

«нет ничего более практичного, чем
хорошая теория»

кто-то из великих физиков
Планк или Эйнштейн.

Введение в современную биотехнологию БИООБЪЕКТ

2-е место по инвестиционной
привлекательности после
информационных технологий

Биотехнология (БТ) - научно-практический приоритет 21 века

- постгеномные технологии:
 - геномика, протеомика,
 - биоинформатика,
- метоболомика
- нанобиотехнологии.
- проект «Антропогеномика» - создание генетических паспортов для спортсменов и др. пилотных групп населения.
- проекты по биоразнообразию, биобезопасности и биокатализу
- Медицинские БТ
 - создание жизненно важных ЛП (гормоны, цитокины, биодженерики, терапевтические МАТ, вакцины нового поколения),
 - развитие технологий стволовых клеток.
- В сельском хозяйстве - развитие трансгенных растительных и животных культур.
- В пищевой БТ - разработки для функционального, сбалансированного питания, в т.ч. отдельный проект по биотехнологии морепродуктов.
- В экологической БТ - восстановление агроландшафтов и создание экологически чистого жилья.
- Проект «Биочипы» - создание оригинальных биочипов для исследований в геномике и протеомике и диагностике.

Термин

Карл Эреки 1917 –

(процесс промышленного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы).

Биотехнология – это все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты.

- описание процессов промышленной ферментации,
- область, именуемая сейчас эргономикой.

Биотехнология – это направление научно-технического прогресса, использующее биологические процессы и агенты для целенаправленного воздействия на природу, а также в интересах промышленного получения полезных для человека *продуктов*, в том числе и лекарственных препаратов.

Биотехнологические продукты

1. Вакцины и сыворотки
2. Антибиотики
3. Ферменты и антиферменты
4. Гормоны и их антагонисты
5. Витамины (B_{12})
6. Аминокислоты
7. Кровезаменители
8. Алкалоиды
9. Иммуномодуляторы
10. Биорадиопротекторы
11. Иммунные диагностикумы и биосенсоры

История биотехнологии

I Эмпирический период – ок. 6000 лет

до Р.У. и до середины XIX в.

воспроизведение естественных процессов в искусственных условиях:

хлебопечение,

выделка кожи,

получение льна,

натурального шелка,

силосование кормов для скота,

изготовление кисломолочных продуктов, сыров, квашенной капусты,

Виноделие

Пивоварение

биотехнологические приемы Фармации и медицины :

Яды животных и растений,

Желчь и другие биожидкости,

настойка из коры хинного дерева для купирования лихорадочных приступов при малярии,

гирудотерапия,

апитерапия

растительные опиаты и алкалоиды,

*профилактика натуральной оспы
содержимым пустул телят, больных коровьей оспой*

и мн. др. в основе современной профилактической и клинической медицины.

II – Научно-практический период (1856-1933 годы)

Л. Пастер – основоположник научной микробиологии и ее дисциплин (промышленной, медицинской, химической и санитарной микробиологии).

- установил микробную природу процессов брожения,
- доказал анаэробный путь метаболизма и возможности жизни в бескислородных условиях,
- научные основы вакцинопрофилактики и вакцинотерапии (**иммунология**),
- метод стерилизации (Пастеризация).

де Бари – основоположник микологии, основа современных классификационных схем макро и микромицетов.

Д.И. Ивановский - 1892 г вирус табачной мозаики, после открыты другие вирусы = вирусология

Важнейшие достижения:

- доказана видовая индивидуальность микробов
- Микроорганизмы выделены в чистых культурах и размножены и выращены на питательных средах для воспроизведения природных процессов (брожения, окисления и пр.)
- начато изготовление пищевых прессованных дрожжей,
- Получены бактериальные метаболиты (ацетон, бутанол, лимонная и молочная кислоты).
- созданы биоустановки для микробиологической очистки сточных вод.

III – Биотехнический период 1933-1972 гг

«Методы изучения обмена веществ у плесневых грибов» (А. Клюйвер, Л.Х.Ц. Перкин)

начало промышленной биотехнологии:

1. технические приемы внедрения в производство крупномасштабного герметизированного оборудования, обеспечивающего проведение процессов в стерильных условиях.
2. методические подходы к оценке и интерпретации получаемых результатов при глубинном культивировании грибов.

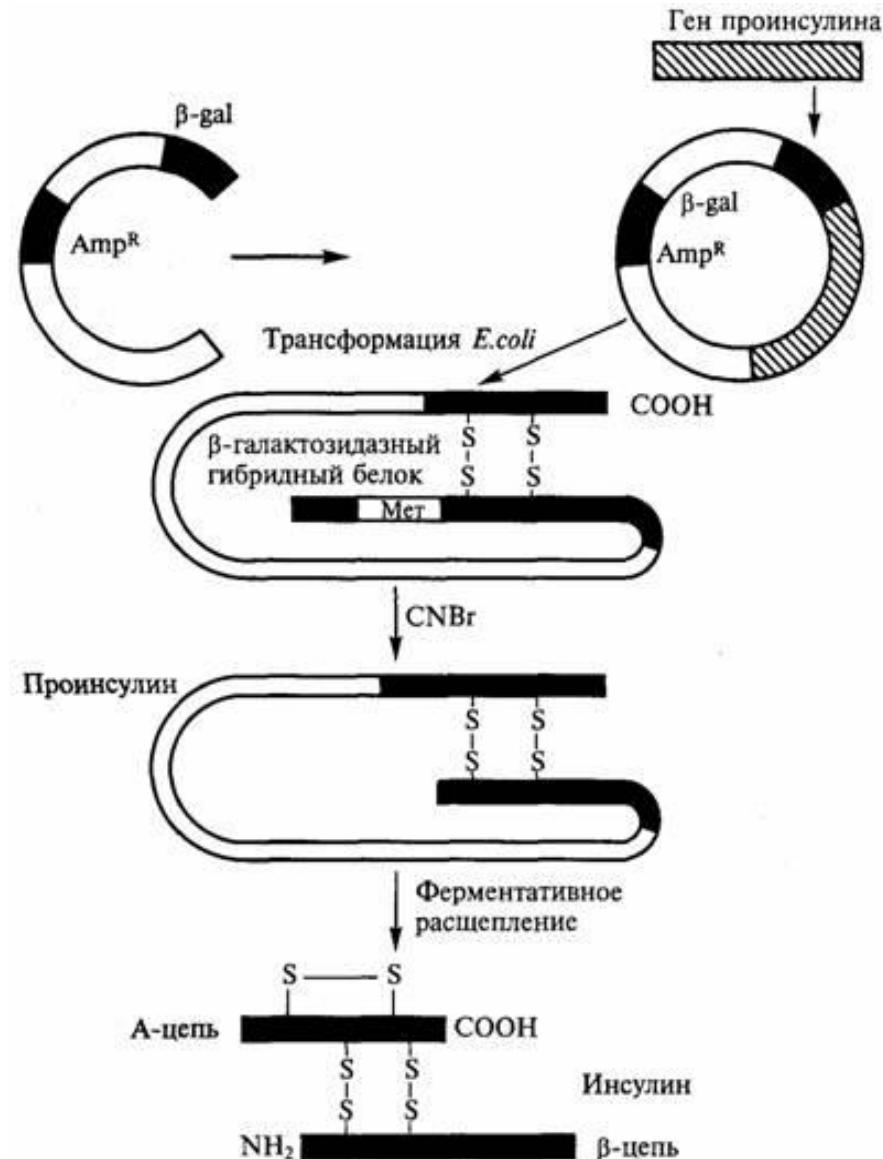
1939-1945 гг становление и развитие производства антибиотиков.

За 40 лет решены основные задачи по

- конструированию, созданию и внедрению в практику промышленного оборудования в том числе биореакторов.

IV – молекулярный или гентехнический период

- **1972 г** - первая рекомбинантная молекула ДНК (П. Берг с сотрудниками, США).
- **1982 г** коммерческий генноинженерный человеческий инсулин.
- Другие генноинженерные препараты:
 - интерфероны,
 - фактор некроза опухоли (TNF),
 - интерлейкин-2,
 - соматотропный гормон человека.



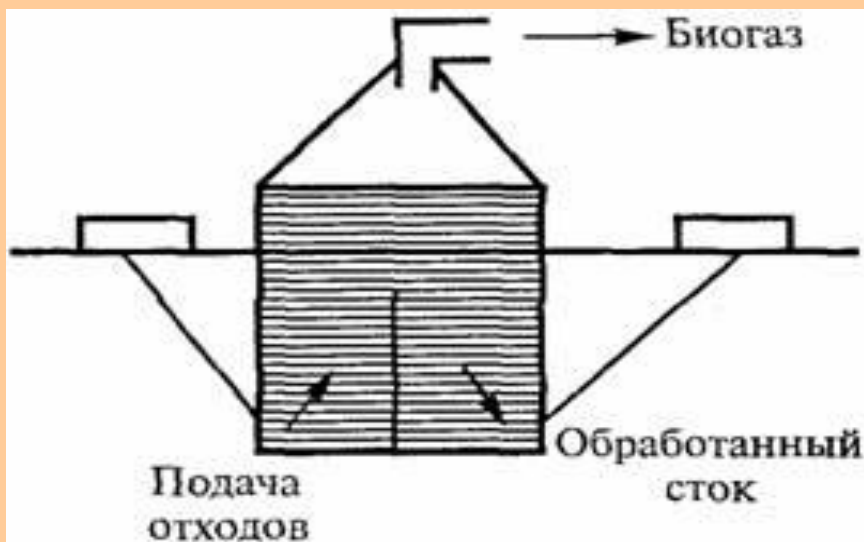
Основные направления биотехнологии

Биоэнерготехнология

Биотопливные элементы превращают химическую энергию субстратов в другие виды энергии

получение источников энергии – биогаза, углеводов.

производство водорода, с помощью хемотрофных и цианобактерий, водорослей, некоторых простейших



Биосенсоры – высокочувствительные искусственные элементы биологической природы, способные распознавать микроколичества веществ в любом агрегатном состоянии .

- биологические молекулы избирательно взаимодействуют с микроколичествами химических веществ, изменения которых регистрируются и визуализируются электронной аппаратурой.
- датчики аналитических приборов в промышленности, сельском хозяйстве, медицине, охране окружающей среды для выявления углеводов, мочевины, лактата, креатинина, этанола, аминокислот и др. веществ.

Космическая биотехнология –

Невесомость - изменение течения физико-химических процессов:

- снижение конвекции,
- исключение седиментации,
- силы поверхностного натяжения больше гравитационных,
- исключение пристеночных явлений (протекание процессов без емкостей).
- легче создать условия для кристаллизации белков в чистом виде для различных целей и для рентгеноструктурного анализа.
- легче инкапсулировать клетки в полупроницаемые мембраны,
 - например клетки поджелудочной железы животных, для последующей имплантации больным сахарным диабетом, где они будут синтезировать инсулин,
 - инкапсулированные клетки печени можно использовать для создания искусственных органов для очистки крови.

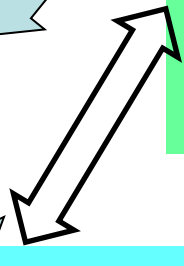
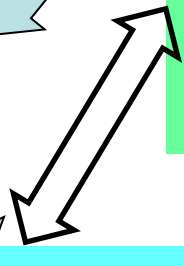
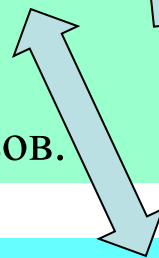
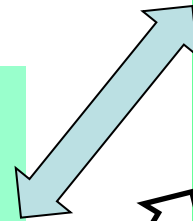
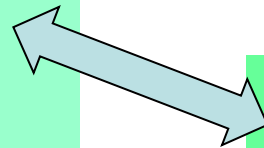
• **Биогеотехнология** – использование микроорганизмов для добычи полезных ископаемых, получение редкоземельных металлов, удаление метана в шахтах и т.п.

• **Инженерная энзимология** – использование каталитических функций ферментов в изолированном состоянии или в составе клеток для получения разнообразных продуктов.

• **Медицинская биотехнология** – создание средств или/и веществ медицинского назначения, препаратов крови, трансплантантов и биопротезов.

• **Биотехнология лекарственных средств** – из более 1000 наименований лекарственных средств, минимум треть производится или может быть произведено биотехнологически.

• **Иммунобиотехнология** – производство вакцин, иммуноглобулинов крови, иммуномодуляторов, моноклональных антител и т.п.



Возможности

1. точная и ранняя диагностика, профилактика и лечение инфекционных и генетических заболеваний;
2. повышение урожайности сельхоз. культур путем создания растений устойчивых к вредителям, болезням и неблагоприятным условиям окружающей среды;
3. создание микроорганизмов продуцирующих различные БАС (антибиотики, полимеры, аминокислоты, ферменты);
4. создание пород сельхоз животных с улучшенными наследуемыми признаками;
5. переработка токсичных отходов – загрязнителей окружающей среды

Проблемы

- влияние генноинженерных организмов на другие организмы или окружающую среду;
- уменьшение природного генетического разнообразия при создании рекомбинантных организмов;
- Изменение генетической природы человека с помощью генноинженерных методов;
- нарушение права человека на неприкосновенность частной жизни при применении новых диагностических методов;
- доступность лечения только богатым с целью получения прибыли;
- Помехи свободному обмену мыслями между учеными в борьбе за приоритеты

Взаимосвязь технологии и живого

Технология – воспроизведение естественных процессов, в искусственных условиях

Промышленное производство

Биореактор и инженерные системы жизнеобеспечения

биокаталитические
биосинтетические

биообъект –
основа биотехнологии

в живых клетках
про- и эукариот

животного

происхождения:

- Человек (донор)
- Млекопитающие рептилии, птицы, рыбы, насекомые, беспозвоночные

растительного
происхождения:

- Растения дикорастущие и культивируемые
- Водоросли

Микроорганизмы:

- Эукариоты: простейшие, грибы, дрожжи
- Прокариоты: актиномицеты, зубактерии
- вирусы, фаги

Клеточные и тканевые культуры

инженерные модификации,
биомолекулы с информационной и функциональной активностью

Биообъекты: способы их создания и совершенствования.

1.1 Понятие «Биообъект» БО

Биообъект – центральный и обязательный элемент биотехнологического производства, определяющий его специфику

По производственным функциям:



Продуцент

- полный синтез целевого продукта, включающий ряд последовательных ферментативных реакций

Биокатализатор

катализ определенной ферментативной реакции (или каскада), которая имеет ключевое значение для получения целевого продукта

Классификационные подходы:

Макробиообъекты животного происхождения:

- Человек (донор)
- Человек (объект иммунизации, донор)
- Млекопитающие, рептилии, птицы, рыбы, насекомые, членистоногие, морские беспозвоночные

Биообъекты растительного происхождения:

- Растения (дикорастущие и плантационно культивируемые)
- Водорсли
- Культуры растительных клеток и тканей

Биообъекты – Микроорганизмы:

- Эукариоты (простейшие, грибы, дрожжи)
- Прокариоты (актиномицеты, зубактерии)
- вирусы,

Биообъект как участник технологического процесса

макро-био-объекты (человек, животные, растения):

высокоорганизованные живые системы, пластично приспособлены к абсолютно автономному существованию в условиях внешней среды
получение биомассы (ткани, биожидкости, клетки) происходит в природных условиях (плантационное культивирование ЛР, разведение змей, пчел, пиявок).

микро-био-объекты

не способны к автономному существованию во внешней среде, необходимо создать техногенную экологическую нишу для обеспечения:

1. условий для существования био-объекта в монокультуре;
2. экономически целесообразных темпов функционирования для получения необходимого количества биомассы;
3. защиты культуры-продуцента от внешних неблагоприятных факторов;
4. защиты культуры-продуцента от контаминации патогенной микрофлорой (*лизогенный фаг для коклюшных бактерий, онкогенные вирусы для вируса полиомиелита*);
5. защиты окружающей среды от выбросов патогенных штаммов- продуцентов (*при получении ксантана фитопатогенный *Xantomonas campestris*, при получении витамина B2 гриб *Eremothecium* – паразит хлопчатника*).

Биообъекты

1) Макромолекулы:

- **ферменты всех классов** (чаще гидролазы и трансферазы);
 - в т.ч. в иммобилизованном виде (связанные с носителем) обеспечивающем многократность использования и стандартность повторяющихся производственных циклов
- **ДНК и РНК** – в изолированном виде, в составе чужеродных клеток

2) Микроорганизмы:

- **вирусы** (с ослабленной патогенностью используются для получения вакцин);
- **клетки прокариоты и эукариоты**
 - продуценты первичных метаболитов: аминокислот, азотистых оснований, коферментов, моно- и дисахаров, ферментов для заместительной терапии и т. д.);
 - продуценты вторичных метаболитов: антибиотики, алкалоиды, стероидные гормоны, и др.
- **нормофлоры** – биомасса отдельных видов микроорганизмов применяемые для профилактики и лечения дисбактериозов
- **возбудители инфекционных заболеваний** – источники антигенов для производства вакцин
- **трансгенные м/о или клетки** – продуценты видоспецифичных для человека белковых гормонов, белковых факторов неспецифического иммунитета и т. д.

3) Макроорганизмы

- **сывороточные культуры** – сырье для получения БАВ:

Цели совершенствования БО:

(применительно к производству)

- увеличение образования целевого продукта;
- снижение требовательности к компонентам питательных сред;
- изменение метаболизма биообъекта, например снижение вязкости культуральной жидкости;
- получение фагоустойчивых биообъектов;
- мутации, ведущие к удалению генов, кодирующих ферменты.

Повышение активности биосинтеза, можно ожидать:

- если мутация привела к дуплекации (удвоению) структурных генов, включенных в систему синтеза целевого продукта;
- если мутация привела к амплификации (умножению) структурных генов, включенных в систему синтеза целевого продукта;
- если за счет разных типов мутаций будут подавлены функции репрессорных генов, регулирующих синтез целевого продукта;
- нарушение системы ретроингибирования;
- изменив (за счет мутаций) систему транспорта предшественников целевого продукта в клетку;
- суицидный эффект, иногда целевой продукт при резком увеличении его образования отрицательно влияет на жизнеспособность собственного продуцента
(часто необходимо для получения, суперпродуцентов антибиотиков).

Методы совершенствования БИООБЪЕКТОВ

- Цель: обеспечить сверхсинтез одного из продуктов метаболизма
- Задача: изменить систему регуляции обмена веществ
- Пути:
 - изменение генетической программы
 - изменение регуляторных систем метаболизма .
- Спонтанные изменения генетической природы организма — продуцента основаны на процессах рекомбинации генетического материала in vivo (амплификация, конъюгация, трансдукция, трансформация и пр.).
- Селекция - направленный отбор из природных популяций высокопродуктивных штаммов организмов со скачкообразным изменением геномов
 - «-» длительны (мутация интересующий ген должен удвоиться 10⁶—10⁸ раз.)
 - «+» перспективны для оценки влияния на объекты факторов среды — ионов тяжелых металлов, кислот, щелочей и др.
- индуцированный мутагенез - под действием ряда химических соединений (гидроксиламин, нитрозамины, азотистая кислота, бромурасил, 2-аминопурин, алкилирующие агенты и др.), рентгеновских и ультрафиолетовых лучей.

Многолетняя селекция штаммов-продуцентов пенициллина – увеличение удельной активности а/б в культуральной среде в 400 раз, Методами мутагенеза и селекции получены штаммы *Eremothecium ashbyii*, до 1,8 мг рибофлавина в 1 мл среды, и штаммы *Brevibacterium ammoniogenes*, до 1 г HSKoA на 1 л среды.

1.2. Совершенствование биообъектов методами мутагенеза и селекции

Мутация – изменение первичной структуры ДНК в конкретном участке, приводящая к изменению *фенотипа* БО.

Меняется *биосинтетическая* способность биообъекта вследствие изменения набора ферментов или активности некоторых из них.

Мутации – это первоисточник изменчивости организмов, создающий основу для эволюции

Выделение целевого продукта из «*дичка*» (природного организма) – экономически нецелесообразно или технически трудно.

- Изменение БО, благоприятное для его использования в производстве, передаваемое по наследству должно, вызываться *мутацией*.

Во второй половине XIX в. для микроорганизмов был открыт еще один источник изменчивости – перенос чужеродных генов – своего рода «*генная инженерия природы*».

Мутации: хромосомные - ядерные
цитоплазматические плазмидные



Селекция – отбор естественных желаемых отклонений вызванных мутациями

- Спонтанные мутации
 - встречаются редко,
 - разброс по степени выраженности признаков невелик.

- индуцированный мутагенез:
 - разброс мутантов по выраженности признаков больше.
 - появляются мутанты с пониженной способностью к реверсии, т.е. со стабильно измененным признаком

Мутации могут быть обусловлены:

перестройкой репликона (изменением в нем числа и порядка расположения генов);

изменениями внутри индивидуального гена.

спонтанные мутации возникающие в популяции клеток без специального воздействия на нее.

По выраженности почти любого признака клетки в микробной популяции составляют **вариационный ряд**.

Большинство клеток имеют среднюю выраженность признака.

Отклонения «+» и «-» от среднего значения встречаются в популяции



Мутагены

физические

- у/ф лучи;
- гамма – лучи;
- рентгеновские лучи;

химические

- нитрозометилмочевина;
- нитрозогуанидин;
- акридиновые красители;
- некоторые природные в-ва (ДНК-тропные а/б не применяемые в клинике в связи с токсичностью)

Механизм активности мутагенов обусловлен непосредственным воздействием на ДНК (прежде всего на азотистые основания ДНК, что выражается в сшивках, димеризации, алкилировании димеров, интеркаляции).

❖ селекционная часть работы - отбор и оценка мутаций

Обработанную культуру рассеивают на ТПС и выращивают отдельные колонии (клоны)

(Для высеивания клонов с разными особенностями метаболизма используют т. н. «метод отпечатков», разработанный Дж. Ледербергом и Э. Ледербергом)

клоны сравнивают с исходной колонией по разным признакам:
мутанты, нуждающиеся в конкретном витамине, или аминокислоте;
мутанты, синтезирующие фермент расщепляющий определенный субстрат;
антибиотикорезистентные мутанты

Геном мутанта претерпевает изменения, ведущие к потере определенного признака, или к возникновению нового признака.

Характер мутаций:

- дупликация (удвоение) структурных генов;
- амплификация (умножение) структурных генов;
- делеция («стирание»), «выпадение» части генетического материала;
- транспозиция (вставка участка хромосомы в новое место);
- инверсия (изменение) порядка расположения генов в хромосоме;
- «точечные» мутации, изменения в пределах только одного гена (например, выпадение или вставка одного или нескольких оснований):
- трансверсия (когда происходит замена пурина на пиримидин);
- транзиция (замена одного пурина на другой пурин или пиримидина на другой пиримидин).

Одним из самых блестящих примеров эффективности мутагенеза с последующей селекцией по признаку увеличения образования целевого продукта является история создания современных суперпродуцентов пенициллина.

Проблемы суперпродуцентов:

современный промышленный БО - это суперпродуцент, отличающийся от природного штамма как правило, по нескольким показателям.

высоко продуктивные штаммы крайне нестабильны вследствие того, что многочисленные искусственные изменения в геноме не связаны с жизнеспособностью.

мутантные штаммы требуют постоянного контроля при хранении: популяцию клеток высеивают на твердую среду и полученные из отдельных колоний культуры проверяют на продуктивность.

Ревертанты - штаммы с пониженной активностью отбрасывают.

Реверсия происходит в связи с обратными спонтанными мутациями, ведущими к возвращению участка генома в природное состояние.

Специальные ферментные системы репарации участвуют в реверсии к норме – в эволюционном механизме поддержания постоянства вида.

В отношении высших растений и животных возможности мутагенеза и селекции для совершенствования ограничены, но не исключены.

Особенно для растений образующих вторичные метаболиты.

1.3. Совершенствование биообъектов методами клеточной инженерии

Клеточная инженерия – «насильственный» обмен участками хромосом у прокариот или участками и даже целыми хромосомами у эукариот. В результате создаются неприродные биообъекты, среди которых могут быть отобраны продуценты новых веществ или организмы с ценными в практическом отношении свойствами.

С помощью клеточной инженерии возможно получение межвидовых и межродовых гибридных культур микроорганизмов, а также гибридных клеток между отдаленными в эволюционном отношении многоклеточными организмами.

Техника клеточной инженерии

(на примере микроорганизмов прокариот, с одной хромосомой в клетке)

I. Получение протопластов (клеток прокариот лишенные клеточной стенки) для обмена фрагментами хромосомы.

у прокариот – эубактерий, актиномицетов – клеточная стенка состоит из *пептидогликана* (поддерживает форму клетки и защищает ЦПМ от перепада осмотического давления между внешней средой и цитоплазмой)

Лизоцим расщепляет полисахаридные нити пептидогликана.

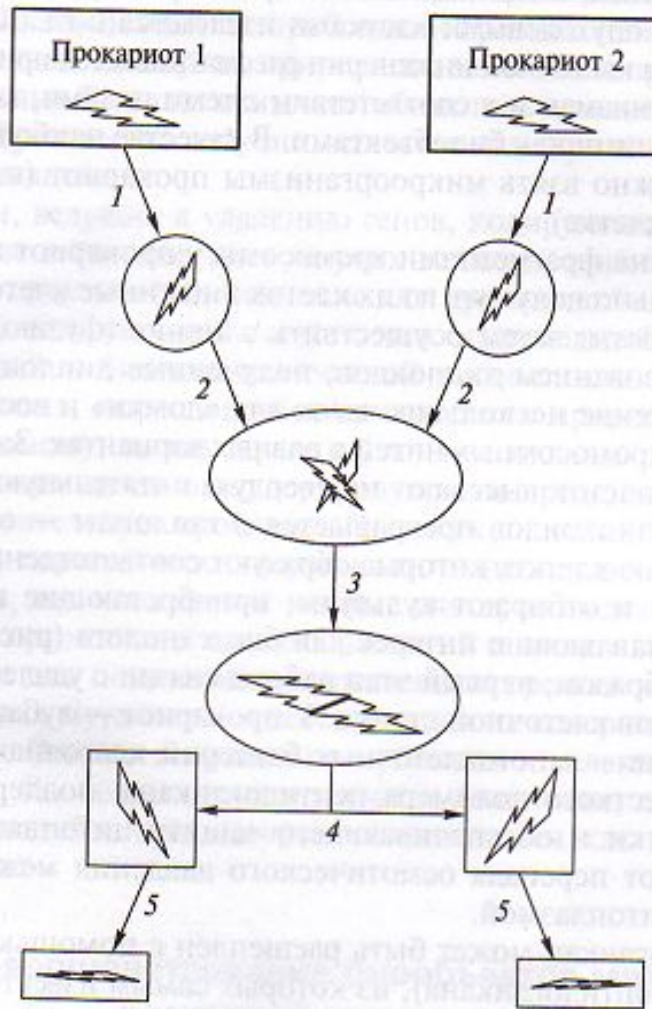
Пенициллин подавляет синтез клеточной стенки Г- бактерий, нарушая баланс между синтетазами и гидролазами

Удалить клеточную стенку и сохранить целостность мембраны можно, выровняв осмотическое давление внутри клетки и в среде.

Протопластирование (Дж.Ледерберг) клетки обрабатывают ферментом в «гипертонической» среде с 20% сахарозы или маннита, или с 10% NaCl в зависимости от особенностей биообъекта и преследуемых целей.

Превращение клеток в протопласты контролируют *методом фазовоконтрастной микроскопии*.

У плесневых и дрожжевых грибов, клеточная стенка состоит из хитина, глюканов, маннопротеинов (каждому необходим свой, деградирующий фермент) – их обрабатывают комплексным ферментным препаратом - улиточный фермент (выделяют из пищеварительного тракта виноградной улитки *Helix pomatia*).



Формирование протопластов у прокариот:

1 — ферментативная деградация клеточной стенки; 2 — слияние протопластов; 3 — ломка и рекомбинация хромосом, образование диплоидов; 4 — образование гаплоидов с рекомбинантной хромосомой; 5 — регенерация протопластов

II. Слияние (фузия) протопластов с образованием диплоидов.

Объединение суспензий двух образцов протопластов, принадлежащих разным штаммам (видам, родам).

Частота слияния двух протопластов разного происхождения, повышается при добавлении к ним ПЭГ(детергент).

У прокариот образующиеся протопласты имеют двойной набор хромосом (т.е. это протопласты с двумя хромосомами), они сохраняют целостность в гипертонической среде.

III. Полученные диплоиды инкубируют в течение нескольких часов для «ломки» и воссоединения кольцевых хромосомных нитей в разных вариантах.

IV. Суспензию протопластов высеивают на ТПС, при этом часть диплоидов превращается в гаплоидны – способные к размножению клетки, которые образуют соответственно колонии. Их изучают и отбирают культуры, с новыми качествами, интересные для биотехнолога.

Примером может быть, получение «**гибридных**» антибиотиков:

С помощью клеточной инженерии были получены продуценты таких антибиотиков, у которых макролидный агликон эритромицина был связан с углеводной частью, соответствующей антрациклинам, и наоборот, антрациклиновый агликон с сахарами, свойственными эритромицину.

Для предотвращения реверсии желаемых мутаций к исходным показателям:

I путь: обработка «плюс»- вариантов мутагенами и отбор мутантов с пониженной способностью к возвращению измененных участков ДНК к норме.

II путь - инженерная энзимология:

иммобилизация клеток «плюс»- вариантов, т.е. связывать их с нерастворимыми носителями и использование в производстве, не прибегая к пересевам в течение определенного времени (от нескольких недель до нескольких месяцев).

1.4. Создание биообъектов методами генетической инженерии

Цель: получение рекомбинантных белков – решение проблемы дефицита сырья.

1.4.1. Общая характеристика.

Генетическую инженерию – можно представить, как соединение фрагментов ДНК природного и синтетического происхождения или комбинацию *in vitro* с последующим введением полученных рекомбинантных структур в живую клетку для того, чтобы введенный фрагмент ДНК после включения его в хромосому либо реплицировался, либо автономно экспрессировался. Следовательно, вводимый генетический материал становится частью генома клетки.

Необходимые составляющие генного инженера:

- а) **генетический материал** (клетку – хозяина);
- б) **транспортное устройство** – вектор, переносящий генетический материал в клетку;
- в) **набор специфических ферментов** - «инструментов» генной инженерии.

Принципы и методы генной инженерии отработаны, прежде всего, на микроорганизмах; бактериях – прокариотах и дрожжах – эукариотах.

При выборе микроорганизма -продуцента чужеродного белка (ЛС) необходимо:
- наиболее полно изучить геном и подробно исследовать метаболизм на уровне вида с целью установления патогенности (желательно ее отсутствие);
продуцент должен расти в крупномасштабных условиях производства на недефицитных и экономически доступных средах.

Генетическая инженерия, позволяет:

- а) свести к минимуму вероятность протеолиза чужеродных белков;
- б) свести к минимуму гидролиз чужеродной иРНК;
- в) «исключить» чужеродные гены из генома.

Стратегическая цель генной инженерии – создание продуцента с человеческим геномом.

потенциальный продуцент должен быть:

1. Не патогенным, и целевой генно–инженерный продукт, выделяемый из БО, не должен содержать даже следов микробных токсинов.
2. векторная ДНК чужеродная для продуцента не должна расщепляться эндонуклеазами клетки-хозяина. При этом рибосомы продуцента-хозяина должны воспринимать иРНК, соответствующую чужеродному материалу.
3. Образующийся чужеродный продуценту-хозяину белок (целевой продукт) не должен подвергаться воздействию систем репарации, гидролизующих чужеродные белки.
4. Желательно выведение целевого продукта из клетки в культуральную среду, для удобства выделения и очистки.

Предварительная работа:

- к гену кодирующему целевой белок, присоединяется нуклеотидная последовательность, кодирующая т.н. лидерную последовательность аминокислот (преимущественно гидрофобных).

- синтезированный в клетке целевой продукт с гидрофобной лидерной последовательностью аминокислот проходит через липидные слои цитоплазматической мембраны из клетки наружу. Для этого в мембране клетки продуцента должна находиться «сигнальная протеаза», отщепляющая от генного продукта лидерную последовательность аминокислот перед его выходом в среду.

- для проникновения вектора с чужеродным геном в клетку, через отверстия небольшого диаметра в стенке оболочки клетки, ее обрабатывают солями лития или кальция в зависимости от вида микроорганизма.

Обработанные таким путем клетки называли *компетентные*: они способны воспринимать переносимую вектором информацию.

-векторы, используемые при работе с микроорганизмами, конструируются на основе умеренных фагов или плазмид. (плазмиды предпочтительны, т. к. отсутствует лизис клетки, возможный при работе с умеренными фагами).

При создании нового **рекомбинантного** продуцента ключевым моментом является встраивание гена (кластера генов) в вектор, точнее в ДНК векторной молекулы, например в *плазмиду*. Это возможно, т.к. имеется большой набор разных по субстратной специфичности эндонуклеаз (*рестриктаз*, от англ. restriction – разрезание).

рестриктазы дифференцируют на:

- а) разрезающие одну из двух комплементарных нитей ДНК;
- б) разрезающие сразу обе нити.

Интерес в 1-ю очередь представляют высоко специфичные рестриктазы, катализирующие разрез одной нити в углеводно-фосфатной цепи ДНК, т.к. обе нити могут иметь одинаковую последовательность, происходит расщепление и второй нити, но разрезы находятся на расстоянии. Образуются одностранные участки – «**липкие концы**»

Место действия рестриктаз



Место действия рестриктаз

Схема расщепления
рестриктазой двухцепочной
ДНК:

A — аденин; C — цитозин; G — гуанидин; T — тимидин

Другой прием – это **фланкирование** гена синтетическими последовательностями нуклеотидов, т.е. **получение липких концов** с заданным порядком нуклеотидов методами биоорганической химии.

1 стадия – «отжиг», ген (или кластер генов) встроившийся в вектор, удерживается в нем вначале за счет водородных связей между комплементарными липкими концами.

2 стадия – закрепление гена ковалентными связями, с помощью лигаз (сшивки), замыкающих разрыв в углеводно – фосфатном каркасе ДНК.

3 стадия – введение вектора, с прочно закрепленным геном, в клетку-хозяин.

4 стадия – высеивание на ТПС, суспензии трансформированных клеток.

5 стадия – обнаружение культуры, синтезирующую целевой продукт, для этого используется *метод предварительного отбора клонов*, содержащих вектор, с помощью «гена – маркера», который встраивается в вектор

Гены прокариот – структурный ген – ДНК, переписывается на иРНК, которая по порядку расположения кодонов отражается на аминокислотной последовательности белка.

Гены эукариот дискретны, содержат перемежающиеся экзоны и интроны, которые переписываются. Возникновение зрелой иРНК, которая становится компонентом рибосомальной матричной системы – ***сплайсинг***, посредством выбрасывания из первичного транскрипта интронов, и «стыковки» экзонов одного с другим.

Человеческий белок в клетках прокариот (т.к. у прокариот отсутствует сплайсинг), нужно переписать зрелую иРНК человеческого гена с помощью фермента обратной транскриптазы на ДНК, далее такую укороченную ДНК (без интронов) можно использовать для включения в вектор.

1.4.2. Рекомбинантные белки как ЛС

1) Инсулин, лишен недостатков животного, т.к. аминокислотная последовательность обеих цепей кодируется генами человека. В производстве рекомбинантного инсулина конкурируют две принципиально разные технологии: - в клетки продуцента-хозяина вводят плазмиду, кодирующую проинсулин (цепи А С-пептиду, цепи В и далее лидерному пептиду и промоторному участку). В дальнейшем С-пептид выщепляется. - раздельное получение цепи А и цепи В в двух микробных культурах, которые впоследствии объединяются.

2) Гормон роста (соматотропин) – необходимый для роста костей. Ведутся работы по повышению избирательности действия гормона роста (уменьшению его связывания с рецептором пролактина).

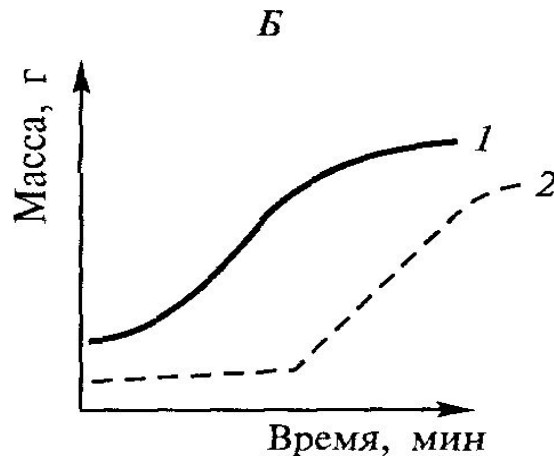
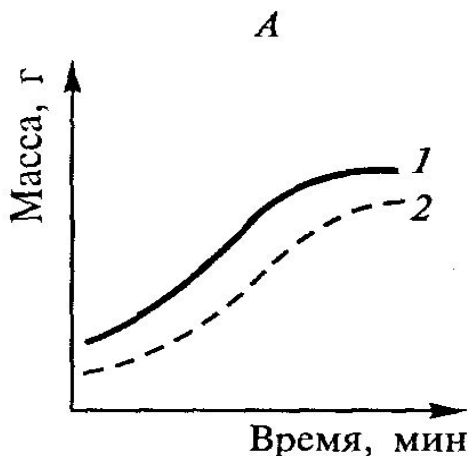
3) Эритропоэтин – видоспецифичный гликопротеин необходим для дифференцировки эритроцитoidных клеток, образуется в почках. Ген эритропоэтина человека встраивается в яйцеклетки китайского хомячка, где белок гликозилируется, (продуцент - монослойная культура).

4) Пептидные факторы роста тканей -(гормоны, образуемые вне ЖВС) – многочисленные биорегуляторы ткане- и видоспецифичны.

5) Рекомбинантные белковые факторы врожденного иммунитета:
Интерфероны – факторы врожденного иммунитета, вырабатываются клетками, зараженными вирусами. Индуцируют локальные и системные противовирусные реакции в других клетках применяются как противовирусные препараты.

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРОДУКТОВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

- типы продуктов получаемых БТ методами:
 - интактные клетки
 - одноклеточные организмы используют для получения биомассы
 - клетки (в т.ч. иммобилизованные) для биотрансформации.
- *Биотрансформация* - реакции превращения исходных органических соединений (предшественников) в целевой продукт с помощью клеток живых организмов или ферментов, выделенных из них. (производство ам-к-т, а/б, стероидов и др.)
- низкомолекулярные продукты метаболизма живых клеток:
 - Первичные метаболиты необходимы для роста клеток. (структурные единицы биополимеров — ам-к-ты, нуклеотиды, моносахариды, витамины, коферменты, органические к-ты)
 - Вторичные метаболиты (а/б, пигменты, токсины) — НМС, не требующиеся для выживания клеток и образующиеся по завершении фазы их роста.



Динамика изменения биомассы и образования первичных (А) и вторичных (Б) метаболитов в процессе роста организма:
1 — биомасса;
2 — продукт

Слагаемые биотехнологического производства

Цели осуществления биотехнологии :

1. основной этап производства ЛС – получение биомассы (сырья, ЛВ);
2. один или несколько этапов производства ЛС (в составе химического или биологического синтеза) - биотрансформация, разделение рацематов и т.п.;
3. полный процесс производства ЛС – функционирование биообъекта на всех стадиях создания препарата.

Главные особенности БТ производства:

1. два активных и взаимосвязанных представителя средств производства – биообъект и «ферментер»;
2. чем выше темп функционирования биообъекта, тем более высокие требования предъявляются к аппаратурному оформлению процессов;
3. оптимизации подвергают и биообъект и аппараты биотехнологического производства

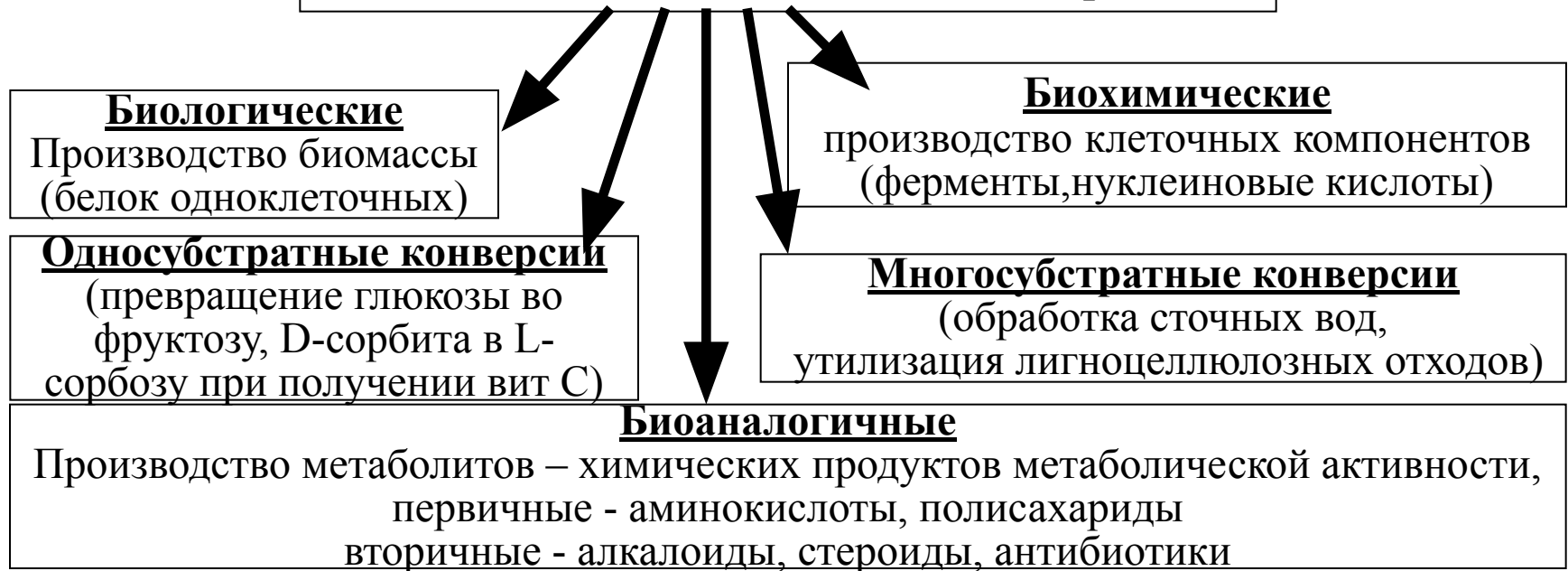
Условия осуществления биотехнологий при производстве ЛП

1. Генетически обусловленная способность био-объекта к синтезу или специфической трансформации связанной с получением БАВ или ЛС;
2. Защищенность био-объекта в биотехнологической системе от внутренних и внешних факторов;
3. Обеспечение функционирующих в биотехнологических системах био-объектов пластическим и энергетическим материалом в объемах и последовательности, гарантирующих нужную направленность и темп биотрансформации.

В каждом из вариантов поставленной цели оперируют взаимосвязанными потоками:

1. информационным
 2. энергетическим
 3. технологическим
- В традиционных биотехнологиях – использующих ткани макрообъектов два последних потока - спонтанные процессы.
 - В современных биотехнологиях - для ускорения сроков созревания меристемных культур, укорочения промежуточных стадий синтеза – технологический и энергетический потоки существенно модернизируются.
 - биообъекты: селекция продуцентов, генно-инженерное совершенствование, переход на иммобилизацию, сверхсинтез, и т.д.,
 - усложнение аппаратов осуществляющих энергетическое и пластическое обеспечение элементной базы биотехнологического процесса.

Основные типы биотехнологических процессов



Стадии БТ производства

1. Подготовка сырья (питательной среды) субстрата с заданными свойствами (рН, температура, концентрация)
2. Подготовка биообъекта: посевной культуры или фермента (в т.ч. иммобилизованного) .
3. Биосинтез, биотрансформация (ферментация) - образование целевого продукта за счет биологического превращения компонентов питательной среды в биомассу, затем, если это необходимо, в целевой метаболит.
4. Выделение и очистка целевого продукта.
5. Получение товарной формы продукта
6. Переработка и утилизация отходов (биомассы, культуральной жидкости и т.п.)

Иерархия биотехнологических процессов

- Первая ступень – биообъекты в совокупности с управляемыми биореакторами.
- Вторая ступень – объединения взаимосвязанных технологических процессов и аппаратов в единую технологическую цепочку (цех).
- Третья ступень – опытно-промышленная установка или предприятие законченного цикла, т.е. основные и вспомогательные (общееинженерные) подсистемы.

Сопоставляя структуры производства разной направленности (исходя из задач)

элементы первой ступени везде одинаковы:

- биообъект,
- биореактор,
- системы асептики,
 - подачи пластического и энергетического материала,
 - разделения продуктов ферментации и т.п.

- основные различия на второй ступени иерархии
 - очистка целевого продукта
 - выведение побочных продуктов
- особенно на уровне организации вспомогательных подсистем (контроль качества)

1. Вспомогательные операции:

1.1. Подготовка посевного материала (инокулята):

засев пробирок,
качалочных колб (1-3 сут),
инокулятора (2-3 % 2-3 сут),
посевого аппарата (2-3сут).

1.2. Подготовка питательной среды

- выбор и реализация рецептуры среды,
- стерилизация гарантирующая сохранность пластических и энергетических компонентов, в исходном количестве и качестве. ^N

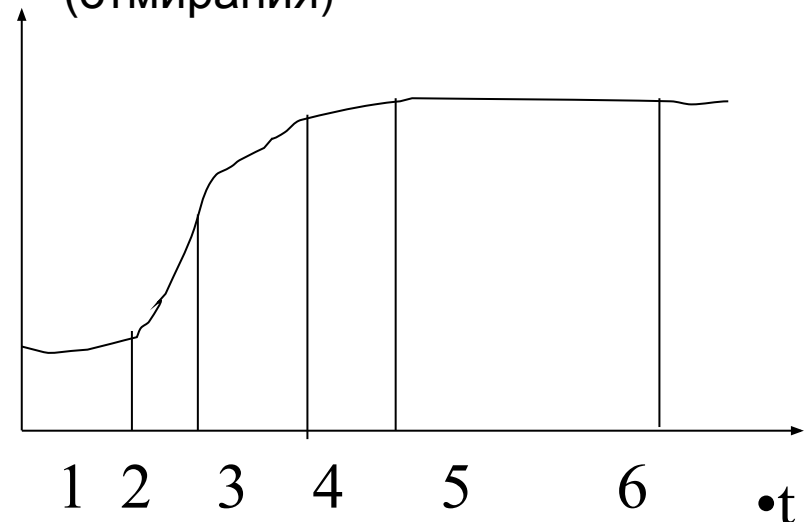
Особенностью биообъектов является потребность в многокомпонентных энергетических и пластических субстратах, содержащих O, C, N, P, H – элементы необходимые для энергетического обмена и синтеза клеточных структур.

Кинетические кривые роста

1. индукционный период (лаг-фаза)
2. фаза экспоненциального роста (накопление биомассы и продуктов биосинтеза)

$dN/dt = \mu N$ (N – число клеток, t - время, μ - коэффициент пропорциональности (удельная скорость роста))

3. фаза линейного роста (равномерный рост культуры)
4. фаза замедленного роста
5. стационарная фаза (постоянство жизнеспособных особей)
6. Фаза старения культуры (отмирания)



Содержание биогенных элементов в различных биообъектах,

- Элементный состав биомассы по химическим элементам позволяет сделать для каждого биообъекта описание в виде выражения:

В дрожжи = $C_{3,92}H_{6,5}O_{1,94}N_{0,7}P_{0,14}$

(числовые коэффициенты получены делением массовой доли элемента в биомассе на атомную массу данного элемента)

Существует количественная закономерность влияния концентрации элементов питательной среды на скорость роста биомассы, равно как и взаимовлияние тех же элементов на удельную скорость роста биообъектов

C – концентрация лимитирующего компонента

DN/dT – скорость роста микроорганизмов.

1 -область лимитирования,

2- область оптимального роста,

3 – область ингибирования.



Микро-организмы	В % элемент				
	углеро	азо	фосфо	кислоро	водоро
бактерии	50,4	12,3	4,0	30,5	6,8
дрожжи	47,8	10,4	4,5	31,1	6,5
грибы	47,9	5,2	3,5	40,4	6,7

Влияние любого из компонентов выражается графически и в виде уравнения:

$\mu (c) = \mu_{\max} \times C / (K_s + C)$ уравнение Моно.

μ - коэффициент пропорциональности,
 c - концентрация расходуемого компонента среды,

μ_{\max} - предельная максимальная удельная скорость роста биообъекта

K_s – константа сродства субстрата к

1.3. Стерилизация питательной среды

- необходимо полностью исключить контаминантную флору и сохранить биологическую полноценность субстратов

чаще автоклавирование, реже химические и физические воздействия.

Эффективность выбранного режима стерилизации оценивают по константе скорости гибели микроорганизмов (берется из специальных таблиц) умноженная на продолжительность стерилизации.

Контроль стерилизации осуществляется с помощью тест-культуры *Bacillus stearothermophilus* штамма 1518, считается что абсолютная стерильность достигается при критерии стерилизации 80.

При наличии термолабильных компонентов стремятся сократить время обработки при повышении температуры выше 140 С изменение лабильности можно достичь например сдвигом рН для глюкозы 3,0 для сахарозы 8,0.

1.4. Подготовка ферментера

- Стерилизация оборудования острым паром. Герметизация с особым вниманием к «слабым» точкам тупиковые штуцера малого диаметра, штуцера датчиков контрольно-измерительной аппаратуры.
- Выбор ферментера осуществляется с учетом критериев дыхания биообъекта, теплообмена, транспорт и превращения субстрата в клетке, скорость роста единичной клетки, время ее размножения и т.п.

2 . Основные операции:

- 2.1. Стадия биосинтеза, где в максимальной степени используются возможности биообъекта для получения лекарственного продукта (накапливается внутри клетки или секретируется в культуральную среду).
- 2.2. Стадия концентрирования, одновременно предназначена для удаления баласта.
- 2.3. Стадия очистки, реализующая за счет повтора однотипных операций или за счет набора различных препаративных приемов (ультрафильтрация, экстракция, сорбция, кристаллизация и т. п) повышение удельной специфической активности лекарственного продукта.
- 2.4. Стадия получения конечного продукта (субстанции или готовой лекарственной формы) с последующими операциями фасовки и упаковки.

Схема биотехнологического производства



Методы ферментации

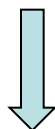
Глубинная

Твердофазная
поверхностная

Ферментация

Периодические

Непрерывная



Клетки

Ферменты

Суспендированные
клетки

Иммобилизованные
ферменты

Иммобилизованные
клетки

Ферменты в растворе

Аппаратурное оформление биотехнологического процесса - ферментеры:

по объёму:

- лабораторные 0,5 -100 л,
 - пилотные 100л -10 м3,
 - промышленные 10 - 100 м3 и более.
- критерии выбора ферментера:
 - теплообмен,
 - скорость роста единичной клетки,
 - Тип дыхания биообъекта,
 - Вид транспорта и превращения субстрата в клетке
 - время размножения отдельной клетке.

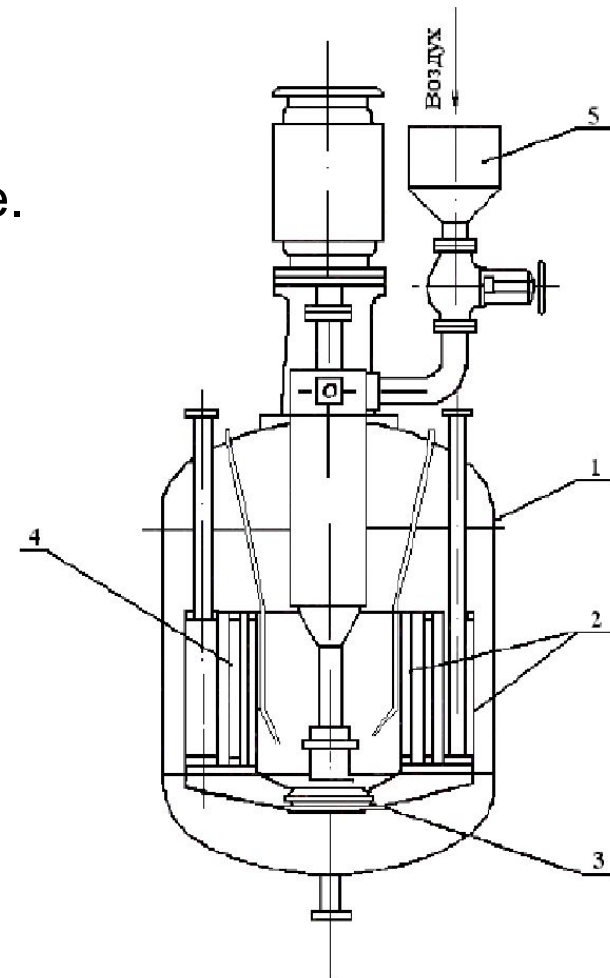


Рис.27. Ферментатор с самовсасывающей мешалкой непрерывного действия:
1- корпус, 2 – диффузор, 3 – самовсасывающая мешалка, 4 – теплообменник,
5 – фильтр

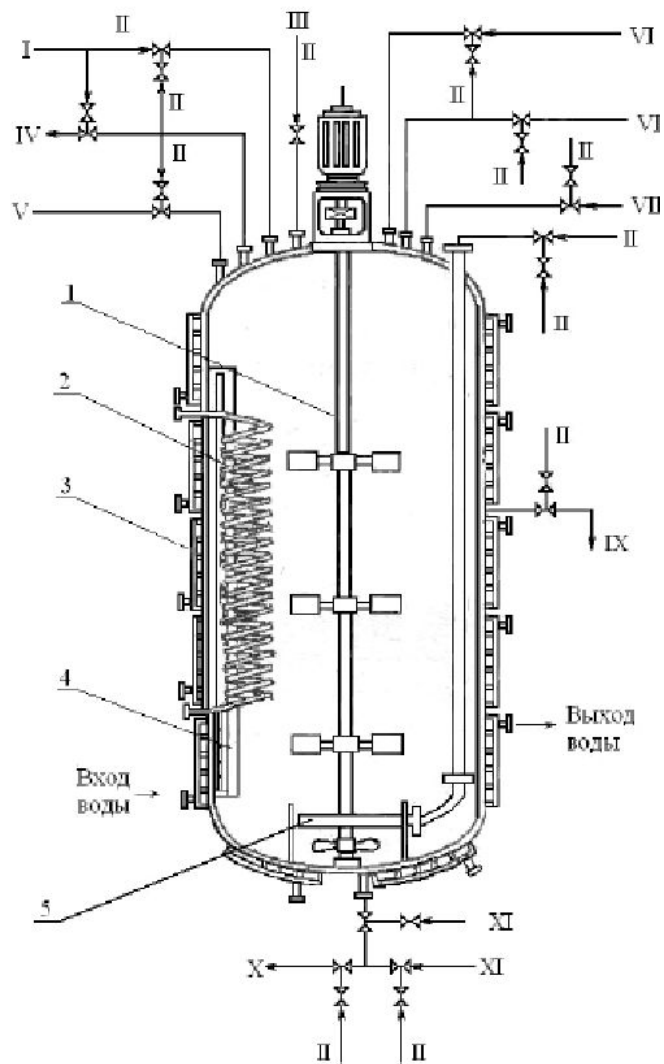


Рис.25. Ферментатор периодического действия: 1- турбинная трехъярусная мешалка, 2 – охлаждающий змеевик, 3 - секционная рубашка, 4 – отражательная перегородка, 5 – барботер, П-пар; I –XI – материальные и вспомогательные трубопроводы с запорно-регулирующими устройствами (I – посевная линия, II – подача стерильного сжатого воздуха, III – подача пара, IV – удаление отработанного воздуха, V – загрузочная линия, VI – линия введения добавок, VII – подача пеногасителя, VIII – подача моющего раствора, IX – пробоотборник, X – выдача продукта, XI – выдача в канализацию через нижний спуск)

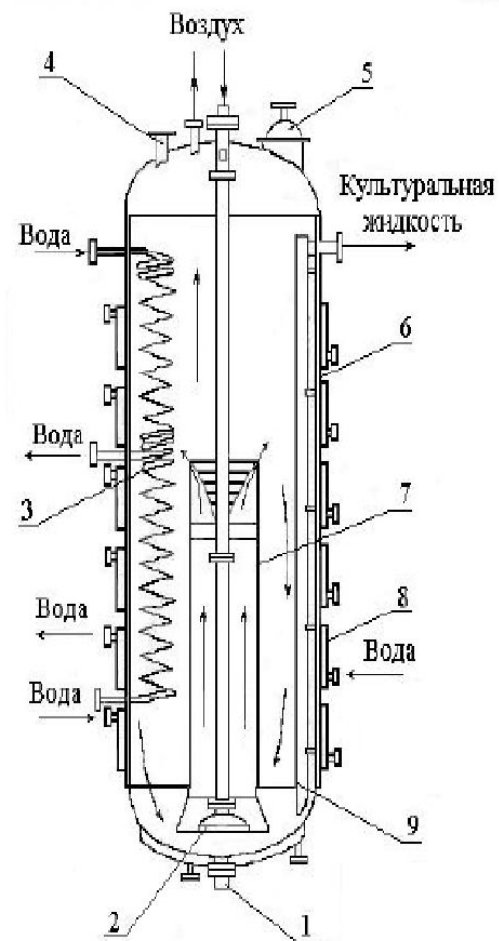


Рис.26. Ферментатор с эрлифтом: 1- штуцер для слива; 2 – аэратор; 3 – змеевик; 4 – штуцер для загрузки; 5 – люк; 6 – корпус аппарата; 7 – диффузор; 8 – рубашка; 9 – руба передавливания

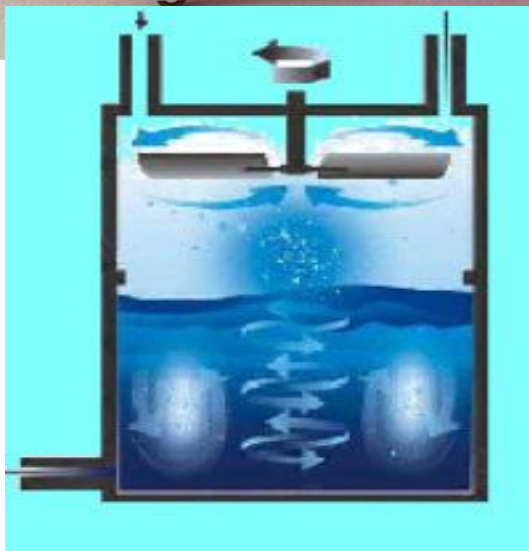
Ферментеры



Инкубационная качалка



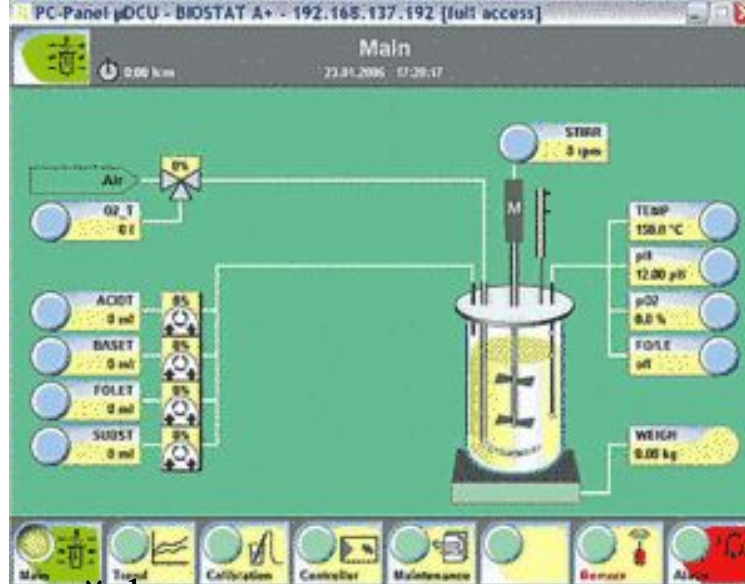
Ферментационный цех



Лабораторный
газовихревой



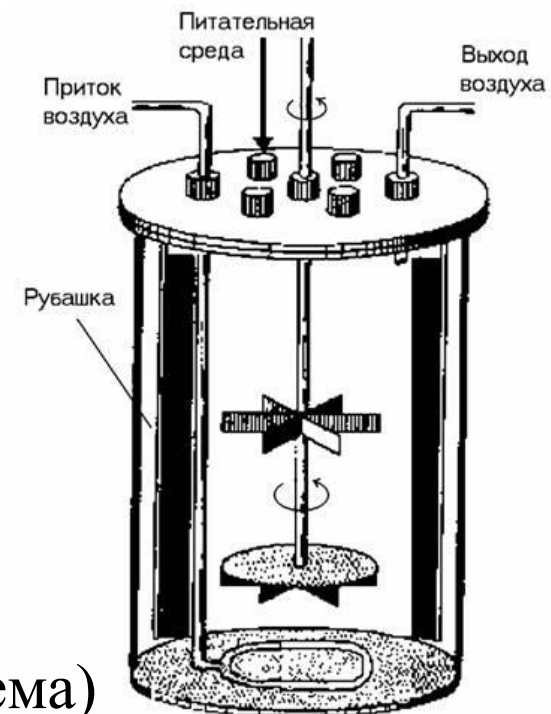
Производственный



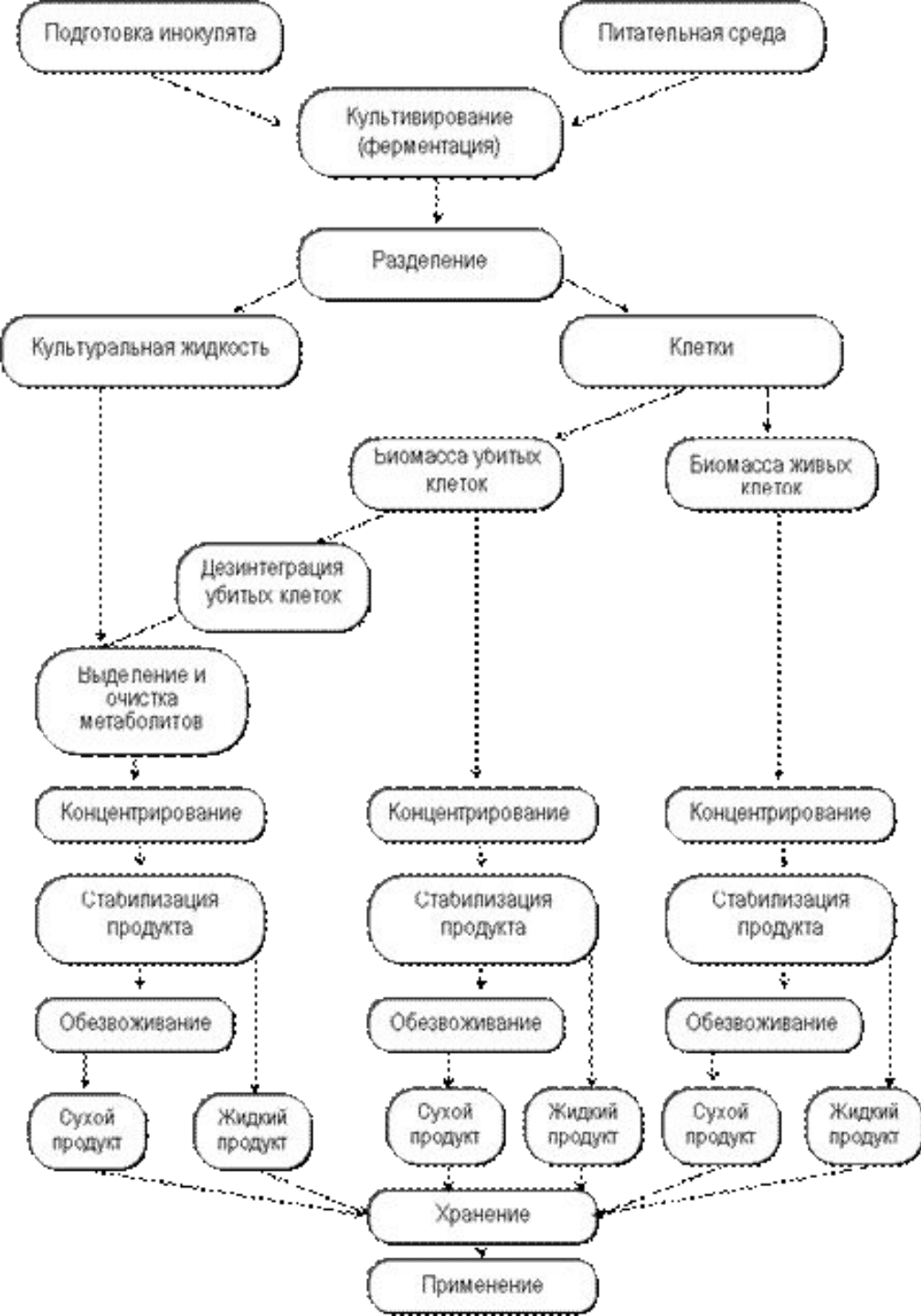
Biostat A plus - автоклавируемый ферментер со сменными сосудами (рабочий объем 1,2 и 5 л) для культивирования микроорганизмов и культур клеток и является полностью масштабируемым при переходе к большим объемам.

Единый корпус с интегрированным оборудованием измерения и управления, насосами, системой температурного контроля, подачи газа и мотором

Ноутбук с заранее установленным Windows совместимым программным обеспечением MFCSDA для управления процессами ферментации и их документирования



Лабораторный (схема)



биосинтез в общем виде:
 продуцент - биообъект
 микроуровня

общая технология в
 предлагаемых условиях:
 вспомогательные операции
 основные операции

Иерархия биотехнологических процессов

- Первая ступень – биообъекты в совокупности с управляемыми биореакторами.
- Вторая ступень – объединения взаимосвязанных технологических процессов и аппаратов в единую технологическую цепочку (цех).
- Третья ступень – опытно-промышленная установка или предприятие законченного цикла, т.е. основные и вспомогательные (общееинженерные) подсистемы.

Сопоставляя структуры производства разной направленности (исходя из задач)

элементы первой ступени везде одинаковы:

- биообъект,
- биореактор,
- системы асептики,
 - подачи пластического и энергетического материала,
 - разделения продуктов ферментации и т.п.

- основные различия на второй ступени иерархии
 - очистка целевого продукта
 - выведение побочных продуктов
- особенно на уровне организации вспомогательных подсистем (контроль качества)

1. Вспомогательные операции:

1.1. Подготовка посевного материала (инокулята):

засев пробирок,
качалочных колб (1-3 сут),
инокулятора (2-3 % 2-3 сут),
посевого аппарата (2-3сут).

1.2. Подготовка питательной среды

- выбор и реализация рецептуры среды,
- стерилизация гарантирующая сохранность пластических и энергетических компонентов, в исходном количестве и качестве.

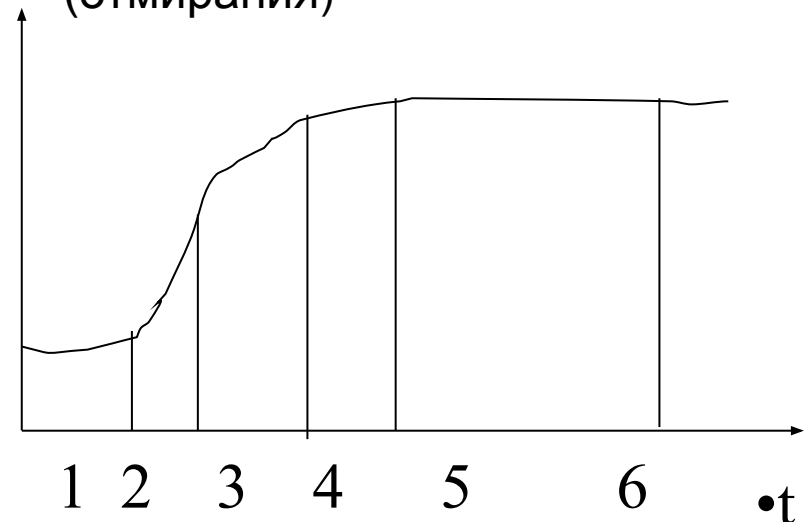
Особенностью биообъектов является потребность в многокомпонентных энергетических и пластических субстратах, содержащих O, C, N, P, H – элементы необходимые для энергетического обмена и синтеза клеточных структур.

Кинетические кривые роста

1. индукционный период (лаг-фаза)
2. фаза экспоненциального роста (накопление биомассы и продуктов биосинтеза)

$dN/dt = \mu N$ (N – число клеток, t - время, μ - коэффициент пропорциональности (удельная скорость роста))

3. фаза линейного роста (равномерный рост культуры)
4. фаза замедленного роста
5. стационарная фаза (постоянство жизнеспособных особей)
6. Фаза старения культуры (отмирания)



Содержание биогенных элементов в различных биообъектах,

- Элементный состав биомассы по химическим элементам позволяет сделать для каждого биообъекта описание в виде выражения:

В дрожжи = $C_{3,92}H_{6,5}O_{1,94}N_{0,7}P_{0,14}$

(числовые коэффициенты получены делением массовой доли элемента в биомассе на атомную массу данного элемента)

Существует количественная закономерность влияния концентрации элементов питательной среды на скорость роста биомассы, равно как и взаимовлияние тех же элементов на удельную скорость роста биообъектов

C – концентрация лимитирующего компонента

DN/dT – скорость роста микроорганизмов.

1 -область лимитирования,

2- область оптимального роста,

3 – область ингибирования.



Микро-организмы	В % элемент				
	углеро	азо	фосфо	кислоро	водоро
бактерии	50,4	12,3	4,0	30,5	6,8
дрожжи	47,8	10,4	4,5	31,1	6,5
грибы	47,9	5,2	3,5	40,4	6,7

Влияние любого из компонентов выражается графически и в виде уравнения:

$\mu (c) = \mu_{\max} \times C / (K_s + C)$ уравнение Моно.

μ - коэффициент пропорциональности,
 c - концентрация расходуемого компонента среды,

μ_{\max} - предельная максимальная удельная скорость роста биообъекта

K_s – константа сродства субстрата к

1.3. Стерилизация питательной среды

- необходимо полностью исключить контаминантную флору и сохранить биологическую полноценность субстратов

чаще автоклавирование, реже химические и физические воздействия.

Эффективность выбранного режима стерилизации оценивают по константе скорости гибели микроорганизмов (берется из специальных таблиц) умноженная на продолжительность стерилизации.

Контроль стерилизации осуществляется с помощью тест-культуры *Bacillus stearothermophilus* штамма 1518, считается что абсолютная стерильность достигается при критерии стерилизации 80.

При наличии термолабильных компонентов стремятся сократить время обработки при повышении температуры выше 140 С изменение лабильности можно достичь например сдвигом рН для глюкозы 3,0 для сахарозы 8,0.

1.4. Подготовка ферментера

- Стерилизация оборудования острым паром. Герметизация с особым вниманием к «слабым» точкам тупиковые штуцера малого диаметра, штуцера датчиков контрольно-измерительной аппаратуры.
- Выбор ферментера осуществляется с учетом критериев дыхания биообъекта, теплообмена, транспорт и превращения субстрата в клетке, скорость роста единичной клетки, время ее размножения и т.п.

2 . Основные операции:

- 2.1. Стадия биосинтеза, где в максимальной степени используются возможности биообъекта для получения лекарственного продукта (накапливается внутри клетки или секретруется в культуральную среду).
- 2.2. Стадия концентрирования, одновременно предназначена для удаления баласта.
- 2.3. Стадия очистки, реализующая за счет повтора однотипных операций или за счет набора различных препаративных приемов (ультрафильтрация, экстракция, сорбция, кристаллизация и т. п) повышение удельной специфической активности лекарственного продукта.
- 2.4. Стадия получения конечного продукта (субстанции или готовой лекарственной формы) с последующими операциями фасовки и упаковки.

Схема биотехнологического производства

