало синтеза биополимера.

ИНОКУЛУМ (трансплантат) – часть суспензионной (каллусной) культуры, используемая для пересадки на свежую среду.

ИНТЕГРАЦИЯ – встраивание чужеродной ДНК (обычно с помощью гомологичной рекомбинации) в хромосому хозяйской клетки.

ИНТЕГРИРУЮЩИЙ ВЕКТОР – вектор, специально сконструированный для того, чтобы с его помощью можно было встраивать (интегрировать) клонированную ДНК в геном клетки-хозяина.

ИНТЕРФЕРОНЫ – группа низкомолекулярных белков (20–40 кDa), продуцируемых в ответ на вирусную инфекцию. Продуцируются макрофагами (ИФ-альфа), фибробластами (ИФ-бета) и Т-клетками (ИФ-гамма). Интерфероны стимулируют клетки к выделению белков, блокирующих транскрипцию информационной РНК вируса. Интерфероны блокируют фундаментальные процессы репродукции нуклеиновых кислот. К действию интерферонов чувствительны практически все вирусы. Интерфероны влияют на деление нормальных клеток. Интерфероны проявляют противовирусные и противоопухолевые лечебные свойства.

ИММУНОГЛОБУЛИНЫ – растворимые сывороточные белки, которые выполняют функцию антител, защищающих организм от инфекции. Молекула иммуноглобулина состоит из двух идентичных, более длинных «тяжелых» цепей, связанных друг с другом дисульфидными связями, и связанных с ними двух идентичных, но более коротких «легких» цепей. Так, например, иммуноглобулин G состоит из тяжелых цепей с молекулярной массой 53 кDa и легких цепей с молекулярной массой 23 кDa. С-концевые участки как легких, так и тяжелых цепей практически не отличаются по структуре в иммуноглобулинах одного типа и называются постоянными участками. Область Fc, представляющая собой остов молекулы антитела, построена из С-концевых последовательностей постоянных участков тяжелых цепей. Дифференциация антител в пределах одного типа осуществляется в N-концевых участках цепей, называемых переменными. Связывающий антиген активный центр антитела образуется из переменных участков легких и тяжелых цепей. Физические, антигенные и функциональные различия между константными областями определяют 5 основных классов тяжелых цепей – M, G, A, E и D и соответствующие им 5 классов иммуноглобулинов (Ig). IgM (м.м. 900 кDa) первыми синтезируются в ответ на первичную антигенную стимуляцию. Так как они имеют пентамерную структуру с 10 активными центрами, то они эффективны в связывании и агглютинации микроорганизмов, вызывают нейтрализацию вирусов; IgG (М.м 150 кDa) при иммунном ответе появляются в сыворотке вслед за IgM. Обладают способностью активно связываться своим Fc-участком с C1q (первый компонент классического пути активации комплемента), активируя комплемент, и рецепторами фагоцитов. Антитела класса IgG играют основную роль в гуморальном иммунитете при инфекционных заболеваниях, участвуют во многих иммунологических реакциях; IgA (м.м. 385 кDa) – основные антитела, содержащиеся в секрете (слюна, пот), в легких, кишечнике, молоке, молозиве, желчи и моче. Основная функция – предотвращать проникновение антигенов с внешних поверхностей в ткани, участвуют в механизмах развития местного иммунитета, ней-

трализируют энтеротоксин, активируют комплемент и процесс фагоцитоза; IgE (м.м 200 кDa) – способны через Fc-фрагмент связываться с тучными клетками и стимулировать их дегрануляцию. К ним относится основная масса аллергических антител (реагинов); IgD (м.м. 185 кDa) – действуют на поверхности В-клеток, выполняя регулирующие функции. Антитела класса Ig D принимают участие в развитии местного иммунитета, обладают антивирусной активностью. Участвуют в развитии аутоиммунных процессов.

КАЛЛУС – ткань, возникшая путем неорганизованной пролиферации клеток органов растений.

КАПСИД – белковая оболочка вирусной частицы.

β-КЕТОРЕДУКТАЗА – фермент, принимающий участие в синтезе поликетидных антибиотиков.

В-КЛЕТКИ – лимфоциты, продуцирующие антитела и происходящие из клеток костного мозга.

КЛЕТКИ КРОВИ:

- *Нейтрофил* – самый распространенный лейкоцит крови. Гранулы этой короткоживущей фагоцитарной клетки содержат большое количество бактерицидных веществ;
- *Эозинофил* – лейкоцит с крупными преломляющими гранулами, в которых содержится значительное количество основных, или катионных, белков, возможно, важных для уничтожения больших паразитов, включая червей;
- *Базофил* – лейкоцит с крупными базофильными гранулами, в которых содержится гепарин и вазоактивные амины, важные для воспалительного процесса. Нейтрофилы, эозинофилы и базофилы объединяют под общим названием «Гранулоциты»;
- *Моноцит* – самая большая ядросодержащая клетка крови, образуется в костном мозге. Проникая в ткани, созревает в МАКРОФАГ;
- *Макрофаг* – основной оседлый тканевой фагоцит в тканях и серозных жидкостях брюшины, плевры и др. Тканевые макрофаги – основные продуценты цитокинов ИЛ-1, ИЛ-6, и др., которые вызывают острую фазу ответа, изменения сосудистого эндотелия, а затем процессы репарации в тканях. Макрофаги могут находиться в свободном состоянии в тканях или закрепляться на стенках кровеносных синусов, где отслеживают в крови чужеродные частицы, ослабленные эритроциты и др. Эта способность наиболее

сильно выражена в печени, где макрофаги называют клетками Купфера. Подобные функции альвеолярные макрофаги выполняют в легких, где очищают альвеолы от свободных частиц и микробов. Макрофаги (как и полиморфно-ядерные лейкоциты) обладают ценной способностью распознавать не только чужеродный материал, но и связанные с ним антитела и/или комплемент, что существенно ускоряет процесс фагоцитоза. Макрофаги секретируют многие естественные гуморальные факторы: интерфероны, некоторые компоненты комплемента, цитотоксические факторы, лизоцим (мурамидаза, важный бактерицидный фермент, атакующий клеточные мембраны бактерий, присутствующий в крови в количестве 1 мг/мл). Лизирует многие сапрофиты, некоторые патогенные бактерии, поврежденные антителами и / или комплементом;

- *Мегакариоцит* – клетка-предшественник тромбоцита;
- *Тромбоцит* – небольшая клетка, участвующая в гемостазе и выделяющая многие медиаторы воспалительных процессов. Помимо активного участия в свертывании крови, способен фагоцитировать комплексы антиген – антитело.

КЛЕТОЧНАЯ ЛИНИЯ – культура, полученная из штамма путем селекции или клонирования, имеющие маркерные признаки.

КЛОН – популяция клеток или молекул, идентичных одной родоначальной клетке или молекуле.

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ – система методов, использующаяся для получения клонированных ДНК: выделение нужного гена из какого-либо организма, встраивание его в плазмиду (вектор), введение в клетку организма-хозяина, многократная репликация.

КОДЕИН – алкалоид (C₁₈H₂₁NO₃), выделяется из мака снотворного (*Papaver somniferum*), используется как противокашлевое лекарственное средство центрального действия. Обладает слабым наркотическим (опиатым) и болеутоляющим эффектом.

КОДОН – три соседних нуклеотида, кодирующих определенную аминокислоту. Всего существует 64 сочетания нуклеотидов в кодонах: 61 из них кодирует 20 аминокислот, 3 являются нонсенс-кодонами.

КОНСТАНТНЫЙ ДОМЕН – неизменная для данного класса иммуноглобулинов часть тяжелой или легкой полипептидной цепи.

КОФЕИН – алкалоид ($C_8H_{10}N_4O_2$), выделяется из семян кофе (1–2 %), листьев чая (2,0 %) и других растительных источников. Используется преимущественно как стимулятор центральной нервной системы. Кофеин усиливает и регулирует процессы возбуждения в коре головного мозга, усиливает положительные рефлексy, повышает двигательную активность. В составе лекарственных препаратов используется в виде соли – кофеинбензоат натрия.

КОНЬЮГАТИВНЫЕ ПЛАЗМИДЫ – плазмиды, способные передаваться от одной клетки к другой во время конъюгации.

КОСМИДА – вектор, объединяющий свойства плазмидного вектора и вектора на основе фага лямбда. Имеет cos-сайты.

КОФАКТОР – низкомолекулярное вещество, необходимое для протекания определенной ферментативной реакции.

КУЛЬТУРА – популяция клеток или микроорганизмов, выращиваемых и контролируемых в условиях *in vitro*.

КУЛЬТУРА КЛЕТОК (суспензионная культура) – выращивание отдельных клеток или их небольших групп во взвешенном состоянии в жидкой среде при использовании аппаратуры, обеспечивающей их аэрацию и перемешивание.

КУЛЬТУРА ЭКСПЛАНТАНТОВ – инкубация в стерильных условиях на питательных средах сегментов из разных органов растений.

ЛАЛ-ТЕСТ – используется для определения бактериальных эндотоксинов в инъекционных препаратах. В основе лежит процесс физико-химического взаимодействия эндотоксинов с лизатом клеток (амебоцитов) крови мечехвостов, в результате которого происходит образование геля. Поскольку первые исследования проводились на мечехвостах *Limulus polyphemus*, реактив, приготовленный из их крови, был назван Лизат Амебоцитов Лимулюс, или сокращенно ЛАЛ-реактив, а метод, в котором он используется, получил название ЛАЛ-тест. Положительная реакция характеризуется образованием плотного геля, который не разрушается при переворачивании пробирки на 180°. При отрицательной реакции такой гель не образуется.

ЛИГИРОВАНИЕ – соединение двух молекул ДНК с помощью фосфодиэфирных связей. *In vitro* катализируется ферментом ДНК-лигазой фага Т4.

ЛИДЕРНАЯ ПСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ – нетранслируемая последовательность мРНК, расположенная между 5'-концом и иницирующим кодоном AUG.

ЛИЗИС – разрушение клеточных стенок под действием ферментов, содержащихся в лизосомах, или других агентов, распад клетки, необратимое истечение её содержимого через поврежденную мембрану.

ЛИМФОЦИТ – мелкая клетка крови, из которой она рециркулирует через ткани и обратно (через лимфу) в поисках чужеродных веществ. Её способность распознавать индивидуальные антигены с помощью специализированных поверхностных рецепторов и продуцировать большие клоны подобных клеток с идеальной специфичностью и длительным жизненным сроком отвечает задачам адаптивного иммунитета. Различают Т- и В-лимфоциты:

- *В-лимфоциты* (В-клетки, от лат. bursa). Участвуют в выработке антител – гуморальных факторов адаптивного иммунитета;
- *Т-лимфоциты* (Т-клетки, от лат. thymus). Делятся на несколько субпопуляций, которые взаимодействуют с В-лимфоцитами, убивают зараженные вирусом клетки, активируют макрофаги и выполняют ряд других функций. Т-лимфоцит, стимулированный антигеном, переходит в бластную форму и выделяет цитокины (например, интерферон-гамма), повышающие активность макрофагов.

CD8 – молекула на поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов. Распознает молекулу ГКГС (главного комплекса гистосовместимости) класса I, что необходимо до того, как цитотоксическая Т-клетка убьет клетку, инфицированную вирусом.

CD4 – молекула корцептора, взаимодействующая с молекулой ГКГС класса II. Экспрессирован на Т-хелперах, взаимодействует с В-лимфоцитами или макрофагами.

ЛИНКЕР – синтетический олигонуклеотид, содержащий сайт рестрикции. Используется для соединения векторной и клонируемой ДНК, к концам которой по методу сшивания тупых концов присоединены линкеры.

ЛИПКИЕ КОНЦЫ – взаимно комплементарные одноцепочечные участки ДНК, выступающие по концам двухцепочечной молекулы; образуются в результате ступенчатых разрезов двухцепочечных ДНК.

ЛИПОСОМА – структура, образуемая одно- или двухслойной мембраной, состоящей из липидных молекул. Гидрофобная часть этих молекул обращена внутри структуры, гидрофильная наружу. Внутри липосомы могут находиться белки, нуклеиновые кислоты, лекарственные вещества. В липидном би-слое могут находиться гидрофобные вещества.

ЛИТИЧЕСКИЙ ЦИКЛ – размножение вируса (фага) в клетке-хозяине, оканчивающееся лизисом клетки.

ЛОКУС – место на хромосоме, где находится специфический ген.

МАКРОФАГИ – большие тканевые клетки, удаляющие из организма поврежденные ткани, клетки, бактерии и другие материалы. Макрофаги и полиморфно-ядерные лейкоциты называют также миелоидными клетками, подчеркивая их общее происхождение в костном мозге.

МАРКЕРНЫЙ ГЕН – ген с известной хромосомной локализацией, имеющий четкое фенотипическое проявление (устойчивость к антибиотику, ферментативная активность и т.д.).

МАРКЕРНЫЙ ПЕПТИД – участок гибридной белковой молекулы, облегчающий идентификацию или очистку белка.

МЛЕЧНИКИ – отдельные клетки и продольные цепочки слившихся клеток, содержащих в вакуолях млечный сок.

МЛЕЧНЫЙ СОК – представляет собой жидкость молочного цвета (иногда ярко-оранжевого, желтого и желтовато-коричневого). Млечный сок – эмульсия, содержащая различные соединения (алкалоиды, терпены, гликозиды, белки, танин и др.), которые накапливаются в клеточном соке в виде гидрофобных капелек.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА – однотипные антитела, строго специфичные в отношении одного эпитопа (антигенной детерминанты). Синтезируются гибридами – клеточными гибридами, полученными при слиянии нормальных антителообразующих клеток с миеломной опухолевой клеткой, способной к неограниченному росту.

МОРФИН – алкалоид ($C_{17}H_{19}NO_3$), выделяется, практически, только из застывшего млечного сока коробочек мака снотворного (*Papaver somniferum*). Применяется при выраженных болевых синдромах (инфаркт миокарда, онкологические заболевания, травмы, послеоперационный период и т.д.).

НЕГАТИВНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ – тип регуляции, при котором транскрипция гена подавляется регуляторным белком (репрессором); соответственно при инактивации белка-регулятора структурные гены остаются в активном состоянии.

НЕПРЕРЫВНАЯ ФЕРМЕНТАЦИЯ – культивирование микроорганизмов при непрерывном добавлении в биореактор среды и выведении такого же объема суспензии.

НОЗЕРН-блоттинг – перенос молекул РНК, подвергнутых электрофорезу, с геля на твердую подложку (нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр) с последующей ДНК-РНК-гибридизацией.

ОКРАШИВАНИЕ ПО ГРАМУ – метод окрашивания микробиологических препаратов, позволяющий идентифицировать две группы бактерий: грамположительные и грамотрицательные. Основан на различии биохимического состава мембран бактериальных клеток.

ОПЕРАТОР – участок ДНК, непосредственно примыкающий к структурному гену и регулирующий его транскрипцию при участии репрессора или активатора.

ОПЕРОН – участок ДНК, содержащий несколько структурных генов, транскрибируемых с образованием одной полицистронной мРНК.

ОТЖИГ – процесс образования двухцепочечных молекул (ДНК–ДНК или ДНК–РНК) из одиночных полинуклеотидных комплементарных цепей.

ПАССИВНЫЙ ИММУНИТЕТ – форма иммунитета, возникающая при введении в организм сыворотки или препаратов иммуноглобулинов, содержащих антитела, выработанные другим организмом в результате активной иммунизации.

ПЕПТИДНАЯ ВАКЦИНА – короткая цепочка из аминокислот, индуцирующая образование антител к специфическому инфекционному агенту.

ПЕРВИЧНАЯ КУЛЬТУРА – культура клеток или тканей, взятых непосредственно из организма.

ПЕРИОДИЧЕСКАЯ ФЕРМЕНТАЦИЯ – культивирование микроорганизмов в течение ограниченного интервала времени. Свежую среду инокулируют посевным материалом, и проводят культивирование в непрерывном режиме, не добавляя новых порций среды и не удаляя продуктов, пока процесс не завершится сам собой.

ПИРОГЕН – вещество, продуцируемое бактериями (эндотоксин) и вызывающее повышение температуры.

ПЛАЗМИДА – внехромосомный генетический элемент, способный к длительному автономному существованию и репликации. Обычно это двухцепочечная кольцевая ДНК. Плазмиды есть практически у всех бактерий. Размеры плазмид достигают до 500 т.п.н.

ПЛАЗМИДНЫЙ ВЕКТОР pBR 322 – один из первых созданных плазмидных векторов. Обычно обозначение плазмидного вектора включает букву p (plasmid) и еще несколько букв, имеющих отношение к описанию вектора или истории его создания. Так, буквы BR в обозначении плазмиды p BR 322 указывают на авторство Ф. Боливара и Р. Родригеса, сконструировавших эту плазмиду, а число 322 – цифровое обозначение, взятое из протоколов исследования. Длина плазмиды pBR322 – 4361 п.н. Она несет два гена устойчивости к антибиотикам ампициллину (Amp^r) и тетрациклину (Tet^r), а также уникальные сайты BamHI, Hind III и Sal I в гене Tet^r и один сайт Pst I в гене Amp^r; один сайт для Eco RI (Eco RI – рестрицирующая эндонуклеаза типа II, выделенная из *E. Coli* и играющая ключевую роль при генном клонировании), находящийся за пределами кодирующих последовательностей, и сигнал начала репликации, обеспечивающий репликацию исключительно в *E. Coli*. Принцип работы вектора pBR322 можно представить следующим образом: при обработке очищенной кольцевой плазмиды рестриктазой, расщепляющей её в единственном сайте, расположенном в одном из генов устойчивости к тому или другому антибиотику, образуется линейная молекула с липкими концами. Такие молекулы смешивают с донорской ДНК, содержащей нужный ген и предварительно обработанной такой же рестриктазой. Поскольку липкие концы этих двух ДНК взаимно комплементарны, они спариваются с образованием гибридных молекул. На следующем этапе проводят выделение и очистку рекомбинантных ДНК, освобождая их от нежелательных продуктов и различных комбинаций фрагментов, в частности, объединившихся между собой фрагментов донорской ДНК и исходной ДНК плазмиды. Следующим этапом является процесс трансформации – введение рекомбинантной ДНК в клетку хозяина.

ПОЛИВАЛЕНТНАЯ ВАКЦИНА (комбинированная) – вакцина, дающая иммунный ответ на несколько инфекционных агентов (антигенов).

ПОЛИКЕТИДСИНТАЗА – фермент, участвующий в биосинтезе поликетидных антибиотиков.

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР) – это эффективный способ получения *in vitro* большого числа копий специфических нуклеотидных последовательностей. Их амплификация (иногда в миллионы раз) осуществляется в ходе трехэтапного циклического процесса. Для ПЦР необходимы: 1) два синтетических олигонуклеотидных праймера (длиной примерно по 20 нуклеотидов), комплементарные участкам ДНК из противоположных цепей, фланкирующим последовательность-мишень; 2) их 3'-гидроксильные концы после отжига с ДНК должны быть ориентированы навстречу друг другу; ДНК-мишень длиной от 100 до ~ 35000 п.н.; 3) термостабильная ДНК-полимераза, которая не теряет своей активности при температуре 95 °С и выше; 4) четыре дезоксирибонуклеотида.

Типичная ПЦР-амплификация состоит в многократном повторении следующих трех реакций:

1. *Денатурация*. Первый этап ПЦР состоит в тепловой денатурации образца ДНК выдерживанием его при температуре 95 °С в течение по крайней мере 1 минуты. Помимо ДНК, в реакционной смеси содержится в избытке два праймера, термостабильная ДНК-полимераза Taq, выделенная из бактерий *Thermus aquaticus*, и четыре дезоксирибонуклеотида.

2. *Ренатурация*. Температуру смеси медленно понижают до ~55 °С, при этом праймеры спариваются с комплементарными последовательностями ДНК.

3. *Синтез*. Температуру повышают до ~ 75 °С – величины, оптимальной для ДНК полимеразы Taq. Начинается синтез комплементарной цепи ДНК, иницируемый 3'-гидроксильной группой праймера.

Все реакции проводят в пробирках, погруженных в термостат. Смена температурного режима и его поддержание осуществляется автоматически. Каждый цикл обычно длится 3–5 минут.

ПРАЙМЕР – корот кофеин-бензоат натрия кий олигонуклеотид, который гибридизуется с матрицей и служит затравкой при её копировании.

ПРОКАРИОТЫ – организмы, у которых нет ограниченных мембранами ядра и оргanelл. К прокариотам относятся все бактерии.

ПРОМОТОР – специфическая последовательность в молекуле ДНК, с которой связывается РНК-полимераза, что сопровождается инициацией транскрипции соответствующих генов. Обычно находится перед 5'-концом регулируемого гена.

ПРОТЕИНАЗЫ, ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ – ферменты, расщепляющие пептидные связи в белковых молекулах.

ПРОТЕОЛИЗ – ферментативное расщепление белков.

ПРОТОПЛАСТ – растительная, бактериальная или дрожжевая клетка, стенка которой разрушена ферментативным или химическим путем.

ПРОФАГ – ДНК бактериофага, интегрированная в геном бактериальной клетки-хозяина и реплицирующаяся вместе с ней.

РЕГУЛЯТОРНЫЙ БЕЛОК – белок, «включающий» и «выключающий» транскрипцию.

РЕДИФЕРЕНЦИАЦИЯ – переход специализированных клеток из одного состояния в другое с предшествующими делениями или непосредственно.

РЕЗЕРПИН – алкалоид ($C_{33}H_{40}N_2O_9$), выделяется из раувольфии змеиной (*Rauwolfia serpentine Benth*), применяется при легких формах сердечной недостаточности с тахикардией, поздних токсикозах беременных, тиреотоксикозе. Уменьшает нейровегетативные расстройства.

РЕКОМБИНАНТНАЯ ДНК – молекула ДНК, полученная объединением *in vitro* разнородных, вместе нигде в природе не существующих, фрагментов ДНК.

РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДА – плаزمид, измененная методами генной инженерии. Состоит из участков разных плазмид либо содержит сегменты ДНК других организмов.

РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК – белок, кодируемый клонированной рекомбинантной ДНК.

РЕНАТУРАЦИЯ – одна из ключевых стадий получения рекомбинантных белков, в процессе которой денатурированный белок приобретает нативную пространственную структуру, обеспечивающую его биологическую активность.

РЕПЛИКАЦИЯ – процесс самовоспроизведения (синтеза) ДНК.

РЕПРЕССИЯ – один из двух альтернативных (наряду с индукцией) механизмов регуляции генов. Состоит в подавлении транскрипции или трансляции путем связывания белка-репрессора с оператором.

РЕПРЕССОР – белок, связывающийся с оператором или промотором данного гена и блокирующий связывание с этими элементами РНК-полимеразы.

РЕСТРИКТАЗА. РЕСТРИЦИРУЮЩАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА – бактериальный фермент, расщепляющий двухцепочечную молекулу ДНК в специфических сайтах.

РИБОСОМА – клеточная органелла, рибонуклеопротеидная частица, при участии которой осуществляется синтез белка (трансляция). Состоит из двух субъединиц: большой и малой.

РНК-ПОЛИМЕРАЗА – фермент, осуществляющий синтез РНК из рибонуклеозидтрифосфатов. Матрицей может служить ДНК или РНК, соответствующие РНК-полимеразы называют ДНК- или РНК-зависимыми.

САЙЛЕНСИНГ – процесс подавления экспрессии генов. При этом последовательность нуклеотидов не изменяется, а лишь прекращается экспрессия соответствующего гена. Сайленсинг может происходить как на уровне транскрипции (является результатом модификации гистонов в гетерохроматине, которая приводит к тому, что соответствующие участки ДНК становятся недоступными для аппарата транскрипции (РНК-полимераза и факторов транскрипции)), так и на посттранскрипционном уровне (является результатом разрушения (деградации) мРНК соответствующих генов).

САЙТ ВСТРАИВАНИЯ – специфический участок векторной молекулы, в который встраивают фрагмент чужеродной ДНК.

САЙТ РЕСТРИКЦИИ – нуклеотидная последовательность в молекуле ДНК, узнаваемая рестриктазой.

САУЗЕРН-блоттинг – обнаружение специфических нуклеотидных последовательностей путем переноса денатурированных молекул ДНК, подвергнутых электрофорезу, с агарозного геля на нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр за счет капиллярного эффекта и гибридизации с меченым зондом, комплементарным искомым последовательности.

CD (cluster of differentiation) – используется для идентификации выявляемых моноклональными антителами поверхностных антигенов, главным образом лейкоцитов. Позволяет классифицировать Т- и В-клетки и линии их развития.

СЕКРЕЦИЯ – выведение синтезированных веществ из клетки во внешнюю среду.

СЕРОТИП – антигенная характеристика клетки (бактерии, вируса, клетки крови и др.), установленная на основании её взаимодействия с антителами.

СОМАКЛОНАЛЬНЫЕ ВАРИАЦИИ (ИЛИ ВАРИАНТЫ) – фенотипическое выражение непостоянства ядерных генов и генов органелл растительных клеток. От традиционных генных мутаций отличается большей частотой возникновения и комплексностью изменений.

СОМАТИЧЕСКАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ – система, вовлекающая в генетическую рекомбинацию хромосомы гены ядра и органелл вне сексуального цикла, например, путем слияния изолированных протопластов. Приводит к появлению соматических гибридов растений и гибридных клеточных линий.

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ – митотически активные стволовые клетки, в результате деления которых происходит замещение погибших клеток в многоклеточном организме.

СТРУКТУРНЫЙ ГЕН – ген, кодирующий какой-либо белок.

СУБКУЛЬТИВИРОВАНИЕ – перенос клеток в другой культуральный сосуд на свежую питательную среду.

СУБЪЕДИНИЧНАЯ ВАКЦИНА – вакцина, содержащая лишь отдельные компоненты патогенного микроорганизма.

СОС-САЙТЫ – нуклеотидные последовательности на концах генома фага лямбда, необходимые для упаковки ДНК в фаговые частицы.

ТАКСОЛЫ – алкалоиды, выделенные из коры Паклитаксел ($C_{47}H_{51}NO_{14}$) и игл Доцетаксел ($C_{43}H_{53}NO_{14}$) тиса (*Taxus canadensis*), обладают выраженным цитостатическим действием. В настоящее время в схемах лечения онкологических больных широко используются паклитаксел и доцетаксел. Доцетаксел способствует накоплению тубулина в микротрубочках и препятствует их распаду, что вызывает нарушение фазы митоза и межфазных процессов в опухолевых клетках. Применяется для лечения местно-прогрессирующего или метастазирующего рака молочной железы и рака легкого, метастазирующей карциномы яичника. Паклитаксел вызывает необратимую полимеризацию белков микротрубочек клеточной цитоплазмы, в результате чего нарушается динамическое равновесие процесса «полимеризация – деполимеризация», обеспечивающего нормальное функционирование внутриклеточных структур в течение всего жизненного цикла клетки. Применяется для лечения немелкоклеточного рака легкого у больных, которым не показано хирургическое лечение или лучевая терапия, при карциноме яичников, метастазирующей карциноме молочной железы при неэффективности стандартной терапии.

ТЕРМИНАЦИЯ – остановка синтеза макромолекулы.

ТОКСОИД (АНАТОКСИН) – инактивированные формалином, но сохранившие антигенность бактериальные токсины (например, дифтерии, столбняка, ботулизма или газовой гангрены).

ТОПИПОТЕНТНОСТЬ – свойство соматических клеток растений полностью реализовать свой потенциал развития, т.е. реализовать omnipotentность ядра с образованием целого организма.

ТРАНСГЕННЫЙ ОРГАНИЗМ – организм, геном которого содержит чужеродный генетический материал, включенный методами генной инженерии.

ТРАНСГЕНОЗ – введение чужеродного гена в растительную или животную клетку и его передача в ряду поколений.

ТРАНСДУКЦИЯ – перенос генетического материала из одной бактериальной клетки в другую с помощью бактериофага.

ТРАНСКРИПЦИЯ – процесс синтеза РНК, катализируемый РНК-полимеразой, в котором в качестве матрицы используется одна из цепей ДНК.

ТРАНСЛЯЦИЯ – синтез полипептидной цепи рибосомой с использованием в качестве матрицы мРНК.

ТРАНСФОРМАЦИЯ – перенос генетической информации в бактериальные клетки с участием плазмид (или без них).

ФАГОЦИТОЗ – поглощение частиц клеткой. Наиболее важные фагоцитарные клетки, уничтожающие большую часть попавшего в организм чужеродного материала – макрофаги и полиморфно-ядерные лейкоциты.

ФЕРМЕНТАЦИЯ – в промышленной микробиологии – крупномасштабное культивирование микроорганизмов в специальных емкостях (биореакторах или ферментерах).

ФЕРМЕНТНЫЙ ИММУНОСОРБЕНТНЫЙ АНАЛИЗ, ELISA – метод обнаружения специфических молекул в образце. Образец фиксируют на твердой подложке и добавляют антитело, специфичное к маркерной молекуле (первое антитело). Несвязавшиеся молекулы первого антитела смывают и добавляют второе антитело, специфически связывающееся с первым. Ко второму антителу присоединен фермент, превращающий неокрашенный субстрат в окрашенный продукт. Проводят количественное определение окрашенного продукта.

ФИБРИН – конечный продукт свертывания крови; в тканях – матрикс, в который мигрируют фибробласты, чтобы запустить процесс заживления.

ФИМБРИИ – выросты, находящиеся на поверхности клеток грамотрицательных бактерий, используемые бактериями для прикрепления к клеткам, тканям. Присоединение может быть заблокировано антителами.

ШТАММ – культура, возникшая после первого субкультивирования. Состоит из многих клеточных линий, возникших из клеток, присутствующих в первичной культуре.

ЭКЗОГЕННАЯ ДНК – ДНК, выделенная из организма-донора и встроенная в вектор или хромосомную ДНК организма-хозяина. Называется чужеродной и гетерологичной ДНК.

ЭКЗОТОКСИН – токсин, выделяемый микробной клеткой в окружающую среду.

ЭКСПЛАНТ – фрагмент ткани или органа, инкубируемый самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса.

ЭКСПРЕССИЯ – транскрипция и трансляция гена.

ЭЛОНГАЦИЯ – последовательное присоединение мономеров к полимерной цепи.

ЭНДОТОКСИН – токсин, выделяемый клеткой в окружающую среду, входящий в состав клеточной мембраны; многие эндотоксины вырабатываются грамотрицательными бактериями и вызывают воспаление.

ЭПИТОП, АНТИГЕННАЯ ДЕТЕРМИНАНТА – часть молекулы антигена, взаимодействующая с антигенсвязывающим центром антител или Т-клеточного рецептора.

ЭУКАРИОТЫ – организмы, у которых имеется ядро, где содержатся хромосомы; в цитоплазме присутствуют различные органеллы – митохондрии, хлоропласты и т.д. К эукариотам относятся животные, растения, грибы, некоторые водоросли.

IN VITRO – выращивание живого материала в «стекле», на искусственных питательных средах, в асептических условиях.

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ И ОЧИСТКИ БЕЛКОВ

ИОННО-ОБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ. Ионообменники, как известно, представляют собой нерастворимый материал, содержащий химически связанные заряженные группы и подвижные противоположные ионы. Подвижные ионы могут быть обратимо замещены другими ионами с тем же зарядом без каких-либо изменений нерастворимой матрицы. Если матрица несет положительно заряженные группы, то подвижные ионы имеют отрицательный заряд, и такой ионообменник называется анионообменником. При наличии отрицательных групп матрицы и положительных ионов обмениваются катионы, и такой ионообменник называется катионообменником. Нерастворимой основной матрицей могут служить алюмосиликаты, синтетические смолы, полисахариды и т.д. Природа матрицы определяет механическую стабильность и проточные свойства ионообменника, а также степень неспецифического воздействия на белки. Наличие заряженных

групп характеризует свойства ионообменника, определяет тип и активность ионного обмена. Общее число групп и их доступность для обмена также влияют на реакционную способность. Фенолгидроксильные, карбоксильные и сульфоновые группы используют для формирования катионообменников, алифатические или ароматические группы – для анионообменников.

Наибольшее распространение в препаративной химии белка нашли ионообменники на основе целлюлозы или декстрана (сефадекс). Эффективность применения этих ионообменников для разделения щелочных и нейтральных белков обусловила их применение не только в исследовательских целях, но и в промышленной биотехнологии.

Наиболее употребительные ионообменные целлюлозы:

- анионит – диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ-целлюлоза);
- катионит – фосфоцеллюлоза (Ф-целлюлоза);
- катионит – карбоксиметилцеллюлоза (КМ-целлюлоза).

ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ. Термин «гель-фильтрация (хроматография)» объединяет способы разделения белков в условиях сетчатой структуры геля. Данный вид хроматографии находит все большее применение при разделении смесей белков благодаря высокой разрешающей способности, а также мягкому воздействию на белки, не вызывающему денатурационных изменений.

Гранулы геля с растворителем помещают в вертикальную колонку, на поверхностный слой наносят разделяемое вещество. При промывании колонки растворителем микрочастицы поступают в гель, который не препятствует диффузии небольших молекул, распределяющихся равномерно по всему сечению колонки. Более крупные молекулы белков не проникают в гранулы, остаются в окружающем их слое растворителя и движутся вместе с током жидкости. Поэтому крупные молекулы проходят слой геля с большей скоростью, чем мелкие, движение которых задерживается в результате диффузии в неподвижную фазу. Скорость продвижения молекул промежуточных размеров также различна за счет частичного проникновения их в гель. Таким образом, компоненты смеси элюируются с колонки, заполненной гелем, в порядке уменьшения их относительной молекулярной массы в соответствии со степенью торможения, вызванного диффузией в гранулы геля.

Современные методы молекулярной фильтрации и ионообменной хроматографии в гелях получили новое развитие после того, как в 1959 г. шведская фирма «Pharmacia» выпустила полимер декстрана «сефадекс», полученный из *Leuconostoc mesenteroides* обработкой декстрана эпихлоргидрином.

Гель, образованный из гранул этого полимера, представляет собой пространственное молекулярное сито, построенное из нитевидных молекул полисахарида декстрана, соединенных через определенные промежутки поперечными связями. В зависимости от числа поперечных мостиков и их длины образуются различные по размеру ячейки. Типы сефадекса различаются по номерам, которые соответствуют размеру ячеек – чем больше размер ячеек, тем выше номер сефадекса. Первыми элюируются наиболее крупные молекулы, затем мелкие.

Некоторые типы сефадексов позволяют чередовать два различных принципа разделения белковых смесей при производстве вакцин или препаратов крови – ионообменный и молекулярной фильтрации. Они получают при введении ионных групп в сефадексы G-25 и G-50. Ионообменные сефадексы обладают высокой обменной емкостью и низкоспецифической адсорбцией, обеспечивают быстрое прохождение жидкости и хорошее разделение смеси белков. Наиболее часто для разделения биотехнологических продуктов используются следующие сефадексы:

- Анионообменные сефадексы: QAE-сефадекс, A-25, A-50 (QAE – аминоэтил-2-оксипропил аминоэтил); DEAE-сефадекс, A-25, A-50 (DEAE – диэтил-аминоэтил);
- Катионообменные сефадексы: SP-сефадекс, C-25, C-50 (SP-сульфопропил); CM-сефадекс, C-25, C-50 (CM-карбоксиметил).

УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИЯ НА МЕМБРАНАХ. *Ультрафильтрация* – процесс, с помощью которого смесь веществ различной молекулярной массы в жидкой фазе подвергается разделению при прохождении ее под давлением через мембраны, имеющие определенные размеры пор. Сегодня в биотехнологических исследованиях ультрафильтрация является общепринятым и доступным методом. Преимуществами этого метода является возможность обработки промышленных количеств биологического материала; относительно доступное оборудование; заданная температура, значения pH, необходимая концентрация компонентов могут поддерживаться на протяжении всего процесса; концентрация и очистка биологически активных компонентов; удаление балластных примесей различной природы и очистка от пирогенов. Несомненно, важным является возможность дополнительной стерилизующей фильтрации растворов через ультрафильтрационные мембраны, так как размер пор мембраны позволяет отделить микробную контаминацию. Необходимо также отметить, что данные мембраны обладают минимальной адсорбционной активностью, просто регенерируются и могут быть использованы неоднократно. Кроме того, процесс не обладает значительной энергоемкостью. Молекулы вещества, подвергаемого ультрафильтрации (молекулы размером до 100 нм), микрофильтрации (молекулы

кулы размером от 100 нм до 10000 нм) практически полностью сохраняют нативность структуры: отсутствие изменений агрегатного состояния и фазовых превращений. Эффективность фракционирования ультрафильтрацией может снижаться из-за воздействия ряда факторов:

- ✓ взаимодействие макромолекул с образованием пограничного слоя повышенной концентрации на границе раздела между мембранной и фильтруемым раствором;

- ✓ взаимодействие системы «мембрана – растворенное вещество».

Появление пограничного слоя обусловлено концентрационной поляризацией, которая происходит в результате значительной потери растворителя из раствора на границе его раздела с мембраной. Вследствие взаимодействий системы «растворенное вещество – мембрана» этот пограничный слой иногда необратим и образует слой геля, который видоизменяет поверхность мембраны. При разделении белковых молекул обнаружено, что для разделения фракций двух белков их молекулярные массы должны различаться не менее чем на порядок. Благодаря тангенциальному потоку и его «смывающим» усилиям осевшие на мембране молекулы белка и вещества могут иметь более или менее одинаковую ориентацию. Именно тангенциальный поток нивелирует трансмембранный поток молекул растворенного вещества. Принцип работы разделительных аппаратов следующий: из емкости А рабочая смесь, подаваемая насосом, циркулирует по замкнутому контуру через ультрафильтрационные мембраны или полые волокна разделительных аппаратов и, обогащенная малопроникающим компонентом, возвращается в емкость А. При значительном снижении проницаемости полых волокон производится промывка разделительного аппарата обратным током. Рабочее давление при ультрафильтрации создается подпорным вентилем и контролируется по манометру. Во время работы аппаратов максимальное рабочее давление не должно превышать 0,2 МПа.

Сегодня рынок ультрафильтрационного и микрофильтрационного оборудования насыщен и предлагает широкий выбор продукции в зависимости от целей, поставленных производителем биологических продуктов. Хорошо зарекомендовала себя фирма «Spectrum» (США), производящая мембраны полисульфона и полиэтилсульфона для ультрафильтрации, микрофильтрации и обратноосмотической фильтрации (диализ). «Spectrum» выпускает более 2000 наименований, в том числе мембраны с порогом отсека от 10 кДа до 400 кДа, мембраны с величиной пор 0,1; 0,2 и 0,5 мкм различных объемов с использованием различных методов стерилизации. В России производят широкий спектр полых волокон, изготовленных из ароматических полиамидов и нецеллюлозных материалов – полисульфона, фторопласта, полисульфонида.

ИЗБИРАТЕЛЬНАЯ АДСОРБЦИЯ. Проводится с целью адсорбции индивидуальных белков на органических и минеральных адсорбентах. Обычно используется как вспомогательная технологическая стадия. Адсорбция зависит от температуры, величины рН, ионной силы, химической структуры вещества и т.д. Адсорбция может быть применена для очистки целевого продукта на балластных примесях и для извлечения искомого компонента.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ (ПЭГ). Предложены схемы фракционирования белков ПЭГ с относительной молекулярной массой 4000–6000. Интерес к этому методу связан с тем, что фракционирование можно проводить при положительной температуре, и опасность денатурирующего воздействия на белки значительно меньше, чем при использовании для осаждения органических осадителей. Сложным является удаление ПЭГ из конечных растворов белков, которые были бы быть приемлемы в производственных условиях.

ОСАЖДЕНИЕ В ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКЕ. Молекулы белков содержат как кислотные, так и щелочные группы, которые, диссоциируя, определяют их потенциал. Прибавление кислоты к раствору сопровождается увеличением положительно заряженных молекул за счет снижения диссоциации групп, создающих отрицательный заряд. Щелочь, напротив, подавляет диссоциацию групп, придающих положительный заряд, и вся молекула увеличивает свою отрицательную заряженность. Можно достигнуть равновесия в диссоциации этих групп, и молекула будет обладать нулевым зарядом. Такое состояние молекулы, при котором количество положительно заряженных групп равно количеству отрицательных, т.е. когда заряд отсутствует, называется изоэлектрическим. В изоэлектрической точке (значение рН) белок обладает минимальной растворимостью. Использование изменения рН до величины, соответствующей изоэлектрической точке, позволяет разделить белки с различными изоэлектрическими точками путем фракционированного осаждения. Путем изменения рН сложную смесь белков разделяют на фракции, содержащие различные белки. Примером может служить осаждение белковых токсинов и анатоксинов при производстве вакцин.

АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ. Метод основан на взаимодействии лиганда, фиксированного на частицах носителя с аффинным компонентом с образованием прочного комплекса. Аффинная хроматография может использоваться для очистки антител, антигенов (токсинов и анатоксинов), ферментов и других биологически активных молекул. Хроматография позволяет выделять высокоочищенные продукты. Аффинная хроматография может обеспечить избирательную очистку компонентов вакцин. Так, например, с помощью моноклональных антител предложено выделение и очистка поверхностного антигена гепатита В (HBsAg). В качестве носителя используют нерастворимые компоненты – декстрановые, агарозные, полиакриламидные гранулированные гели. По данным литературы, агароза является наиболее перспективным материалом для гелей, который укрепляют путем сшивок. Хроматография, основанная на взаимодействии антигенов (гапгенов) и антител, получила название иммуноаффинной хроматографии.

ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ И СЕПАРИРОВАНИЕ. Центрифугирование (сепарирование) используется при производстве вакцин на многих этапах: отделение биомассы от культуральной жидкости; отделение специфических белковых токсинов в процессе очистки; отделение растворов от сорбентов и др. *Центрифугирование* – разделение неоднородных систем и осаждение взвешенных в жидкости микроорганизмов, белковых частиц под действием центробежных сил. Центрифугу используют в случае невозможности процесса фильтрации и необходимости быстрого и непрерывного процесса разделения. Эффективность центрифугирования повышается при увеличении диаметра частиц в суспензии, разности между плотностью частиц и плотностью окружающей жидкости, уменьшении вязкости жидкости, повышении угловой скорости вращения ротора, радиуса центрифугирования, увеличении объема жидкости и уменьшения толщины слоя жидкости, подвергнутой центрифугированию. Основной характеристикой центрифуг является безразмерный фактор разделения (Fr), определяемый как:

$$Fr = \frac{W \cdot R}{g},$$

где W –угловая скорость течения жидкости;
 R –радиус барабана;
 g – ускорение поля тяжести.

Существуют два класса центрифуг по фактору разделения:

- нормальные (Fr менее 3500);
- суперцентрифуги (Fr более 3500).

Наиболее часто для получения вакцинных препаратов используются суперцентрифуги со скоростью вращения ротора от 15000 до 90000 об/мин. При работе суперцентрифуги суспензия через сопло питающей трубы подается в нижнюю часть ротора и, вращаясь вместе с ротором, протекает вдоль его стенок в осевом направлении. По мере продвижения вдоль ротора суспензия расслаивается в соответствии с плотностью её составных частей. При этом из жидкости выделяются твердые частицы, находящиеся во взвешенном состоянии, и осаждаются на стенках ротора, центрифуга через верхнее отверстие в головке ротора выводится в сливную камеру, а затем в сборник. Благодаря отсутствию резких изменений направления движения жидкости и турбулентных завихрений устраняется возможность попадания частиц обратно в суспензию. Центрифуги, имеющие высокий фактор разделения (до 12000 об/мин) и оснащенные тарельчатым барабаном, называют сепараторами. Сепараторы позволяют осуществлять центробежные разделения жидкости с наибольшей полнотой извлечения отдельных компонентов. По технологическому назначению сепараторы делят на три основных класса: сепараторы-разделители, применяемые для выделения жидкостей, нерастворимых одна в другой, или концентрирования суспензий и эмульсий; сепараторы-осветлители, предназначенные для выделения твердых частиц из жидкости; комбинированные сепараторы – для выполнения двух или более операций переработки жидкости. Подача исходной культуральной жидкости в барабан производится сверху по неподвижной осевой трубке, откуда она через распределитель поступает в набор тарелок, где происходит отделение твердых частиц. Твердые частицы отбрасываются радиально в направлении действия центробежных сил, ударяются снизу об одну из конических тарелок, соскальзывают к краю тарелки и выбрасываются из межтарельчатого пространства в расположенные по периферии карманы, где и происходит их накопление. Осветленная жидкость поднимается к горловине барабана и выгружается с помощью напорного диска. Сегодня высокопроизводительные сепараторы и суперцентрифуги выпускают известные мировые производители: «Вестфалия», «Альфа-Лаваль» и др. При подборе необходимого оборудования определяющими моментами является состав разделяемой суспензии, необходимое время проведения процесса, температура сепарирования, возможность стерилизации оборудования и проведения процесса в асептических условиях.

ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ В ГРАДИЕНТЕ ПЛОТНОСТИ. *Очистка центрифугированием в градиенте плотности* – скорость седиментации (т.е. осаждения и отделения друг от друга) частиц в центробежном поле зависит от размера и форм частиц. Лучшее выделение частиц, характеризующихся одинаковой скоростью седиментации, может быть достигнуто, если центрифугирование производится в градиенте плотности. При этом проявляются два положительных свойства метода: зоны стабилизируются против деформации под воздействием конвекции, в качестве дополнительного параметра разделения в систему вводится так называемая плавучая плотность частицы. В градиенте плотности частицы продолжают оседать до тех пор, пока не достигнут своей изопикнической плотности. До того, как они достигнут этого уровня в градиенте, сепарация будет происходить согласно скорости седиментации данного размера, плавучей плотности частиц и, в меньшей степени, формы частиц. Для разделения в градиенте плотности используются различные вещества, например, Фиколл, представляющий собой синтетический высокомолекулярный сополимер сахарозы и эпихлоргидрина с молекулярной массой 400000; сахароза, хлористый цезий и другие.

ФИЛЬТРАЦИЯ СТЕРИЛИЗУЮЩАЯ. Данный вид фильтрации является обязательным этапом производства биологических препаратов. Причем стерилизующая фильтрация для большинства препаратов проводится не только на конечном этапе, но и на многих технологических стадиях при производстве. Это касается в первую очередь вакцинных препаратов, препаратов крови человека и животных, фагов и т.д. По технологическому назначению фильтры можно разделить на две группы: глубинные фильтры и фильтры мембранные. Глубинные фильтры состоят из волокон, частиц или фрагментов, образующих единую массу, в которой имеются извилистые каналы или поры. Размеры пор варьируют и намного превышают размеры задерживаемых частиц. Фильтрующий эффект в этом случае обеспечивается суммарным действием различных факторов. К глубинному типу относятся целлюлозные пластины, керамические свечи, мелкопористое стекло и т.д. Глубинные фильтры имеют высокую поглотительную способность, т.к. различные биочастицы и микроорганизмы накапливаются в их матриксе. При подборе глубинных фильтров необходимо учитывать адсорбцию биологических веществ на матриксе фильтров (снижение титра антител в препаратах крови и потерю определенного количества антигена) и возможность попадания в профильтрованный раствор фильтрующего мате-

риала, что недопустимо, особенно на завершающей стадии производства вакцин или других биопрепаратов, вводимых путем инъекции. Мембранные фильтры для стерилизующей фильтрации характеризуются одинаковыми отверстиями с равномерным распределением по поверхности фильтра. Они обладают высокой эффективностью, так как задерживают контаминирующие частицы, размеры которых превышают размер пор фильтрующего материала, и имеют незначительную адсорбционную способность по сравнению с глубинными фильтрами (их толщина около 150–200 мкм). Полную стерильность обеспечивают мембранные фильтры, полученные в основном из очищенных эфиров целлюлозы (нитроцеллюлоза, ацетилцеллюлоза) и имеющие размер пор около 0,22 мкм. Фильтры для стерилизующей фильтрации выпускают и из других материалов (винильные полимеры, полиамиды, фторуглеродороды). Предлагаемые фильтры за счет высокой пористости и малой толщины обеспечивают низкое сопротивление течению жидкости (или газов) и тем самым способствуют высокой пропускной способности. Указанные фильтры устойчивы по отношению к фильтруемым материалам и, что крайне важно, выдерживают стерилизацию паром. В настоящее время фильтры для стерилизующей фильтрации выпускают «Миллипор», «Палл», «Кюно», «Сарториус» и др. Выпускаются также фильтры из фарфора, поликарбоната, на основе тетрафторэтилена. Все шире внедряются в фармацевтическую практику фильтры с величиной пор около 0,1 мкм. Стерилизующая фильтрация является одной критических точек производства биопрепаратов и, бесспорно, должна быть валидирована путем подбора оптимальных условий фильтрации и фильтров для конкретного вакцинного препарата. Обычно препарат подвергают стерилизующему фильтрованию через предфильтр и, при необходимости, через каскад мембран с уменьшением по ходу протока размеров пор: 1,2; 0,8; 0,65; 0,45; 0,22 мкм.

ДЕЗИНТЕГРАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. Для выделения некоторых антигенов, находящихся в биологических структурах клеток микроорганизмов, например, бактерий коклюша, первоочередной задачей является разрушение клеточной оболочки – *дезинтеграция*. Разрушение клеточной оболочки происходит при достижении в ней механических напряжений, равных пределу прочности оболочек. Наиболее эффективными методами разрушения клетки являются методы экструзионной и ультразвуковой дезинтеграции. Экструзия – это разрушение клеток бактерий за счет взаимодействия их с однородно движущейся средой при возникновении попереч-

ных градиентов скорости и неоднородного распределения давления. При гомогенизации под высоким давлением концентрированную клеточную суспензию продавливают через небольшое отверстие под высоким давлением, а затем давление резко сбрасывают, что и вызывает лизис. Еще один механизм разрушения клеток – соударение. Клеточную суспензию большой вязкости направляют под давлением на неподвижную поверхность или навстречу потоку другой суспензии. Вместе соприкосновения выделяется большое количество энергии, разрушающей клетки. При этом сохраняется структура биологически активных молекул, т.к. однократное силовое воздействие на целые оболочки клеток происходит практически без выделения тепла. Ультразвуковая дезинтеграция происходит за счет явления кавитации. Кавитация – физическое явление, вызываемое при действии ультразвука возникновение высокоградиентных микропотоков, ударных волн, локальных скачков давления и температуры. Частота и интенсивность ультразвука должны быть не менее 20 кГц. Разрушение клеток можно проводить методом замораживания-оттаивания, при котором осуществляют многократно чередующиеся операции замораживания и оттаивания бактериальных клеток, или с помощью обработки ферментами, например, лизоцимом и протеазой. Одним из методов, применяемых при выделении антигенных компонентов, является обработка бактерий детергентами – полярными соединениями, содержащими гидрофобные и гидрофильные компоненты. Взаимодействие этих соединений с компонентами клеточной мембраны способствует переходу в раствор поверхностных антигенов. Возможно несколько механизмов взаимодействия детергентов с бактериальными клетками: нарушение проницаемости клеточной мембраны; лизис клеток в результате связывания детергентов с ионогенными группами клеточных мембран; денатурация клеточных белков и нарушение функционирования клеточных ферментов. Для обработки бактерий используют детергенты: анионогенные (дезоксихолат и лаурилсульфат), катионогенные (цетавлон) и неионогенные (твин).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агеев Е.П. Мембранные процессы разделения. Критическая технология. Мембраны / Е.П. Агеев. – М., 2001. – С. 42–56.
2. Алебян Г.П. Биотехнологические способы получения оптических изомеров аланина / Г.П. Алебян, А.О. Амбарцумян, А.С. Папоян. – Биотехнология, 2008. № 1. – С. 29–45.
3. Алексеев В.И. Прикладная молекулярная биология / В.И. Алексеев, В.А. Каминский. – М.: Комкнига, 2005. – 200 с.
4. Баурина М.М. Разработка основ технологии получения панкреатического гидролизата дрожжевой РНК: Автореф. дис. на соиск. уч. степ. к. хим. н. / М.М. Баурина. – М.: 2007. – 16 с.
5. Баурина М.М. Способ получения и характеристика иммунокорратора нуклеинового ряда / М.М. Баурина, А.А. Красноштанова, Ю.М. Краснопольский. – Нейроиммунология, 2003. Т. 1. № 2. – С. 18–19.
6. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биотехнологической инженерии. В 2-х частях / Дж. Бейли, Д. Оллис. – М.: Мир, 1989. – 562 с.
7. Бергельсон Л.Д. Препаративная биохимия липидов / Л.Д. Бергельсон, Э.В. Дятловицкая, Ю.Г. Молотковский. – М.: Наука, 1981. – 260 с.
8. Бочарова Н.Н. Микрофлора дрожжевого производства / Н.Н. Бочарова. – М.: Мир, 1995. – 231 с.
9. Венгерровский А.И. Средство на основе природных фосфолипидов / А.И. Венгерровский, В.А. Хазанов. – РФ. Авторское свидетельство № 2367443, 2009.
10. Воронин Е.С. Биотехнология / Е.С. Воронин. – Санкт-Петербург: Гиорд, 2008. – 703 с.
11. Галынкин В.А. Фармацевтическая микробиология / В.А. Галынкин, В.А. Заикина, В.И. Кочеровец. – М.: Арнебия, 2003. – 252 с.
12. Глеба Ю.Ю. Клеточная инженерия растений / Ю.Ю. Глеба, К.М. Сытник. – Киев: Наукова думка, 1984. – 220 с.

13. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 590 с.

14. Дейнеко Е.В. Генетически модифицированные растения – продуценты рекомбинантных белков медицинского назначения / Е.В. Дейнеко. // Вестник Томского государственного университета. Биология, 2012. № 2 (18). – С. 41–51.

15. Державна фармакопея України. Первое издание. – Харьков, 2001. – 530 с.

16. Державна фармакопея України. Первое издание. Дополнение 2. – Харьков, 2008. – 617 с.

17. Дорохов Ю.Л. Способ суперпродукции в растении антител против онкогена HER2/neu / Ю.Л. Дорохов. – Патент РФ № 2370280, 2009.

18. Драйпер Дж. Генная инженерия растений / Дж. Драйпер, Р. Скотт, Ф. Армитидж. – М.: Мир, 1991. – 260 с.

19. Егорова Т.А. Основы биотехнологии / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2003. – 208 с.

20. Ефременко В.И. Способ выделения и очистки фосфолипидов / В.И. Ефременко, В.В. Оверченко, Е.Н. Масетова. – РФ. Авторское свидетельство № 2192265, 2002.

21. Железнов С.А. Получение, фракционирование и идентификация пищевых растительных фосфолипидов: Автореф. дис. на соиск. уч. степ. к. техн. н. / С.А. Железнов. – М.: 2002. – 24 с.

22. Земсков А.М. Иммунокоррегирующие нуклеиновые кислоты и их клиническое применение / А.М. Земсков, В.Г. Передерий, В.М. Земсков. – Киев, Здоровье, 1994. – 232 с.

23. Каплун А.П. Получение и применение иммобилизованных полярных липидов / А.П. Каплун, Н.Б. Якунина, В.И. Швец. – Биотехнология, 2010. № 3. – С. 36–39.

24. Карабельский А.В. Изучение факторов, влияющих на секрецию и биологическую активность химерного белка «альбумин – интерферон- $\alpha 1$ », синтезируемого дрожжами *Pichia pastoris*: Автореф. дис. на соиск. уч. степ. к. б. н. / А.В. Карабельский. – Санкт-Петербург: 2010. – 18 с.

25. Катлинский А.В. Курс лекций по биотехнологии / А.В. Катлинский, Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов. – М.: Изд-во Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова, 2005. – 150 с.

26. Клящицкий Б.А. Препаративное выделение анионных фосфолипидов из природных источников с использованием хроматографии на адсорбентах, содержащих первичные аминогруппы / Б.А. Клящицкий, И.В. Межова, Ю.М. Краснопольский. – Биотехнология, 1989. Т. 5. № 1. – С. 27–36.

27. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Бионанотехнология в фармации и медицине: Учебное пособие / Ю.М. Краснопольский, А.С. Дудниченко, В.И. Швец. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2011. – 228 с.

28. Краснопольский Ю.М. Липидная технологическая платформа для создания новых лекарственных форм и транспорта фармацевтических субстанций / Ю.М. Краснопольский, А.Е. Степанов, В.И. Швец. // Биофармацевтический журнал, 2011. Том 3. № 2. – С. 10–18.

29. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов: Учебное пособие / Ю.М. Краснопольский, М.И. Борщевская. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2009. – 351 с.

30. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений / Л.А. Лутова. – Издательство Санкт-Петербургского Университета, 2010. – 240 с.

31. Мухачев С.Г. Изменение кислотности культуральной жидкости при выращивании инокулята и посевного материала в производстве лизина / С.Г. Мухачев, Ю.П. Александровская, Д.В. Катков. – Биотехнология, 2007. № 1. – С. 65–74.

32. Нагорнов С.А. Техника и технология производства и переработки растительных масел / С.А. Нагорнов, С.А. Дворецкий, С.В. Романцова. – Тамбов: ГОУ ПВО ТГТУ, 2010. – 96 с.

33. Орлова И.В. Штамм суспензионной культуры растительных клеток / И.В. Орлова, И.Г. Семенов, Я.И. Бурьянов. – Патент РФ № 2227808, 2008.

34. Применение Ридостина для лечения вирусных и бактериальных инфекций и перспективы его использования при заболеваниях неинфекционной природы // Сборник материалов научной конференции – Бердск, 1998.– 90 с.

35. Прищеп Т.П. Основы фармацевтической биотехнологии / Т.П. Прищеп, В.С. Чучалин, К.Л. Зайков. – Ростов-на-Дону, Феникс, 2006.– 252 с.

36. Промышленная технология лекарств: В 2-х томах / под ред. В.И. Чуешова. – Харьков: НФАУ, МТК-книга, 2002. Т. 1.– 557 с.; Т. 2.– 714 с.

37. Сернов Л.Н. Биотехнологический цитохром С / Л.Н. Сернов, В.В. Береговых, Е.П. Давидов. – М.: Антекс, 1997.– 239 с.

38. Спиридонова Е.В. Динамика изменений генома каллусных тканей раувольфии змеиной при переводе в условиях глубинного культивирования / Е.В. Спиридонова, Д.М. Адноф, Н.О. Андреев. // Цитология и генетика, 2008. № 2.– С. 35–41.

39. Степанов А.Е. Физиологически активные липиды / А.Е. Степанов, Ю.М. Краснополянский, В.И. Швець. – М.: Наука, 1991.– 136 с.

40. Тонеева-Давыдова Е.Г. Способ получения бета-глюканов клеточной стенки дрожжей / Е.Г. Тонеева-Давыдова. – Заявка РФ 2002130728/13, 2002.

41. Ткачук З. Экспериментальное исследование кардиопротективной активности рибонуклеиновой кислоты при катехоламиновом инфаркте миокарда / З. Ткачук, Л. Чайка, В. Либина. // Вісник фармакології та фармації, 2009. № 3.– С. 14–19.

42. Фаттахов С.Г. Мелафен в качестве регулятора роста для увеличения накопления берберина в клеточной культуре василистника малого / С.Г. Фаттахов, Т.А. Савина, В.С. Руник. – Патент РФ № 2323972, 2006.

43. Фукс Б.Б. Способ получения рибонуклеотидов / Б.Б. Фукс, М.Е. Шабанова, С.Н. Федоров, Ю.М. Краснополянский, У.Я. Микстайс, Е.Д. Ермолаев, М.А. Гайлума. – Авторское свидетельство № 1575359, 1988.

44. Швець В.І. Одержання очищеного лецитину / В.І. Швець, Г.А. Сенніков, Ю.М. Краснополяський. // Фармацевтичний журнал, 1977. № 4.– С. 79–81.

45. Швець В.И. Фосфолипидсодержащие препараты для лечения лекарственных осложнений / В.И. Швець, Ю.М. Краснополянский, И.Г. Сенникова. // Провизор, 2007. № 24.– С. 24–26.

46. Эль-Регистан Г.И. Технология автолиза дрожжей: В кн. Биотехнология биологически активных веществ / Г.И. Эль-Регистан, Н.Г. Иванова. – М.: Элевар, 2006.– С. 225–228.

47. Ямковая Т.В. РНК из пекарских дрожжей, выделение, фракционирование, биологическая активность: Дис. на соиск. уч. степ. к. б. н. / Т.В. Ямковая. – М.: 2007.– 127 с.

48. Ямковая Т.В. Способ получения высокополимерной РНК из дрожжей / Т.В. Ямковая, С.Н. Загребельский, Л.Е. Панин – Заявка 2008112844/13, 2008.

49. Apeler H. Expression, purification, biochemical, biochemical and pharmacological characterization of a recombinant aprotinin variant / H. Apeler, J. Peters, W. Schroder. // Drug Res, 2004. Vol. 54. N 8.– P. 483–497.

50. Mason H.S. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants / H.S. Mason, D.M. Lam, C.J. Arntzen. – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992. Vol. 89.– P. 11745–11749.

51. Paul M. Plant-made pharmaceuticals: Leading products and production platforms / M. Paul, J. Ma. – International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc. 2011. Vol. 58. N 1.– P. 58–67.

Навчальне видання

КРАСНОПОЛЬСЬКИЙ Юрій Михайлович
КЛЕЩЕВ Микола Федосович

**ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ:
ВИРОБНИЦТВО БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН**

Навчальний посібник
для студентів (у т. ч. іноземних)
біотехнологічного напрямку

Російською мовою

У двох частинах

ЧАСТИНА II

Роботу до видання рекомендувала *М. Г. Зінченко*
В авторській редакції
Комп'ютерне верстання *Л. В. Северіна*

План 2013 р., поз. 39

Підп. до друку 25.12.2012. Формат 60 × 84 1/16. Папір офісний.
Riso-друк. Гарнітура Таймс. Ум. друк. арк. 11,2. Наклад 100 прим.
Зам. №79. Ціна договірна.

Видавничий центр НТУ „ХПІ”.
Свідоцтво про державну реєстрацію ДК № 3657 від 24.12.2009 р.
61002, Харків, вул. Фрунзе, 21

Друкарня НТУ “ХПІ”, 61002, Харків, вул. Фрунзе, 21