

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
«УКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ХІМІКО-ТЕХНОЛОГІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ»

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
до практичних занять для здобувачів вищої освіти з дисципліни
«Промислова біотехнологія лікарських засобів» до теми
за освітнім рівнем магістр
спеціальності 226 Фармація, промислова фармація

Дніпро УДХТУ 2023

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
«УКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ХІМІКО-ТЕХНОЛОГІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ»

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
до практичних занять для здобувачів вищої освіти з дисципліни
«Промислова біотехнологія лікарських засобів» до теми
за освітнім рівнем магістр
спеціальності 226 Фармація, промислова фармація

ЗАТВЕРДЖЕНО
на засіданні кафедри
Ф та ТОР
Протокол №15 від 29.06.2022

Дніпро УДХТУ 2023

Методичні вказівки до практичних занять для здобувачів вищої освіти з дисципліни «Промислова біотехнологія лікарських засобів» за освітнім рівнем магістр спеціальності 226 Фармація, промислова фармація / Укл.: О.В. Берзеніна, О.В. Охтіна. – Дніпро: ДВНЗ УДХТУ, 2023 - 53 с.

Укладачі: О.В. Берзеніна канд. біол. наук
О.В. Охтіна канд. техн. наук

Відповідальний за випуск Харченко О.В., д-р хім. наук

Навчальне видання

Методичні вказівки до практичних занять для здобувачів вищої освіти з дисципліни «Промислова біотехнологія лікарських засобів» за освітнім рівнем магістр спеціальності 226 Фармація, промислова фармація

Укладачі: БЕРЗЕНІНА Оксана Валеріївна
ОХТІНА Оксана Володимирівна

Редактор Л.М. Тонкошкур
Коректор Л.Я. Гоцуцова

Підписано до друку Формат 60*84 1/16.
Папір друк. №2 Друк офсетний. Умов.- друк.арк.1,23.
Облік.-вид.арк. 1,08. Тираж 100прим. Зам. № .
ДВНЗ УДХТУ, 49005, Дніпропетровськ, 5, просп. ім. Гагаріна, 8.
Дільниця оперативної поліграфії ІнКомЦентру

Дисципліна "Промислова біотехнологія лікарських засобів" закладає основи професійної підготовки, сприяє формуванню фармацевтичного і технічного мислення, необхідного для здійснення професійної діяльності; навчальна дисципліна відіграє важливу роль у професійній підготовці фармацевтів та закладає основи теоретичного та практичного виготовлення лікарських засобів із використанням біотехнологічних методів в умовах фармацевтичних підприємств

Метою вивчення дисципліни "Промислова біотехнологія лікарських засобів" є засвоєння здобувачами вищої освіти основ виготовлення лікарських засобів різних лікарських форм на фармацевтичних підприємствах з використанням біотехнологічних методів та урахуванням вимог належної виробничої практики; правилам складання технологічної документації на виготовлення лікарських препаратів, правил їх зберігання та пакування; ознайомлення здобувачів освіти із новими досягненнями у сфері генної інженерії, клітинної інженерії, культурі ізольованих клітин та тканин, виробництвом антибіотиків та пробіотиків, ферментних препаратів, вакцин та сироваток. Засвоєння теорії та практики виготовлення лікарських форм необхідно спеціалісту для виконання обов'язків фахівця.

Цей початковий посібник містить матеріали до вивчення тем, що у відповідності до робочої програми дисципліни «Промислова біотехнологія лікарських засобів» запропоновані для опанування на практичних заняттях.

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ до вивчення теми
«Біотехнологічне виробництво антибіотиків»

<i>Навчальна дисципліна</i>	Промислова біотехнологія лікарських засобів
<i>Модуль №</i>	1
<i>Змістовний модуль №</i>	1
<i>Практичне заняття</i>	Біотехнологічне виробництво антибіотиків.
<i>Курс</i>	5
<i>Факультет</i>	ТОРБТ

Цілі практичного заняття:

- ознайомитись з характеристикою антибіотиків, що отримують біотехнологічними методами
- знати та вміти характеризувати етапи біотехнологічного виробництва антибіотиків

№ з/п	Основні питання теми
1.	Загальна характеристика антибіотиків, що отримують біотехнологічними методами.
2.	Основні етапи виробництва антибіотиків.
3.	Виробництво β -лактамних антибіотиків. Модифікація β -лактамних антибіотиків.
4.	Препарати у формі таблеток, що містять антибіотики, отримані за допомогою біотехнології.
5.	Створення нової біотехнології виробництва і застосування антибіотиків.

Зміст теми

Актуальність.

Відкриття основних груп антибіотиків і весь комплекс генетичних і біохімічних досліджень їхніх продуцентів у 40–50 роки минулого століття, які дозволили створити масштабне виробництво принципово нових лікарських препаратів, можна віднести до найважливіших досягнень біотехнології. Демографічний вибух в одних країнах і різке збільшення тривалості життя в інших на той час були обумовлені значною мірою антибіотиками. Серед продукції фармацевтичної промисловості розвинених країн антибіотики посідають перше місце за всіма показниками.

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

Загальна характеристика антибіотиків, що отримують біотехнологічними методами

Відкриття основних груп антибіотиків і весь комплекс генетичних і біохімічних досліджень їхніх продуцентів у 40–50 роки минулого століття, які дозволили створити масштабне виробництво принципово нових лікарських препаратів, можна віднести до найважливіших досягнень біотехнології. Демографічний вибух в одних країнах і різке збільшення тривалості життя в інших на той час були обумовлені значною мірою антибіотиками. Серед продукції фармацевтичної промисловості розвинених країн антибіотики посідають перше місце за всіма показниками.

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

Антибіотики – це низькомолекулярні речовини, які розрізняються за хімічною структурою. Загальне в цих сполуках є те, що, залишаючись продуктами життєдіяльності мікроорганізмів, вони в дуже малих концентраціях порушують ріст мікроорганізмів. Більшість антибіотиків належать до вторинних метаболітів, так званих ідіолітів.

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

На сьогодні відомо близько 6000 антибіотиків та антибіотичних речовин природного походження, продуцентами яких в основному є шість родів нитчастих грибів, три роди актиноміцетів (майже 4000 різних антибіотиків) і два роди справжніх бактерій (майже 500 антибіотиків).

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

Крім пеніцилінів і цефалоспоринів, до β -лактамних антибіотиків належать цефаміцини, продуцентами яких є нитчасті бактерії актиноміцети, які належать до роду стрептоміцетів *Streptomyces*.

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

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

Серед відомих тепер 5000–6000 природних антибіотиків і антибіотичних речовин для реалізації споживачам виробляється лише 100, більшість яких (69) одержана зі стрептоміцетів. До найважливіших антибіотиків терапевтичного призначення, які використовувались донедавна і використовуються тепер належать наступні їх класи (табл. 1).

Перелік наведених класів антибіотиків поповнюється щороку. Причини такої уваги до пошуку нових антибіотиків пояснюються токсичністю існуючих антибіотиків, алергічними реакціями на їх введення,

підвищенням стійкості до них патогенних мікроорганізмів, а також необхідністю пошуку засобів боротьби зі збудниками, проти яких недостатньо ефективні відомі тепер препарати.

У світі в 1978 р. було реалізовано антибіотиків на 4,2 млрд. доларів. Із цієї суми 1,5 млрд. доларів припадає на β -лактамні антибіотики (пеніциліни і цефалоспорины) та антибіотики, які синтезуються актиноміцетами (1 млрд. доларів). У 1980 р. світове виробництво антибіотиків складало приблизно 25000 т, з них 17000 т – пеніциліни, 5000 – тетрацикліни, 1200 – цефалоспорины і 800 т – еритроміцины.

Починаючи з середини 60-х років ХХ ст. у зв'язку зі зростаючою складністю виділення ефективних антибіотиків і розповсюдження стійкості до широко вживаних антибіотиків у значній кількості патогенних бактерій, дослідники перейшли від пошуку нових препаратів до модифікації структури уже отриманих. Вони прагнули підвищити ефективність антибіотиків, знайти захист їх від інактивації ферментами стійких бактерій і покращити фармакологічні властивості препаратів. Більшість досліджень було зосереджено на пеніцилінах і цефалоспоринонах, структура яких включає чотиричленне β -лактамне кільце, що складається з трьох атомів вуглецю і одного атома азоту, і яке є зручним для модифікації.

Табл. 1. Основні класи антибіотиків

Клас	Основні антибіотики	Продуценти	Чутливі мікроорганізми	Механізм дії	Побічна дія
β -лактамні	Пеніциліни, цефалоспорины	Гриби родів <i>Penicillium</i> , <i>Cephalosporium</i>	Грампозитивні та грамнегативні бактерії	Порушення синтезу клітинної стінки	Алергічні реакції
Аміноглікозиди	Стрептоміцин, гентаміцин, канаміцин, тобраміцин, амікацин	Актиноміцети роду <i>Streptomyces</i> , бактерії родів <i>Micromonospora</i> , <i>Bacillus</i>	В основному грамнегативні бактерії	Незворотне пригнічення синтезу білка	Ототоксична дія, нефротоксичність
Тетрацикліни	Одноіменні антибіотики	Актиноміцети роду <i>Streptomyces</i>	Грампозитивні та грамнегативні бактерії, рикетсії, хламідії, найпростіші	Зворотне подавлення синтезу білка	Розповсюдження стійких штамів

Макроліди	Антибактеріальні: еритроміцин Противіробкові і антипротозойні: полієни	Актиноміцети и роду <i>Streptomyces</i> Те ж саме	Грампозитивні бактерії Гриби, деякі найпростіші	Те ж саме Порушення плазматичної мембрани	Токсичність
Поліпептиди	Поліміксин, граміцидіни, бцитрацини	Різні мікроорганізми	В основному грамнегативні бактерії	Механізм дії різний	Висока токсичність

Основні етапи виробництва антибіотиків

Оскільки антибіотичні речовини є вторинними метаболітами, для їх надсинтезу доцільно лімітувати ріст продуцента. Таким лімітувальним фактором під час біосинтезу пеніциліну є глюкоза, стрептоміцину — фосфати. Середовище для синтезу пеніциліну містить, %: глюкозу — 1,5, лактозу — 5 (лактоза знімає катаболітну репресію глюкози), сульфат амонію, фосфати — 0,5—1, кукурудзяний екстракт — 2—3, попередник антибіотику фенілоцтову кислоту — 0,3—0,6, крейду — 0,5—1, піногасник — 0,5—1; температуру ферментації підтримують на рівні 22—26 °С при рН 5,0—7,5 і аерації 1 м³ повітря на 1 м³ середовища за 1 хв; тривалість ферментації 4 доби.

Здатність актиноміцетів до синтезу різних гідролаз дає змогу використовувати для синтезу антибіотиків білкові середовища (соєве і рибне борошно, білок клейковини пшениці тощо), а також крохмаль. Так само, як і для продуцентів інших мікробних метаболітів, для кожного продуцента антибіотиків оптимальні умови його надсинтезу визначають експериментально. Наприклад, одержання посівного матеріалу і виробничий біосинтез у разі *Streptomyces kanamyceticus* здійснюють на соєво-крохмальному середовищі. Основну ферментацію проводять при 27—28 °С упродовж 4—5 діб із підтриманням рН на рівні 7,1—7,6.

Середовище для вирощування *S. floridae* (продуцент біоміцину, або флориміцину) містить глюкозу або гідрол, соєве борошно, кукурудзяний екстракт, нітрати, крейду; температуру підтримують у межах 27—29 °С, рН 7,0—7,3.

Основні стадії промислового одержання антибіотиків

Підготовка поживного середовища та посівного матеріалу. У разі використання невеликих об'ємів середовища використовують періодичний метод стерилізації. Середовище нагрівається до 120—130 °С безпосередньо

у ферментаторі, витримується при цій температурі упродовж 30—60 хв і охолоджується.

Стерилізація великих об'ємів середовища здійснюється безперервним методом. Приготовлене середовище зі спеціального апарата насосом подається в стерилізаційну колонку, через яку пропускається гостра пара (тиск пари близько 0,5 МПа). У колонці середовище нагрівається до температури стерилізації (близько 130 °С) і надходить у витримувач, де при температурі 125–130 °С витримується упродовж 5—10 хв. Із витримувана стерильне середовище надходить у зміювиковий холодильник, в якому воно охолоджується до 30–35 °С, після чого подається у ферментатор.

Якщо до складу середовища входять термолабільні компоненти, вони стерилізуються окремо у м'якших умовах і після стерилізації подаються у ферментатор.

Посівний матеріал підготовляють так: вирощують продуцент на скошеному агаризованому середовищі, в колбах на качалках (дві генерації), в першому інокуляторі (10 л), в другому інокуляторі (100—500 л).

Продуценти антибіотиків, як правило, вирощуються на багатих поживних середовищах.

Біосинтез антибіотика. Процес біосинтезу антибіотиків здійснюють в умовах глибинного культивування продуцента у ферментаторах, оснащених барботерами, через які подається стерильне повітря, та мішалками (пропелерними, турбінними та ін.). Останнім часом для виробництва антибіотиків використовують економічніше низькочастотне вібраційне перемішування культуральної рідини.

Підтримання необхідної температури забезпечується сорочкою ферментатора або системою зміювиків. Зміювики використовуються також для подавання пари для стерилізації або води для охолодження. Для біосинтезу антибіотиків використовуються апарати об'ємом 50, 100 м³ і більше. Стерилізуються вони перегрітою парою. Повітря стерилізується через спеціальні фільтри, заповнені скляною ватою або активованим вугіллям.

Піна, що утворюється внаслідок продування повітря через ферментатор, негативно впливає на синтез антибіотиків. Для піногасіння використовують рослинну олію (соєву, соняшникову), мінеральні масла (вазелінове, парафінове), спирти та вищі жирні кислоти.

Використовують також механічні способи піногасіння (відсмоктування піни через спеціальні труби, руйнування бульбашок піни сильним струменем рідини) і аеродинамічні.

Попередня обробка рідини. Антибіотики здебільшого накопичуються в культуральній рідині, проте частина їх може залишатись у клітинах продуцента. Якщо антибіотик виділяється із клітин у культуральну рідину, його екстрагують органічними розчинниками, які не змішуються з рідкою фазою, осаджують у вигляді нерозчинної сполуки або сорбують на іонообмінних смолах.

Із клітин антибіотики виділяють за допомогою екстракції органічними розчинниками. Якщо антибіотик міститься і у культуральній рідині, і в клітинах, його спочатку переводять у фазу, з якої найлегше виділити. Так, антибіотик із культуральної рідини і клітини з антибіотиком переводять в осад, а потім його екстрагують.

Перед виділенням антибіотика із культуральної рідини необхідно відокремити тверду фазу (біомасу) від рідкої. У такому разі, як правило, використовують фільтрацію (фільтр-прес, нутч-фільтр, друк-фільтр) або центрифугування (центрифуги, сепаратори).

Якість твердої фази помітно позначається на ефективності фільтрування. Можна відзначити таку закономірність: нативна бактеріальна маса фільтрується гірше, ніж міцеліальна. Вищі актиноміцети здатні формувати нитчасті структури і їх відокремлення фільтруванням відбувається легше, ніж інших бактерій.

Шляхи підвищення ефективності фільтрування: оброблення культуральної рідини електролітами, теплова коагуляція, додавання фільтрувальних Наповнювачів, кислотна коагуляція тощо.

Труднощі виділення антибіотиків зумовлені багатоконпонентністю культуральних рідин і малою концентрацією в них цільових продуктів. Так, пеніцилін може накопичуватися приблизно до 3 г/л при 8 % -му виході від субстрату. При цьому сухі речовини після відділення міцелію зазвичай становлять близько 3—6 %, з яких лише 15—30 % припадає на антибіотик. У зв'язку з цим культуральну рідину піддають такій обробці, щоб антибіотик переходив у ту фазу, з якої його можна найповніше виділити. У ряді випадків цього можна досягти підкисленням (тетрациклін) або, навпаки, підлуженням (новобіоцин) культуральної рідини, додаванням солей щавлевої кислоти (еритроміцин) тощо до або після коагуляції і осадження білків із нативних розчинів.

Якщо для виділення антибіотика застосовують іонний обмін, то нативний розчин необхідно звільнити від іонів-конкурентів (розчинні оксалати - для видалення іонів кальцію; натрію триполіфосфат — для зв'язування іонів магнію; жовта кров'яна сіль — для осадження іонів заліза).

Виділення та очищення антибіотика. У культуральній рідині, крім антибіотика, містяться неспожиті компоненти середовища, продукти метаболізму та автолізу клітин. Видалення таких добавок є першою і важливою стадією очищення антибіотика. Для цього використовують такі методи.

Екстракція. Часто для очищення антибіотика від різних домішок його багаторазово переводять із одного розчинника в інший з попереднім осадженням-кристалізацією. Такий прийом називається перекристалізацією.

Іонообмінна сорбція. У процесі пропускання водних розчинів антибіотиків, які за хімічною природою є кислотами, основами або амфотерними сполуками, через колонки з відповідними іонообмінними смолами, вони сорбуються на них, а розчин з домішками проходить через колонку. Адсорбований антибіотик десорбують (процес елюції), в результаті чого одержують більш очищений та сконцентрований препарат.

Осадження. Антибіотик обробляють органічними або неорганічними речовинами з метою переведення його в осад. Осад за допомогою фільтрування або центрифугування відділяють від нативного розчину, промивають і висушують. Сухий осад розчиняють і з розчину екстрагують антибіотик або знову осаджують (кристалізують).

Однією зі стадій хімічного очищення антибіотиків є концентрування розчинів відгонкою більшої частини розчинника, зазвичай під вакуумом.

Одержання готової продукції, виготовлення лікарських форм, фасування. Антибіотики для ін'єкцій повинні бути стерильними, тому одержання таких препаратів, приготування лікарських форм, фасування та пакування здійснюються в асептичних умовах.

Після виділення та хімічного очищення антибіотик висушують. Більшість антибіотиків термолабільні. Для їх висушування застосовують такі методи: ліофілізація або висушування на розпилювальній сушарці (розчин пневматично розпилюється до дуже дрібних крапель у камері потоком нагрітого повітря) або вакуум-висушування у спеціальних шафах.

Біологічний і фармакологічний контроль

Біологічний контроль проводять для визначення стерильності препарату. Для цього використовують два методи:

— антибіотик інактивують (наприклад, пеніциліни обробкою пеніцилілазами) і висівають на відповідні поживні середовища;

— для більшості антибіотиків не існує біологічних інактиваторів їхньої активності, тому для таких препаратів виявляють наявність стійких і чутливих форм мікроорганізмів.

Фармакологічний контроль здійснюють на тваринах (гостра та хронічна токсичність). Показники гострої токсичності — один із критеріїв якості антибіотика. Визначають максимальну дозу, що переноситься твариною, а також LD_{50} та LD_{100} (дозы, що спричиняють загибель відповідно 50 % та всіх тварин).

Виробництво β -лактамних антибіотиків

Одержання пеніцилінів. Вперше антибактеріальну дію пеніциліну і можливість його використання як лікувального препарату встановили у 1940 р. А. Флемінг, Х. Флорі і Е. Чейн зі співробітниками Оксфордського університету. Продуктивність лабораторного штаму плісені була на той час 2 мг препарату на 1 л культуральної рідини, що було недостатнім для налагодження промислового виробництва антибіотика. Продуктивність гриба вдалося збільшити шляхом багаторазового систематичного впливу на нього такими мутагенами, як рентгенівське й ультрафіолетове опромінювання, азотистий іприт у сполученні зі спонтанними мутаціями й відбором найкращих продуцентів.

Завдяки цьому концентрація пеніциліну в культуральній рідині була доведена до 2 %, тобто збільшена в 10 тис. разів (20 г/л культуральної рідини).

Метод підвищення продуктивності штамів-продуцентів антибіотиків, який ґрунтується на безладних мутаціях, незважаючи на великі затрати праці й часу, використовується й нині. Це є наслідком того, що біосинтез антибіотика відбувається в результаті сумісної дії 10–30 різних ферментів, кодованих відповідною кількістю генів. Полігенний механізм, покладений в основу біосинтезу антибіотика, є причиною того, що зміни окремих генів не дають бажаних результатів. Крім того, для багатьох антибіотиків, мікробіологічне виробництво яких налагоджено, молекулярні механізми їх біосинтезу дотепер не з'ясовані.

Для масштабного виробництва пеніциліну G використовують високопродуктивний промисловий штам *Penicillium chrysogenum*, який був одержаний у результаті послідовних циклів мутагенезу і селекції. Вирощують його глибинним методом у ферментерах за допомогою фенілоцтової кислоти, яка є попередником бензильного бокового ланцюга молекули антибіотика. Інтенсивний синтез пеніциліну розпочинається за наявності великої кількості біомаси міцелію при повному використанні глюкози і молочної кислоти в середовищі, при рН, наближеному до нейтрального. Мікробіологічна стадія при виробництві пеніциліну триває близько 200 год. Після закінчення ферментації культуральну рідину

фільтрують, а клітини плісені промивають. З фільтрату і промивок за допомогою бутанолу й іонів калію у спеціальних установках – кристалізаторах одержують кристалічну калієву сіль пеніциліну G (чистота – 99,5 %), яка є вихідним матеріалом для наступних хімічних модифікацій.

До цього часу пеніцилінові антибіотики становлять найважливішу групу хіміотерапевтичних засобів. Ядром пеніцилінів є 6-амінопеніциланова кислота, або 6-АПК, яку використовують для отримання напівсинтетичних пеніцилінів.

Отримання антибіотиків цефалоспоринового ряду. Цефалоспорини – друга велика група екстрацелюлярних β -лактамних антибіотиків, у яких шестичленне дигідротіазинове кільце з'єднане з β -лактамним кільцем. Завдяки цьому ядром цефалоспоринів є 7 α -аміноцефалоспоринова кислота або 7-АЦК (цефемове ядро), вперше виділене у процесі очищення цефалоспорину С.

При виробництві цефалоспорину С поєднують мікробіологічний метод з подальшою хімічною модифікацією. Як продуцент антибіотика використовується *Cephalosporium acremonium*. У цього антибіотика поєднується антибактеріальна активність як проти грампозитивних, так і грамнегативних мікроорганізмів. Проте для досягнення лікувального ефекту потрібні високі концентрації цефалоспорину С. Він є матеріалом для подальших хімічних модифікацій.

Модифікація β -лактамних антибіотиків

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

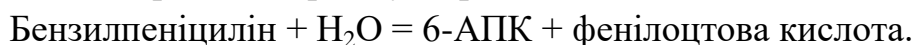
В результаті одержали так звані напівсинтетичні антибіотики, в структуру яких внесені деякі зміни, які не займають основного угруповання атомів, відповідальних за антибіотичний ефект. Таким чином модифікували природні пеніциліни і цефалоспорини за допомогою іммобілізованого ферменту пеніцилінамідази.

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

Це відкрило доступ до широкомасштабного виробництва напівсинтетичних пеніцилінів, стійких в кислому середовищі, які володіють високою активністю по відношенню до великої кількості мікробів, низькою токсичністю, а також стійкістю до ферменту β -лактамази, яка гідролізує

лактамне кільце, що призводить до повної втрати антибіотичної активності. Остання властивість дуже важлива, тому що багато мікроорганізмів, які містять β -лактамазу, стійкі до дії бензилпеніциліну і деяких інших пеніцилінів.

Одержання 6-амінопеніциланової кислоти (6-АПК). Це ключовий продукт синтезу нових пеніцилінів. Похідними 6-АПК є напівсинтетичні пеніциліни. Одержують їх шляхом гідролізу бензилпеніциліну (пеніциліну G). Оброблений ферментом пеніцилінамідазою, продуцентом якого є спеціальний бактеріальний штам *E. coli*, пеніцилін G в результаті вибіркового видалення з молекули бензильної групи при 37 оС у водному середовищі перетворюється на 6-амінопеніциланову кислоту. Другим компонентом, який утворюється в процесі гідролізу, є фенілоцтова кислота: пеніцилінамідаза



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

В результаті використання іммобілізованих бактеріальних клітин (*E.coli*), які містять пеніцилінамідазу, а потім і самої іммобілізованої пеніцилінамідази, значно підвищилася продуктивність і економічність промислового процесу одержання 6-АПК. У 1975 р. процес одержання 6-АПК з використанням іммобілізованої пеніцилінамідази впроваджено у тодішньому Радянському Союзі, і це було першим процесом інженерної ензимології.

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

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

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

Отримана 6-АПК має слабку антибактеріальну активність і не використовується самостійно як лікувальний засіб. Однак ядро 6-АПК є зручною основою для модифікацій, в результаті яких при приєднанні бічних

груп антибактеріальна активність препарату значно підвищується. Наприклад, при заміні бічних груп дістають *метицилін*, стійкий проти інактиваційної дії бактеріальних ферментів, а також *ампіцилін*, який діє на грампозитивні бактерії. З пеніциліну G можна одержати 6-АПК і хімічним шляхом, вдаючись до багатостадійних хімічних перетворень при досить жорстких умовах (низька температура, наявність певних розчинників і видалення із середовища, де відбувається реакція, навіть слідів вологи). Через складність хімічного методу перевагу надають ферментативному, який, крім того, має менше етапів.

Одержання 7- α -аміноцефалоспоринової кислоти – 7-АЦК.

Пеніцилінамідазі властива унікальна субстратна специфічність, яка дозволяє здійснювати гідроліз не тільки пеніциліну, але й цефалоспорину, причому відщеплюється тільки бічна група (R1 або R2), β -лактамний цикл лишається незмінним.

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

Препарати у формі таблеток, що містять антибіотики, отримані за допомогою біотехнології

Використання речовин, отриманих шляхом біотехнологічного синтезу, в складі таблеток обмежене. Основним продуктом біотехнології, що входить до складу таблеток, є – антибіотики, отримані шляхом мікробного синтезу. Таблетки з рядом антибіотиків активно використовуються в сучасній бактеріотерапії та хіміотерапії: рифампіцин, ністатин, джозаміцин, неоміцин, ідарубіцин, еритроміцин та ін. Наводимо ряд прикладів, що підтверджують виробництво таблеток з біотехнологічними препаратами (табл. 2).

Таблиця 2.

Характеристика таблеток, які містять природні антибіотики

Назва препарату	АФІ / штам-продуцент	Допоміжні речовини
Вільпрафен	Джозаміцин /	МЦ, кремнію діоксид колоїдний безводний,

(плівкова оболонка)	<i>Streptomyces parbonensis</i> – макролід	полі-сорбат 80, натрію КМЦ, тальк, магнію стеарат, ПЕГ, титану діоксид, алюмінію гідроксид, сополімер метакрилової кислоти
Пімафуцин (кишково-розчинний)	Натаміцин / <i>Streptomyces natalensis</i> – полієновий	Повідон, магнію стеарат, лактоза, желатин, гуміара-бік, метилпарагідроксибензоат, каолін, кальцію карбонат, тальк, триацетин, ацетилфталат целюлози (АФЦ), сахароза, титану діоксид
Еритроміцин (кишково-розчинні) 100 мг	Еритроміцин (<i>Streptomyces erythreus</i>) – макролід	Повідон, кросповідон, кальцію стеарат, тальк, крох-маль картопляний. Оболонка: АФЦ, титану діоксид, олія рицинова
Еритроміцин (кишково-розчинні) 500 мг	Еритроміцин (<i>Streptomyces erythreus</i>) – макролід	Повідон, кросповідон, кальцію стеарат, коллідон СLM, тальк, крохмаль картопляний, кросповідон, твін 80, Оболонка: АФЦ, титану діоксид, олія рицинова
Ністатин	Ністатин (<i>Streptomyces noursei</i>) – полієновий	Целюлоза мікропротамін, повідон, натрію кроскармелоза, магнію стеарат, ГПМЦ, коповідон, ПЕГ, тригліцериди, полідекстроза, діоксид титану, заліза оксид червоний, заліза оксид жовтий
Тетрациклін, (вкриті оболонкою) 100 мг	Тетрациклін / (<i>Streptomyces aureofaciens</i>) – напівсинтетичний антибіотик	Склад оригінального препарату: цукор, желатин, кальцію стеарат, тальк, крохмаль картопляний, твін-80. Для плівкоутворення: полівініловий спирт, діоксид титану, ПЕГ 3350, тальк, барвники: кармін, жовтий захід, червоний чарівний
		Склад препарату-генерика: ЦМК, тальк, кальцію стеарат, натрію кроскармелоза Для плівкоутворення: спирт полівініловий, макрогол / ПЕГ 3350, діоксид титану, тальк, барвники: жовтий захід і спеціальний червоний

Вибір технології та складу для отримання таблеток, які містять антибіотики, насамперед залежить від технологічних властивостей АФІ, використовуваної технології і обладнання, допоміжних речовин та інших чинників. Так, наприклад, експериментально встановлено, що метод прямого пресування не придатний для субстанції левофлоксацину (протимікробний, антибактеріальний засіб) через його технологічні властивості (відсутність плинності і високий вміст антибіотика в таблетці). У зв'язку з цим використовують метод вологого гранулювання. Як зволожувач експериментально була обрана ГПМЦ. Таким же методом були отримані таблетки з кларитроміцином. Для виготовлення таблеток з еритроміцином як

зволожувач використовується ПВП (табл. 2). Вибір складу також визначається кількістю речовини в таблетці. Так, наприклад, (табл. 2) при отриманні еритроміцину з 100 мг і 500 мг антибіотика в таблетці використовуваний склад представлений різними допоміжними компонентами. При порівнянні двох препаратів тетрацикліну по 100 мг різних виробників (табл. 2) видно, що обидва препарати з одним АФІ і ідентичною масою містять різні склади допоміжних інгредієнтів. Для розуміння технології отримання препаратів у формі таблеток наводимо опис стадій технологічного процесу отримання таблеток, вкритих оболонкою кишковорозчинних, наприклад, таблеток, що містять антибіотики. Кишковорозчинне покриття приводить до захисту лікарського препарату, що міститься в таблетці від дії кислого середовища шлункового соку. Для отримання кишковорозчинного покриття необхідно використання плівкоутворювача – високомолекулярної сполуки з властивостями поліелектролітів. Ці сполуки з великим числом карбоксильних груп здатні до дисоціації в нейтральному і лужному середовищі. У складі покриття використовують як природні речовини (казеїн, шелак, кератин, цетиловий спирт та ін.), так і синтетичні сполуки (АФЦ, бутилстеарат, фталати декстрину, стеаринова кислота та ін.). Нижче наведено технологічну схему отримання таблетованої форми, отриманої методом пресування з попередньою вологою грануляцією. Як і при виготовленні розчинів для парентерального введення, у відповідності до вимог GMP, проводять ряд допоміжних стадій.

Стадія 1. Санітарна підготовка виробництва

Операції технологічного процесу виробництва таблеток проводять у приміщеннях класу чистоти D. Для досягнення класу чистоти D в приміщеннях проводять санітарну підготовку виробництва, згідно з відповідними СОП, яка включає: приготування і використання дезінфікуючих розчинів; підготовку вентиляційного повітря; підготовку приміщень; підготовку обладнання; підготовку технологічного одягу, підготовку персоналу. Санітарна підготовка фіксується в протоколах очистки. Виробничі приміщення, обладнання маркуються ідентифікаційною етикеткою «Очищено». На всіх стадіях технологічного процесу роботу проводять при постійно діючій припливно-витяжній вентиляції. Для запобігання мікробній контамінації таблеток у процесі виготовлення та фасування персонал проводить обробку рук згідно з СОП. Мікробіологічний контроль технологічного одягу і рук персоналу проводять відповідно до СОП. На кожній стадії заповнюють протокол проведення процесу.

Стадія 2. Підготовка сировини, яка використовується при виготовленні таблеток

Приготування води очищеної проводять згідно з СОП. Мікробіологічний контроль води очищеної проводять згідно з ДФУ. Відбір проб сировини здійснюють співробітники ВКЯ згідно з відповідними діючими стандартними методиками. За відповідності всіх показників якості сировини і матеріалів вимогам нормативної документації відбувається передача сировини і матеріалів до виробничого підрозділу (цех). При цьому необхідно промаркувати сировину і матеріали ідентифікаційними етикетками зі статусом «Дозволено до виробництва». Сировина і матеріали, які не пройшли контроль, передаються до ізолятора браку.

Стадія 2.1. Просіювання сировини

Просіювання сировини проводять в цеху для отримання таблеток. На початку операції необхідно перевіряти, щоб обладнання і робоча зона були очищені від попередньої продукції і матеріалів. Перед початком процесу проводять контроль маркування приміщення і обладнання з відповідною відміткою в протоколі просіювання. На приміщенні і обладнанні замінюють етикетку з маркуванням статусу «Очищено» на етикетку з маркуванням статусу «Виготовлення таблеток», на якій вказують назву препарату. Компоненти таблеток: наприклад, субстанції антибіотиків, крохмаль картопляний, кальцію стеарат (ковзна речовина) та ін. зважують. Робота з просіювання проводиться в респіраторах при постійно діючій вентиляції. Зазначені компоненти просівають на ситах відповідного розміру. Сировина після просіювання має бути однорідною, не містити включень і грудок. Після просіювання проводять зважування компонентів. Крохмаль використовується на двох стадіях: для приготування крохмального клейстеру і для приготування грануляту.

Стадія 2.2. Приготування розчину зв'язуючої речовини

Приготування розчину ПВП або ГПМЦ проводять в цеху отримання таблеток. У ємність завантажують воду очищену. При постійному перемішуванні завантажують зв'язуючу речовину і продовжують перемішувати до повного розчинення. Отриманий розчин фільтрують через сито необхідного розміру в підготовлену ємність. Розчин повинен бути однорідний, не містити грудок, механічних домішок або згустків. Ємність закрити кришкою, промаркувати етикеткою і передати на операцію 2.4.

Стадія 2.3. Приготування крохмального клейстеру

Необхідно визначити масу крохмального клейстеру, яку потрібно приготувати для виготовлення регламентної маси таблеток-ядер. Зважують необхідну кількість просіяного крохмалю картопляного і завантажують в

ємність, в яку додають воду очищену і ретельно перемішують до отримання однорідної маси, без грудочок. Ще в одну ємність доливають воду очищену і нагрівають до кипіння, при постійному перемішуванні додають суспензію крохмалю. Вміст ємності при постійному перемішуванні довести до кипіння. Отриманий крохмальний клейстер доводять до кипіння, охолоджують і фільтрують на ситі в ємність. Отриманий клейстер повинен бути однорідним, не мати грудок, згуст-ків і механічних включень. Клейстер передають на стадію 2.4.

Стадія 2.4. Приготування гранулюючого розчину

У ємність з профільтрованим крохмальним клейстером завантажують профільтрований розчин ПВП та Твін-80 в необхідних кількостях. Ретельно перемішують компоненти до отримання однорідної маси гранулюючого розчину. Ємність з гранулюючим розчином закривають кришкою, маркують етикеткою встановленого зразка, і передають на стадію 3.1.

Стадія 3.1. Приготування грануляту

Перед початком процесу проводять контроль маркування приміщення і обладнання з відповідною відміткою в протоколі виготовлення серії. На приміщенні і обладнанні замінують етикетку з маркуванням статусу «Очищено» на етикетку з маркуванням статусу «Виготовлення таблеток» із зазначенням назви таблеток. Необхідну масу просіяного АФІ (антибіотика), просіяний крохмаль картопляний, який залишився, завантажують до ємності апарату для гранулювання. Суміш прогрівають 20 хв до досягнення температури гранульованої суміші 45 ± 5 °С. У ємність подають гранулюючий розчин з регламентованою витратою розчину (мл/хв). Після подачі всього гранулюючого розчину гранулят досушують і охолоджують до температури продукту – 25 ± 5 °С. ВКЯ відбирає пробу грануляту згідно з МКЯ для визначення залишкової вологи в грануляті згідно з СОП. У разі невідповідності показника залишкової вологи встановленим нормативам гранулят досушують. При позитивному результаті аналізу ВКЯ гранулят просівають через сита з встановленим діаметром отворів в проміжні ємності. Проміжні ємності з гранулятом закривають кришками, маркують етикетками і передають на стадію 3.2.

Стадія 3.2. Отримання таблеткової маси

У змішувач завантажують отриманий гранулят з відомою масою, просіяний крохмаль і просіяний кальцію стеарату. Перемішують завантажені компоненти до отримання однорідної маси. Проводять контроль зовнішнього вигляду таблеткової маси. ВКЯ відбирають пробу таблеткової суміші згідно з МКЯ і визначають зміст основної речовини в таблетковій масі. До отримання результатів аналізу таблеткову масу зберігають у змішувачі або при

необхідності вивантажують зі змішувача в чисті сухі ємності, закривають кришками. Ємності маркують. При отриманні позитивних результатів таблеткову масу передають на стадію 4 для отримання таблеток-ядер. На приміщенні і обладнанні замінити етикетку з маркуванням статусу «Очищено» на етикетку з маркуванням статусу «Виготовлення таблеток».

Стадія 4. Отримання ядер таблеток

Таблетування здійснюють на роторній таблетковій машині двовігнутими пуансонами. Під напрямлюючі потоки преса ставлять чисті ємності. Під час пресування таблеток стежать за рівномірним надходженням маси в живильник машини. Пресують ядра таблеток заданих геометричних розмірів: діаметр (мм), висота (мм) з двоопуклою поверхнею. ВКЯ відбирає пробу таблеток згідно з МКЯ і контролюють: зовнішній вигляд, середню масу і відхилення середньої маси, однорідність маси, розпадання, вміст основної речовини. В процесі таблетування необхідно періодично контролювати зовнішній вигляд, середню масу таблеток. Отримані таблетки знепилюють на ручному ситі з необхідними отво-рами. При позитивних результатах аналізів ВКЯ, таблетки передають на стадію 5.2.

Стадія 5.1. Приготування плівкоутворюючої суспензії

На приміщенні і обладнанні замінюють етикетку з маркуванням статусу «Очищено» на етикетку з маркуванням статусу «Виготовлення таблеток» із зазначенням назви препарату. В реактор завантажують ацетон або спирт етиловий, АФЦ. Перемішують полімер у суміші розчинників до повного розчинення АФЦ. Отриманий розчин фільтрують в реактор з мішалкою. Встановлюють величину вакууму від 80 кПа до 60 кПа. В реактор, що містить профільтований розчин АФЦ, завантажують масло касторове і перемішують. В реактор завантажують розчин, що містить розтертий діоксид титану на розчині полімеру АФЦ (в співвідношенні 1: 1). До реактора додають розчин тропеоліну, попередньо розчиненого у воді очищеній. Утворену суспензію в реакторі перемішують. Приготовлена суспензія повинна бути однорідною, без грудок, згустків і механічних домішок, яскраво жовтого кольору.

Стадія 5.2. Нанесення плівкового покриття на ядра таблеток

Процес нанесення плівкового покриття проводять у дражувальному котлі установки для покриття таблеток. У дражувальний котел установки завантажують ядра таблеток, які надійшли зі стадії 4. Закривають люк котла. Включають подачу пари на установку, надають котлу обертання і прогрівають таблетки. Після прогріву в дражувальний котел додають масло вазелінове, після чого проводять вакуумування системи і заповнюють її інертним газом (азотом). Тиск азоту в системі має бути 50 ± 10 кПа.

Встановлюють робочі параметри установки для нанесення покриття: температуру вхідних газів 40 ± 5 °С, температуру вихідних газів 35 ± 5 °С, температуру в барботажній пастці 20 ± 5 °С і швидкість подачі плівкоутворюючої суспензії близько 300 мл/хв. Включають подачу суспензії з реактора в дражувальний котел установки, при цьому мішалка реактора повинна працювати безперервно. Після подачі усієї кількості плівкоутворюючої суспензії відключають насос-дозатор і підсушують таблетки протягом 15–20 хв, відключають подачу пари і охолоджують установку до температури 25 ± 5 °С. Сушку здійснюють в замкнутому циклі осушуючого агента – азота. Після охолодження таблетки вкриті розчинною оболонкою вивантажують з котла в проміжну ємність, яку закривають кришками, маркують. При отриманні дозволу ВКЯ на фасовку передають таблетки на стадію б.

Стадія б. Фасовка, упаковка, маркування

На цій стадії проводять фасовку таблеток в контурні ячeyкові упаковки, упаковку в пачки, упаковку пачок у коробки. Таким чином, представлена технологія складається з таких стадій: просіювання сировини, приготування зв'язуючих речовин, приготування крохмального клейстеру, приготування гранулюючого розчину, приготування грануляту, приготування таблеткової маси, приготування ядер таблеток, приготування плівкоутворюючої суспензії і нанесення розчинної оболонки на ядра таблеток, фасування, маркування і упаковка. При отриманні таблетованої форми з антибіотиками часто використовують метод пресування з попередньою вологою грануляцією (для отримання гранулюючого розчину використовують желатин, при отриманні грануляту – цукор, кроскармелозу, МКЦ та ін.).

Навчальний матеріал теми викладено у підручниках:

1. Технологія ліків промислового виробництва: підруч. для студентів ВНЗ: у 2 ч. / В. І. Чуєшов та ін. 2–ге вид., перероб. і допов. Х. : НФаУ: Оригінал, 2012. 2013. Ч. 1. 694 с. ; Ч. 2. 638 с.
2. Сидоров Ю. І., Чуєшов В. І., Новіков В. П. Процеси і апарати хіміко-фармацевтичної промисловості. Вінниця : Нова Книга, 2010. 816 с.
3. Обладнання технологічних процесів фармацевтичних та біотехнологічних виробництв : навч. посіб. для студ. напряму «Фармація» і «Біотехнологія» ВНЗ / М. В. Стасевич та ін.; за ред. В. П. Новікова; Нац. ун-т «Львів. політехн.», Нац. фармац. ун-т. Вінниця : Нова Книга, 2012. 407 с.

4. Біотехнологія: Підручник / В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін.; Під ред. В.Г. Герасименка. К.: «ІНКОС», 2006. 647 с.
5. Краснопольський Ю.М., Пилипенко Д. М. Фармацевтична біотехнологія: Біотехнології виробництва готових лікарських форм: навчальний посібник для студентів біотехнологічних спеціальностей / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : ТОВ «Друкарня мадрид», 2020. – 279 с.

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ до вивчення теми
«Біотехнологічне виробництво амінокислот»

<i>Навчальна дисципліна</i>	Промислова біотехнологія лікарських засобів
<i>Модуль №</i>	1
<i>Змістовний модуль №</i>	1
<i>Практичне заняття</i>	Біотехнологічне виробництво препаратів метаболітів мікроорганізмів – амінокислот
<i>Курс</i>	5(6)

Ціль практичного заняття:

- знати та вміти характеризувати етапи біотехнологічного одержання L-амінокислот

№ з/п	Основні питання теми
1.	Біотехнологічне одержання L-амінокислот.

Зміст теми

Промисловий синтез біологічно активних речовин – продуктів життєдіяльності мікроорганізмів набув надзвичайно великого значення з огляду на потребу в них народного господарства. Він здійснюється різними методами, головним з яких є мікробіологічний. Але поряд з біосинтезом багато біологічно активних речовин можна одержати методами тонкого органічного синтезу. Тому вибір конкретного методу одержання продукту визначається порівняльною економічною ефективністю хімічного і біологічного (мікробіологічного) способів виробництва, які взаємно доповнюють один одного. В результаті промисловий синтез продуктів мікробного метаболізму неможливий без використання на тій чи іншій стадії методів хімічної технології, які знайшли широке розповсюдження в тонкому органічному синтезі. У свою чергу, останній теж не може обійтись без деяких технологічних стадій, які здійснюються за допомогою мікроорганізмів або виділених з них ферментів і ферментних систем.

Біотехнологічне одержання L-амінокислот

Промисловий синтез біологічно активних речовин — продуктів життєдіяльності мікроорганізмів набув надзвичайно великого значення з огляду на потребу в них народного господарства. Він здійснюється різними методами, головним з яких є мікробіологічний. Але поряд з біосинтезом багато біологічно активних речовин можна одержати методами тонкого органічного синтезу. Тому вибір конкретного методу одержання продукту визначається порівняльною економічною ефективністю хімічного і біологічного (мікробіологічного) способів виробництва, які взаємно доповнюють один одного. В результаті промисловий синтез продуктів мікробного метаболізму неможливий без використання на тій чи іншій стадії методів хімічної технології, які знайшли широке розповсюдження в тонкому органічному синтезі. У свою чергу, останній теж не може обійтись без деяких технологічних стадій, які здійснюються за допомогою мікроорганізмів або виділених з них ферментів і ферментних систем.

Амінокислоти — це азотмісткі сполуки, молекули яких містять карбоксильну (—COOH) і амінну (—NH_2) групи, що мають здатність реагувати між собою з утворенням ковалентного пептидного зв'язку. Вони є головним будівельним матеріалом організму, з якого формуються пептиди і білки, тобто вони є мономерними одиницями білків. Порядок включення амінокислот у поліпептидний ланцюг визначається генетичним кодом (через іРНК).

Більшість мікроорганізмів і рослин можуть синтезувати усі (20) амінокислоти. Люди і тварини такої здатності не мають. В їх організмі можуть синтезуватись лише 10 амінокислот. Це замінні амінокислоти. Інші 10 амінокислот не синтезуються в організмі тварини і людини і мають надходити ззовні — з їжею. Вони одержали назву незамінних. Серед них такі амінокислоти, як лізин, метіонін і триптофан, які ще називаються критичними завдяки своїй біологічній дії. Незамінні амінокислоти — лізин, метіонін, триптофан, гістидин, лейцин, ізолейцин, фенілаланін, треонін, валін, аргінін. Дефіцит в раціоні хоча б однієї із цих амінокислот викликає сповільнення росту дітей і тварин та сприяє виникненню різних патологій. Крім цього, амінокислоти (як замінні, так і незамінні) є важливою сировиною для забезпечення багатьох біотехнологічних процесів, а також використовуються в медицині і харчовій промисловості.

Промислове виробництво амінокислот базується в основному на трьох процесах: гідроліз природної білоквмісної сировини (рослинного і тваринного походження), хімічний та мікробіологічний синтез. Одержання амінокислот гідролізом білкових речовин – найдавніший і найменш ефективний метод. Основними його недоліками є: висока вартість одержаних амінокислот, обмеженість сировинних ресурсів тощо.

Серед методів одержання амінокислот у промисловому масштабі найбільше значення мають мікробіологічні і хімічні. У сучасній світовій практиці за допомогою мікробного синтезу одержують близько 60 % усього об'єму вироблених амінокислот.

Хімічний синтез амінокислот досить ефективний. Він дає можливість одержувати сполуки будь-якої структури й організувати виробництво з високим рівнем автоматизації. Тепер розроблено і реалізовано у промисловому масштабі виробництво багатьох амінокислот методом органічного синтезу — метіоніну, лізину, глютамінової кислоти, триптофану, гліцину тощо.

За сучасними технологіями здійснюється також синтез індивідуальних амінокислот з високим виходом і високим ступенем очищення. Однак цей метод має низку суттєвих недоліків.

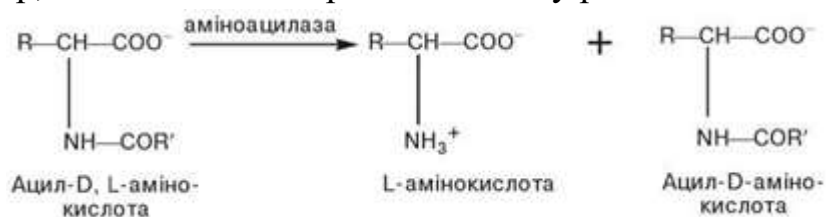
Так, сучасними методами тонкого органічного синтезу можна одержати D- і L-форми амінокислот у будь-яких кількостях, однак вони знаходяться у вигляді рацематів, тобто рівних за масою сумішей L-і D-амінокислот, молекули яких в L- і D-формі являють собою дзеркальне відображення одна одної. У хімічних реакціях ці ізомери не відрізняються один від одного. Але, як відомо, в організмі тварин (людей)

використовується тільки L-амінокислота. Другий ізомер (D-амінокислота) не має біологічної активності і тому не може брати участі в біосинтезі білка.

Білки ссавців побудовані виключно з одного типу амінокислот — L-форми. Присутність D-амінокислоти в готовому продукті завжди небажано не тільки через те, що вона є баластом, але й тому, що деякі амінокислоти мають токсичні властивості. Винятком є гліцин і метіонін. Для першого не існують оптично активні ізомери, а у другого D- та L-форми засвоюються організмом людини і тварини однаково.

Крім цього, виробництво амінокислот методом органічного синтезу передбачає здійснення великої кількості технологічних операцій. Реалізація практично кожної з них вимагає певного обладнання. Технологія такого виробництва у більшості випадків направлена на використання достатньо токсичних речовин, високоочищених реагентів і здійснення стадії розділення рацематів, що утворюються. Методи ж розділення рацемічної суміші, у свою чергу, досить складні і потребують значних витрат, а в окремих випадках для деяких амінокислот їх взагалі не розроблено.

Розділення рацемічної суміші на L- і D-амінокислоти. З існуючих методів розділення рацемічної суміші на складові ізомери найбільш придатним є ферментативний метод, що ґрунтується на використанні пліснявої аміноацилази. Як вихідну сировину використовують ацильовані D-, L-ізомери амінокислоти, одержані за допомогою хімічного синтезу, і впливають на них аміноацилазою. Фермент вибірково гідролізує тільки ацил-L-ізомер, відщеплюючи від нього об'ємну ацильну групу. В результаті утворюється відповідна L-амінокислота, яка має вищу розчинність, ніж ацил-D-ізомер, що залишився нерозщепленим у розчині.



В результаті ферментативного гідролізу утворюється суміш, яка складається із L-амінокислоти і ацил-D-ізомера амінокислоти. Вона легко розділяється, оскільки її компоненти мають різну розчинність, і виділяється L-амінокислота. Ацил-D-амінокислота, яка залишається, при підігріванні рацемізується, тобто знову переходить у суміш ацильованих L, D-амінокислот і процес повторюється спочатку. Таким чином, єдиним продуктом є L-амінокислота.

Оскільки аміноацилаза має чітку специфічність лише до будови ацильної частини і слабку специфічність щодо будови бічного ланцюга

амінокислоти, вона може бути використана для розділення багатьох амінокислот.

Вперше на промисловому рівні розділення рацемічної суміші на її складові ізомери було здійснено в Японії компанією «Танабе Сейяку» в 1969 р. Спочатку використовувався нативний фермент, а потім іммобілізований, завдяки якому економічна ефективність процесу виросла у півтора раза. Тепер компанія здійснює на промисловому рівні виробництво п'яти L-амінокислот, з яких чотири є незамінними (метіонін, валін, фенілаланін, триптофан).

Комерційні препарати аміноацилази іммобілізовані методом адсорбції на ДЕАЕ – сефадексі за рахунок іонних взаємодій (японська фірма «Танабе Сейяку») і шляхом включення ферменту у порожнисті нитки триацетату целюлози (італійська фірма «Снам Проджетті»).

Мікробний синтез – найбільш перспективний і економічно вигідний спосіб виробництва амінокислот. Він є альтернативою хімічному синтезу. За допомогою цього методу можна одержати майже всі протеїногенні амінокислоти. Принцип мікробного методу полягає в аеробному вирощуванні мікроорганізмів у поживних розчинах, які містять різні джерела вуглецю, азоту і мінеральних солей та ростових речовин. Мікробний метод має низку переваг перед хімічним. Перш за все, ферментна система мікробної клітини утворює тільки біологічно активний L-ізомер, що забезпечує його виділення і очищення та випуск технічних препаратів з низькою вартістю і в достатній кількості.

Основою створення крупнотоннажного виробництва L-амінокислот мікробіологічним методом було відкриття японськими вченими феномена надсинтезу екстрацелюлярних амінокислот ауксотрофними бактеріальними мутантами із родів *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* тощо. Ауксотрофні мутанти — це клітини мікроорганізмів, які, з одного боку, втратили здатність самостійно синтезувати необхідні для росту і розвитку різні амінокислоти, а з іншого — набули здатності до надсинтезу цільової амінокислоти. Такі мутанти можна одержати шляхом впливу різних мутагенів фізичної і хімічної природи на вихідну культуру мікроорганізмів з подальшою селекцією штаму за наперед заданими ознаками, або методом генетичної інженерії.

Отже, спеціально підібрані, відселекціоновані, а інколи і сконструйовані методами генетичної інженерії штами-продуценти в процесі життєдіяльності, за звичай на різних стадіях розвитку, здійснюють так званий надсинтез L-амінокислот, тобто виробляють їх у кількостях, що набагато

перевищують потребу самих клітин. Надлишок L-амінокислот екскретується в культуральну рідину, звідки їх і добувають.

Промислове виробництво L-амінокислот за допомогою мікроорганізмів можна здійснювати за двома технологічними схемами. В основному вони відрізняються стадією одержання культуральної рідини. У першій передбачається виробництво культуральної рідини за два етапи (двоступінчастий спосіб), а у другій — за один етап (одноступінчастий спосіб).

Двоступінчастий спосіб ґрунтується на використанні як сировини одного із попередника біосинтезу необхідної амінокислоти, який може одержуватись хімічним або біологічним методом.

Одержання попередника — це перший ступінь виробництва. До нього належить і біосинтез ферментного препарату (як правило, мікробного походження), за участю якого відбуватиметься трансформація попередника в цільову амінокислоту.

Друга стадія — це власне процес трансформації попередника в амінокислоту за допомогою ферментних систем мікроорганізма, вирощеного на першій стадії.

Одноступінчастий спосіб синтезу амінокислот найбільш розповсюджений і ґрунтується на культивуванні чітко визначеного штаму-продуцента цільової амінокислоти на середовищі певного складу при відповідних параметрах процесу ферментації. З цією метою, як правило, вибирають поліауксотрофні мутанти.

При виробництві амінокислот у вигляді високоочищених кристалічних препаратів після завершення ферментації проводять виділення клітин продуцента з культуральної рідини. Цільову амінокислоту виділяють із культуральної рідини за допомогою іонного обміну або методом осадження. Елюати або маточні розчини концентрують вакуум-випарюванням, а технічні кристали, які утворились, очищають шляхом перекристалізації із насиченого розчину. Завершується процес одержання кристалічного препарату, як правило, вакуум-сушкою очищених кристалів і їх упаковкою.

Побічними продуктами такого виробництва можуть бути різні кормові препарати, які виробляються на основі різних відходів виробництва — маточні розчини амінокислоти, біомаса продуцента, промивні води тощо, які висушуються до залишкової вологості близько 10 %.

При випуску кормових препаратів з невисоким вмістом основної амінокислоти (не більше 10 %) технологія їх виробництва передбачає тільки стабілізацію розчину культуральної рідини перед вакуум-упарюванням,

концентрування сухих речовин культуральної рідини, стандартизацію розчину шляхом додавання наповнювача, сушку готового продукту і його упаковку.

При одержанні технічних або кормових препаратів з підвищеним вмістом основної речовини (амінокислоти) додатково відділяють клітини продуцента і частково концентрують амінокислоти в нативному розчині методом іонного обміну або осадження.

Недоліки мікробіологічного способу одержання амінокислот також полягають у специфіці застосування мікробіологічних методів. Крім цього, ми не завжди володіємо необхідними знаннями про метаболізм клітини і шляхи його регуляції.

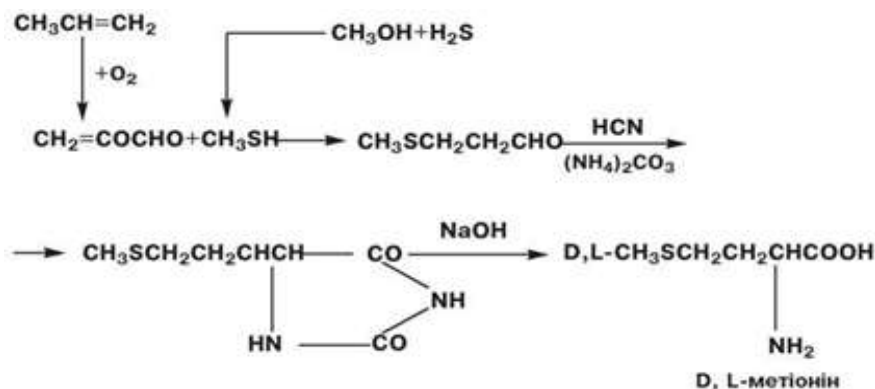
У разі, коли шлях прямої ферментації не достатньо розроблений або економічно малоефективний, амінокислоти отримують хіміко-мікробіологічним (комбінованим) шляхом, при якому вихідна сполука утворюється в результаті хімічних реакцій, а кінцева стадія здійснюється мікроорганізмами.

Одержання амінокислот з білкових гідролізатів.

Цей спосіб полягає у гідролізі (кислотному, лужному, ферментативному) деяких найбільш доступних природних білків. До них належать відходи м'ясної промисловості, казеїн молока, клейковина пшениці та інші. Недоліками цього способу є: обмеженість і нестандартність джерел сировини, багатоступенева хімічна обробка, пов'язана з виділенням амінокислот і їх очищенням. Крім того, гідроліз під дією мінеральних агентів призводить до часткового руйнування таких цінних амінокислот, як триптофан, треонін, цистеїн, серин.

Біотехнологія одержання L-метіоніну

Метіонін одержують синтетичним шляхом. Із акролеїну в результаті досить складних і багатостадійних хімічних перетворень одержують D, L-метіонін.



Для виробництва 1 т D, L-метіоніну витрачається майже 0,6 т акролеїну. Розділення рацемата технологією не передбачено. За допомогою

цього способу у колишньому Радянському Союзі одержували весь обсяг метіоніну.

Технологія одержання L-метіоніну з використанням розчинної аміноацилази для розділення рацемічної суміші була вперше впроваджена у виробництво японською компанією «Танабе Сейяку». В 1969 р. вона розпочала крупнотоннажне виробництво L-метіоніну з використанням іммобілізованої на ДЕАЕ-сефадексі аміноацилази в реакторі з нерухомим шаром.

Комерційні препарати аміноацилази іммобілізовано методом адсорбції на ДЕАЕ-сефадексі за рахунок іонних взаємодій. Іммобілізація аміноацилази на ДЕАЕ-сефадексі здійснюється так: 1000 л сефадексу переміщують протягом 10 год з 1100–1700 л водного розчину ферменту (тобто у співвідношенні Ф : Н 1,1–1,7 : 1) при температурі 35 оС і рН 7. Суміш фільтрують, іммобілізований препарат промивають декілька разів водою.

Активність іммобілізованого ферменту становить 50–60 % від нативного. Час напівінактивації іммобілізованої аміноацилази за оптимальних умов становить близько 65 діб. Вихід метіоніну в такій установці досягає 91 % теоретичного. ДЕАЕ-сефадекс може використовуватись в установці понад 8 років, а регенерація каталізатора здійснюється шляхом додавання свіжого розчину аміноацилази. Виробництво автоматизовано.

Концентрація ацил-D, L-метіоніну в рацемічній суміші на вході в реактор становить 0,2 моль/л. Розчин надходить в реактор зверху зі швидкістю 2000 л/год. Після відокремлення L-метіоніну ацил-D-метіонін, що залишився у розчині, рацемізують з утворенням ацил-D, L-ізомерів і повертають для гідролізу і виділення L-метіоніну.

Перевага нової біотехнології полягає у її відносній простоті і нескладності управління.

Біотехнологія виробництва L-триптофану

Вміст триптофану в рослинних білках невеликий. Використовується L-триптофан як кормова добавка до раціонів сільськогосподарських тварин, а високоочищені його препарати з вмістом основної речовини не менше 99 % знайшли застосування в медицині у виробництві компонентів лікувального харчування і в різних біохімічних дослідженнях.

Мікробний синтез L-триптофану у промислових обсягах здійснюється як за допомогою спороносних штамів-мутантів бактерій *Vac.subtilis*, недостатніх по тирозину і фенілаланіну (одноступінчастий

спосіб), так і шляхом трансформації різних попередників в L-триптофан під дією ферментних систем деяких дріжджів (двоступінчастий спосіб).

Одноступінчастий спосіб включає наступні етапи: культивування вихідного штаму-продуцента, виділення і очищення одержаного триптофану та виробництво на його основі кормових і високоочищених препаратів.

Продуктивність мутанта-продуцента складає до 10 г триптофану в 1 л культуральної рідини.

Кормовий концентрат триптофану (ККТ) одержують без відокремлення біомаси продуцента шляхом вакуум-випарювання культуральної рідини до 30–40 % вмісту сухих речовин з подальшим висушуванням.

Висококонцентровані препарати триптофану одержують з фільтрату культуральної рідини після відділення клітин продуцента. Таким чином одержують технічний препарат триптофану з вмістом амінокислоти до 45 % від вмісту в культуральній рідині. Одержують також високоочищені препарати триптофану з вмістом амінокислоти до 99 %.

Двоступінчастий шлях мікробного синтезу L-триптофану ґрунтується на проведенні трансформації антранілової кислоти (попередника) під дією ферментних систем *Candidia utilis* в L-триптофан і одержанні культуральної рідини з вмістом його до 6 г/л.

Крім цього, розроблена технологія виробництва культурального триптофану за допомогою технологій рекомбінантних ДНК. Суть методу полягає в тому, що при конструюванні рекомбінантної (гібридної) ДНК на базі плазмиди *E.coli*, до складу останньої вводиться не один ген, а триптофановий оперон. Його клонування у складі рекомбінантної молекули ДНК, яка складається із фрагменту ДНК з триптофановим опероном і плазмідного вектора *E.coli*, супроводжується експресією. У триптофановому опероні міститься п'ять генів, що кодують п'ять ферментів, які беруть участь в утворенні з хоризмату (попередника) через проміжні сполукию

Концентрація ферментів, які кодуються генами триптофанового оперона, що входить до плазмідного вектора *Co1E1*, орієнтовно в 20 разів перевищує їхній вміст у звичайних клітинах *E.coli*. Це пов'язано з тим, що кількість гібридних молекул плазмиди *Co1E1* у клітині *E.coli* може досягати кількох десятків копій.

Біотехнологія одержання L-лізину

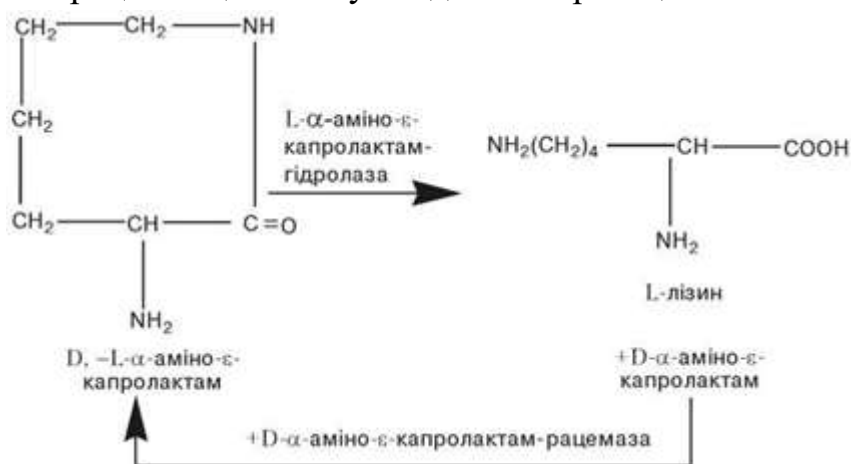
За вмістом лізину визначається біологічна цінність білка. Він сприяє секреції харчотравних ферментів і транспорту кальцію у клітини, покращує загальний азотний баланс в організмі.

Хімічний метод. Незамінну амінокислоту L-лізин можна одержувати шляхом хімічного синтезу із циклогексанону з подальшим розділенням рацемічної суміші і виділенням L-форми.

Розділення рацемічної суміші із D- і L-форм лізину ґрунтується на різній розчинності солей, одержаних при взаємодії рацемату з L-винною кислотою. Сіль D-лізину і винної кислоти найменш розчинна. Після розділення D- і L-ізомерів лізину солі руйнують, L-форму звільняють від L-винної кислоти за допомогою іонного обміну на колонках, а D-лізин через стадію утворення аддукту з саліциловим альдегідом направляють на рацемізацію.

Комбінований або хіміко-ензиматичний метод запропонований у 70-і роки минулого століття японською фірмою «Тойо Рейон» («Торей»).

Процес відбувається за участю двох ферментів – L-гідролази і D-рацемази. Перший селективно гідролізує D, -L- α -аміно- ϵ -капролактam з утворенням L-лізину і D- α -аміно- ϵ -капролактаму. Останній в результаті впливу другого ферменту – рацемази (D- α -аміно- ϵ -капролактam-рацемази) піддається рацемізації і знову вводиться в реакцію:



Продуцентами гідролази L- α -аміно- ϵ -капролактаму є штами дріжджів роду *Cryptococcus*, *Candidia*, *Trichosporon*, а активаторами ферменту є двовалентні іони марганцю і цинку. Фермент рацемазу D- α -аміно- ϵ -капролактаму можна одержати при культивуванні бактерій родів *Achromobacter*, *Flavobacterium* та ін.

Обидва ферменти, які використовуються в технології, іммобілізовані методом адсорбції на іонообмінному цукрі.

Мікробіологічний метод. В усьому світі при отриманні кормового лізину перевагу надають мікробіологічному методу.

Перше підприємство з виробництва лізину за допомогою мікроорганізмів було створене у Японії в середині 50-х років минулого сторіччя. В подальшому аналогічне виробництво налагоджено в Голландії і США. У

Франції була створена велика промислова фірма з виробництва цієї амінокислоти — «Євролізин».

L-лізин синтезується мікроорганізмами двома принципово різними шляхами.

Мікрородорості, гриби, дріжджі синтез лізину здійснюють із α -кетоглутарової кислоти через α -аміноадипінову кислоту – аміноадіпінатний (АА) шлях. Регуляція активності ферментів цього шляху досліджена недостатньо, тому мутантів, здатних до надсинтезу лізину, серед цих мікроорганізмів не одержано. Для бактеріальних культур, вищих рослин, деяких водоростей характерний інший шлях біосинтезу лізину – через α -діамінопімелінову кислоту — діамінопімеліновий (ДАП) шлях, який починається з аспарагінової кислоти. Крім лізину, із аспартату утворюються також інші незамінні амінокислоти – метіонін, треонін і ізолейцин (рис. 19.1). Продуценти лізину – глутаматпродукуючі коринібактерії *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, мають мутантні форми, які здійснюють надсинтез L-лізину.

Ще в 50-і роки минулого сторіччя японські вчені в результаті впливу мутагеном (ультрафіолетовим промінням) на суспензію бактеріальних клітин *Micrococcus glutamicus* одержали надпродуценти лізину. В колишньому Радянському Союзі надпродуценти лізину були одержані в 1964 р.

У промисловому виробництві лізину методом мікробного синтезу, де як продуцент використовується *Corynebacterium glutamicum*, відбувається інгібування продуктами реакції — лізином і треоніном, які, накопичуючись одночасно, за принципом зворотного зв'язку пригнічують активність аспартаткінази, що каталізує перетворення аспарагінової кислоти в семіальдегід аспарагінової кислоти, а отже, інгібує подальші етапи біосинтезу лізину. Для зняття обумовленої регуляторними механізмами заборони на надсинтез лізину був одержаний ауксотрофний штам (мутант), у якого відсутній фермент гомосериндегідрогеназа, що каталізує утворення із семіальдегіда аспарагінової кислоти гомосерину, який інгібував біосинтез треоніну. Для росту мутанта (ауксотрофного штаму) необхідно екзогенне надходження у поживне середовище треоніну. Повільне введення в середовище екзогенного треоніну попереджувало включення механізму інгібування аспартаткінази продуктами реакції і біосинтез лізину у цього мутанта відбувався з максимальною швидкістю. Щоб примусити продуцент виробляти лізин і метіонін одночасно, ушкоджують механізм, який здійснює інгібування аспартаткінази продуктами реакції. Мутація гена, який кодує синтез аспартаткінази, приводить до його функціонування навіть при

надлишкової кількості лізину у середовищі. У цьому випадку відбувається максимальне накопичення треоніну і лізину.

Виробництво лізину включає чотири головних етапи:

- підготовка поживних субстратів і їх стерилізація;
- вирощування посівного матеріалу;
- головна ферментація;
- зневоднення продуктів ферментації шляхом вакуумного випарювання з подальшим висушуванням упареного розчину у розпорощувальній сушарці або видалення кристалічного лізину.

Основною сировиною для виробництва кормового лізину є патока і кукурудзяний екстракт. Культивування продуцентів і біосинтез лізину проводиться у промислових біореакторах (ферментерах) об'ємом 50, 63 і 100 м³. Після закінчення ферментації готова культуральна рідина містить, крім лізину й інших продуктів метаболізму, біомасу продуцента і залишки поживного середовища. Вміст сухої речовини у ній становить 10–13 %, в т. ч. лізину 2–3 % і 0,8–1,8 % бактеріальної біомаси.

Залежно від конкретної мети виробництва на основі культуральної рідини можна одержати такі препаративні форми лізину: рідкий концентрат лізину (РКЛ), сухий кормовий концентрат лізину (ККЛ), а також висококонцентровані кормові і високоочищені кристалічні препарати для харчової і медичної промисловості.

Технологія отримання глютамінової кислоти

L-глютамінова кислота – перша амінокислота, отримана на основі промислового мікробіологічного синтезу. Вона є найважливішою амінокислотою рослинних і тваринних білків, не будучи незамінною. Можливість отримання глютамінової кислоти з вуглеводів на основі мікроорганізмів уперше було продемонстровано в 1957 р. японськими дослідниками М. Кіносита, С. Асаї та ін. Продукувати глютамінову кислоту здатні дріжджі, мікроскопічні гриби, бактерії.

Бактерії забезпечують найбільший вихід по відношенню до використаного вуглецевого субстрату (не менше 40...50%).

Промислове значення мають бактеріальні культури (*Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*). Надсинтез кислоти у диких штамів можливий у спеціальних фізіологічних умовах за гальмування швидкості росту і збільшення проникності клітинної мембрани для глютамінової кислоти. Такі умови забезпечує певна концентрація біотину в середовищі (1...5 мкг/л), а також наявність деяких антибіотиків. Внутріклітинна концентрація глютамінової кислоти знижується внаслідок

екскреції продукту в навколо клітинне середовище, тому регуляція синтезу кінцевим продуктом слабшає.

Надпродукція глютамінової кислоти пов'язана також з високою концентрацією амонію в середовищі.

Глютамінова кислота в основному використовується у фармакології і харчовій промисловості, тому завдання стадії постферментації – отримання високоочищених препаратів.

Важливі властивості глютамінової кислоти – бути захисним фактором при отруєннях внутрішніх органів (печінки, нирок), послаблювати дію токсинів і підсилювати ряд фармакологічних препаратів. У даний час виробництво глютамінової кислоти є великотоннажним біотехнологічним виробництвом (близько 400000 т/рік). Обсяги її виробництва зростають з кожним роком. Провідними країнами – виробниками глютамінової кислоти і глютамату натрію є Японія і США.

Навчальний матеріал теми викладено у підручниках:

1. Технологія ліків промислового виробництва: підруч. для студентів ВНЗ: у 2 ч. / В. І. Чуєшов та ін. 2–ге вид., перероб. і допов. Х. : НФаУ: Оригінал, 2012. 2013. Ч. 1. 694 с. ; Ч. 2. 638 с.
2. Сидоров Ю. І., Чуєшов В. І., Новіков В. П. Процеси і апарати хіміко-фармацевтичної промисловості. Вінниця : Нова Книга, 2010. 816 с.
3. Обладнання технологічних процесів фармацевтичних та біотехнологічних виробництв : навч. посіб. для студ. напряму «Фармація» і «Біотехнологія» ВНЗ / М. В. Стасевич та ін.; за ред. В. П. Новікова; Нац. ун-т «Львів. політехн.», Нац. фармац. ун-т. Вінниця : Нова Книга, 2012. 407 с.
4. Біотехнологія: Підручник / В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін.; Під ред. В.Г. Герасименка. К.: «ІНКОС», 2006. 647 с.
5. Краснопольський Ю.М., Пилипенко Д. М. Фармацевтична біотехнологія: Біотехнології виробництва готових лікарських форм: навчальний посібник для студентів біотехнологічних спеціальностей / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : ТОВ «Друкарня мадрід», 2020. – 279 с.

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ до вивчення теми
«Біотехнологічне виробництво вітамінів»**

<i>Навчальна дисципліна</i>	Промислова біотехнологія лікарських засобів
<i>Модуль №</i>	1
<i>Змістовний модуль №</i>	1
<i>Практичне заняття</i>	Біотехнологічне виробництво препаратів метаболітів мікроорганізмів – вітамінів.
<i>Курс</i>	5(6)

Ціль практичного заняття:

- знати та вміти характеризувати етапи біотехнологічного одержання вітамінів

№ з/п	Основні питання теми
1.	Біотехнологія одержання вітамінів.

Біотехнологія одержання вітамінів

Забезпечення потреб людини і сільськогосподарських тварин достатньою кількістю вітамінів є важливою проблемою, яку в сучасних умовах неможливо вирішити лише за рахунок використання традиційних природних вітамінних ресурсів. Крім того, вітаміни, їх коферментні форми і похідні дедалі ширше застосовуються як препарати для лікування різних форм гіповітамінозів і авітамінозів, а також інших захворювань.

Термін «вітаміни» був запропонований Функом ще на початку минулого сторіччя. Сьогодні до вітамінів належить велика група низькомолекулярних органічних сполук різної хімічної природи, які присутні в організмі у незначних концентраціях, і як компоненти ферментних систем, що каталізують відповідні реакції. Вищі тварини і людина в основному потребують одержання готових вітамінів, а серед мікроорганізмів широко розповсюджена здатність до їх синтезу.

До вітамінів включають за прийнятою літерною класифікацією: в групу В (В1 - тіамін, В2 - рибофлавін, В3 - пантотенова кислота, В5 - нікотинова кислота, В6 - піридоксин, В8 чи В9 - фолієва кислота, В12 - ціанкобаламін, Н - біотин); вітамін С (аскорбінова кислота); групи А - ретиноли і провітамін А - в-каротин; D (кальцифероли і провітаміни - ергостерин, холестерин); Е (токофероли); К (нафтохінони); їх коферментні форми та різні інші похідні.

Вітаміни групи В ще називають кофакторними вітамінами, тому що вони входять у структуру коферментів. Ці вітаміни беруть участь в метаболізмі як вищих організмів, так і мікробних клітин. Механізм дії інших вітамінів вивчений недостатньо. Деякі з них, наприклад С, А, D, не функціонують в мікробних клітинах, хоча провітаміни останніх двох - в-каротин і ергостерин - беруть участь у життєдіяльності певних типів мікроорганізмів і ними синтезуються.

Вітаміни одержують як хімічним, так і мікробіологічним синтезом.

Практичне використання здатності мікроорганізмів до біосинтезу вітамінів розпочалося в 30-40-і роки минулого століття. В першу чергу звернули увагу на пивні і пекарські дріжджі як джерело вітамінів — В1, D2, С тощо.

Однак широкі перспективи щодо використання мікроорганізмів для одержання вітамінів з'явилися пізніше завдяки виявленню у них здатності до так званого надсинтезу вітамінів, тобто до утворення і накопичення в культурах деяких видів набагато більшої їх кількості, ніж потрібно для виконання каталітичних функцій. На це явище вперше звернув увагу в 30-х роках ХХ ст. Гільермон, який виявив накопичення рибофлавіну в культурі

гриба ЕгетоШесіт азЪуїі. Його роботи показали, що мікроорганізми можуть бути такою собі фабрикою вітамінів, і викликали в усьому світі посилений інтерес до питань їх мікробіологічного синтезу.

Незабаром надсинтетички рибофлавіну були знайдені і серед інших груп мікроорганізмів — дріжджів, бактерій, міцеліальних грибів. Потім була виявлена здатність до підвищеного синтезу інших вітамінів — В12 (у актиноміцетів, пропіоновоки-слих, метанових і деяких інших груп бактерій), каротиноїдів (у гетероталічних мукорових грибів), ергостерину (у деяких саха-роміцетів).

Прогрес у вивченні хімізму біосинтезу вітамінів дав можливість використовувати для їх одержання не тільки активні продуценти, але й мікроорганізми, здатні здійснювати окремі етапи синтезу. Наприклад, при виробництві вітаміну С оцтовокислі бактерії використовуються для трансформації сорбіту в сорбозу.

Завдяки встановленню механізмів вітаміногенезу одержані мутанти продуцентів спроможні до надсинтезу вітамінів, що сприяло створенню більш економічних способів виробництва продуктів порівняно з існуючими. Є дані про одержання мутантів, які накопичують у середовищі вітаміни В1, В6, біотин.

Крім вітамінів, мікробіологічним шляхом одержують інші речовини вітамінної природи, передусім коферменти. Дедалі ширше їх застосовують у медичній практиці, а мікробіологічний синтез в багатьох випадках єдиний або найбільш прийнятний спосіб їх одержання.

Нові перспективи практичного використання мікроорганізмів як синтетиків вітамінів відкриває використання в мікробіологічній промисловості нетрадиційних видів вуглецевих субстратів (вуглеводні, нижчі спирти і кислоти) - нехарчових субстратів.

Встановлено, що вуглець належить до факторів, задіяних у регуляції процесів вітаміногенезу, і використання вуглецевих субстратів забезпечує підвищення рівня синтезу цілої низки сполук вітамінної природи (рибофлавіну, ергостерину, пантотенової кислоти, ФАД, НАД, вітаміну В6, коензиму С, вітаміну В12).

На сьогодні існують такі напрями вирішення проблеми одержання вітамінів мікробіологічним синтезом:

1. Одержання вітамінів і коферментів з використанням мікроорганізмів-продуцентів, в основному надсинтетиків, і спеціальних режимів їх культивування. До цієї категорії належать уже існуючі біотехнології одержання вітамінів В2, В12, каротиноїдів.

2. Одержання індивідуальних вітамінів і коферментів з біомаси мікроорганізмів, яку вирощують у промислових масштабах на різних вуглецевих субстратах, або використання її як комплексних вітамінних препаратів. Сьогодні, коли в усьому світі існує крупнотоннажне виробництво білка одноклітинних, цей напрям набуває великого значення, тому що мікробна білкова біомаса може слугувати комплексним джерелом вітамінів у тваринництві, а також використовуватися для виділення деяких синтезованих продуцентами білка сполук вітамінної природи.

3. Використання мікроорганізмів для здійснення окремих стадій процесу синтезу вітамінів. Можливості використання для вирощування таких мікроорганізмів нових видів нехарчової сировини розширюють межі цього напрямку.

Варто наголосити, що багато вітамінів успішно одержують хімічним синтезом. Однак для деяких вітамінів і багатьох ко-ферментів мікробіологічний спосіб їх одержання поки що залишається єдиним або найбільш ефективним. В деяких випадках мікробіологічний синтез може успішно конкурувати з хімічним, особливо коли немає необхідності виділяти окремі вітаміни, наприклад при використанні їх у тваринництві.

Каротиноїди - це ізопреноїдні сполуки, які синтезуються багатьма пігментними мікроорганізмами із родів *Aleuria*, *Blakeslea*, *Corynebacterium*, *Flexibacter*, *Fusarium*, *Halobacterium*, *Phycomyces*, *Pseudomonas*, *Rhodotorula*, *Sarcina* та ін. Всього описано майже 500 каротиноїдів.

З однієї молекули β -каротину при гідролізі утворюються дві молекули вітаміну А1. Це відбувається, наприклад, у кишечнику людини.

ВІТАМІН А1

Каротиноїди локалізуються у вигляді складних ефірів і глікозидів у клітинній мембрані мікроорганізмів або у вільному стані - в ліпідних гранулах у цитоплазмі. Каротиноїд «ретиналь», наприклад, у галофільного виду *Halobacterium salinarum* сполучений з білком через залишок лізину. Він бере участь в синтезі АТФ завдяки генерації трансмембранного потенціалу. В цілому основна функція каротиноїдів - захисна. Їхньому біо-синтезу в клітинах сприяє світло.

Як продуценти каротиноїдів можна використовувати бактерії, дріжджі, міцеліальні гриби. Найчастіше використовують зигоміцети *Blakeslea trispora* і *Choanephora conjuncta*. При спільному культивуванні вони можуть утворювати 3-4 г каротину на 1 л середовища.

Поживні середовища для них досить складні і включають джерела вуглецю, азоту, вітамінів, мікроелементів і спеціальних стимуляторів. Останні доцільно вносити в культуральне середовище в кінці трофази.

Спочатку штами вирощують порізно, а потім - спільно при температурі 26 °С і посиленій аерації з подальшим перенесенням в основний ферментер. Умови культивування зберігаються. Тривалість ферментації - 6-7 днів. Каротиноїди вилучають ацетоном (можна будь-яким іншим полярним розчинником) і переводять у неполярний розчинник. У випадках вилучення білково-каротиноїдних комплексів використовують поверхнево-активні речовини в концентрації 1-2 %. З метою очищення і більш тонкого розділення гомологів використовуються методи хроматографії або зміни розчинників. Вітамін А1 порівняно легко можна одержати з β-каротину при гідролізі.

У разі виготовлення каротиновмісної біомаси для згодовування тваринам і птиці можливе поєднання використання її з вітаміном А чи без нього. Для застосування вітаміну А з лікувальною метою його виготовляють в капсулах для перорального вживання.

ВІТАМІН D — це група споріднених сполук, в основі яких знаходиться ергостерин, що виявлений в клітинних мембранах еукаріот. Тому, наприклад, пекарські чи пивні дріжджі використовують для одержання ергостерину як провітаміну з антирахітичною дією. Вміст ергостерину в дріжджових клітинах коливається у межах 0,2-11 %.

За нестачі в організмі гормона 1,25 — дігідроксіхолекальциферолу, попередником якого є вітамін D3, у дітей розвивається рахіт (аналогом рахіту в дорослих є остеомаліяція).

Трансформація ергостерину у вітамін D2 (кальциферол) відбувається під впливом ультрафіолетового опромінення. При цьому розривається зв'язок в кільці (позиції 9, 10) і утворюється подвійний зв'язок у бічному ланцюзі (позиції 22, 23). Останній гідрований у вітаміні D3 (холекальциферол). Фізіологічна активність обох вітамінів і D3) однакова.

Крім дріжджів продуцентами ергостерину можуть бути міцеліальні гриби — аспергіли і пеніцили, в яких міститься 1,2—2,2% ергостерину. Виявлено, що полієнові антибіотики, які діють на клітинну мембрану дріжджів, помітно стимулюють вміст ергостерину в біомасі.

При одержанні ергостерину у виробничих умовах можна виділити такі етапи: розмноження вихідної культури і накопичення інокулята; ферментація; сепарування клітин; опромінення клітин ультрафіолетовими променями; висушування і упакування цільового продукту.

Так, стосовно дріжджів інокулянт одержують на середовищах, які забезпечують повноцінний розвиток клітин. Після цього основне середовище з ацетатом (активатором біосинтезу стеринів), яке містить знижену кількість азоту, але збагачене джерелом вуглецю (високе значення C:N), засівають порівняно великим об'ємом інокулянта. Культивування дріжджів (ферментацію) проводять при температурі, наближеній до максимальної для конкретного штаму, і належній аерації (2 % O₂ в газовій фазі). Через 3-4 доби, залежно від ростових характеристик і біосинтетичної активності культури, клітини сепарують і піддають вакуум-висушуванню. Потім сухі дріжджі опромінують ультрафіолетовими променями - УФП (довжина хвилі 280-300 нм) протягом оптимального часу за необхідної температури і з урахуванням домішок.

Опромінення дріжджів можна проводити до сепарації клітин у тонкому шарі 5 % суспензії, враховуючи невелику прони-кну здатність УФП.

Опромінені сухі дріжджі використовують у тваринництві. У промисловості їх випускають під назвою «кормові гідролізні дріжджі, збагачені вітаміном D₂». У такому препараті міститься не менше 46 % сирого білка, незамінні амінокислоти (лізин, метіонін, триптофан) і 5000 МО вітаміну D₂/г.

У випадку одержання кристалічного вітаміну D₂ клітини продуцента гідролізують соляною кислотою при температурі 110 °С. Потім температуру знижують до 75-78 °С і додають етанол. Суміш фільтрують при 10-15 °С і масу, яка залишилася після фільтрації, промивають водою, висушують, подрібнюють, нагрівають до 78 °С і двічі обробляють потрійним об'ємом етанолу. Спиртові екстракти об'єднують і упарюють до 70 %-го вмісту сухих речовин. Одержаний «ліпідний концентрат» обробляють розчином їдкою натрію. Ергостерин кристалізується з неомиленої фракції концентрату при 0°С. Його можна очистити повторними перекристалізаціями. Кристали висушують, розчиняють у сірчаному ефірі, опромінують УФП, ефір відганяють, а розчин вітаміну D₂ концентрують і кристалізують.

«Кислотний фільтрат» зазвичай упарюють до 50 %-го вмісту сухих речовин і використовують як концентрат D-вітамінів. Виробляють також масляний концентрат вітаміну D₂.

Рибофлавін або ВІТАМІН В₂. Міститься в клітинах різних мікроорганізмів, будучи коферментом у складі флавопротеїнів (перш за все відповідних ферментів класу оксидоредуктаз - ФМН, ФАД). Продуктантами рибофлавіну (флавопротеїнів) можуть бути бактерії, дріжджі і нитчасті гриби. Однак найбільш перспективними є штами, які утворюють на рідких середовищах 0,5 г і більше рибофлавіну в 1 л середовища. До таких

організмів належать *Ashbyii gossypii*, *Eremothecium ashbyii* і *Candida guilliermondii*. Враховуючи мінливість активних продуцентів названих видів за здатністю синтезувати вітамін В₂, необхідний систематичний підтримувальний відбір культур у процесі їх експлуатації на виробництві. Зазвичай активні продуценти перших двох видів формують яскраво-оранжеві колонії на агаризованих середовищах.

Методами генетичної інженерії вдалось одержати штамп сінної палички, яка утворює приблизно 6 г рибофлавіну в 1 л культурального середовища, що містить патоку, білково-вітамінний концентрат і його гідролізат.

Високий вихід рибофлавіну у *E. ashbyii* корелює з азотом пуринів та іншими азотистими джерелами, вміст яких у середовищі має бути достатнім. Як джерело вуглецю використовують глюкозу або цукрозу, дріжджовий або кукурудзяний екстракт, соєву муку, масла (жири).

Рідкі поживні середовища для одержання інокуляту і для основної ферментації можуть дещо відрізнитися між собою. На-приклад, для одержання посівного матеріалу відоме середовище, яке містить цукрозу, пептон, кукурудзяний екстракт, калію дигідрофосфат, магнію сульфат, рослинну олію. Час вирощування продуцента на цьому середовищі — 2 доби при температурі 27-30 °С (залежно від штаму). Ферментаційне середовище зазвичай включає кукурудзяну і соєву муку, цукрозу, кукурудзяний екстракт, калію дегідрофосфат, кальцію карбонат, натрію хлорид і ненасичений жир.

Зазвичай тривалість ферментації становить 5 діб при рН 5,5-7,7. Після використання цукрози (приблизно через 30 годин) починає помітно накопичуватися вітамін В₂, спочатку — в міцелії, а потім — у культуральній рідині.

Для використання в годівлі тварин всю біомасу висушують і в одержаному сухому продукті вологістю 8 % міститься 1,5—2,5 % рибофлавіну, 20 % білка, тіамін, нікотинова кислота, піридоксин, ціанкобаламін, мікроелементи та інші речовини.

У випадку високих вихідних показників за рибофлавіном вітамін можна виділяти індивідуально і разом із синтетичним рибофлавіном використовувати в медицині.

Для *Candida guilliermondii* дуже важливо регулювати вміст заліза в поживному середовищі, оптимальна концентрація якого коливається в середньому від 0,005 до 0,05 мкг/мл. При цьому певні штами дріжджів можуть утворювати за 5-7 днів понад 0,5 г/л вітаміну. Однак для промислового виробництва рибо-флавіну перевагу надають більш продуктивним видам і штамам грибів - *E.ashbyii* і *Ashbyii gossypii*.

Аскорбінова кислота, або ВІТАМІН С. Це протицинготний вітамін, який міститься у всіх вищих рослинах і твари-нах. Тільки людина і мікроби не синтезують її, але людям вона вкрай необхідна, а мікроби не потребують цього вітаміну. Однак певні види оцтовокислих бактерій синтезують напівпродукт аскорбінової кислоти — L-сорбозу. Таким чином, весь процес одержання аскорбінової кислоти є змішаним, тобто хіміко-ферментативним.

Ферментацію *G.oxydans* проводять на середовищах, які містять сорбіт (20 %), кукурудзяний або дріжджовий екстракт, при інтенсивній аерації (8-10 г O₂/л/год). Вихід L-сорбози може сягнути 98 % за одну-дві доби. При досягненні культурою log-фази можна додатково вводити в середовище сорбіт, доводячи його концентрацію до 25 %. Також встановлено, що *G.oxudans* може окислювати і вищі концентрації поліспирту (30-50 %), який утворюється на останніх стадіях процесу. Ферментацію бактерій проводять в періодичному або безперервному режимі. Доведена можливість одержання L-сорбози із сорбіту за допомогою іммобілізованих у поліакриламідному гелі бактеріальних клітин.

Аскорбінову кислоту використовують як антиоксидант у медицині, а також у харчовій промисловості.

Ціанкобаламін, або ВІТАМІН В12. Одержують тільки мікробіологічним синтезом. Його продуцентами є прокаріоти і перш за все пропіоновокислі бактерії, які в природних умовах утворюють цей вітамін. Мутанти *Propionibacterium shermanii*

M-82 і *Pseudomonas denitrificans* M-2436 продукують на рідко-му середовищі до 58-59 мг/л ціанкобаламіну.

Враховуючи важливу функцію вітаміну в організмі людини (він є протианемічним фактором), його світове виробництво досягло 10 т на рік, з яких 6,5 т витрачають на медичні потреби, а 3,5 т — у тваринництві (Слінов Н.П., 1995).

Вітчизняне виробництво ціанкобаламіну базується на використанні *P. freudenreichii* Var. *shermanii*, яка культивується у періодичному режимі без доступу кисню. Ферментативне середо-вище зазвичай містить глюкозу, кукурудзяний екстракт, солі амонію і кобальту. рН близько 7,0 підтримують додаванням NH₄OH. Тривалість ферментації 6 діб. Через 3 доби у середовище додають 5,6-диметилбензімідазол — попередник вітаміну В12 і продовжують ферментацію ще 3 доби.

Ціанкобаламін накопичується в клітинах бактерій, тому операції з виділення вітаміну полягають у наступному: сепару-вання клітин,

екстрагування водою при рН 4,5-5,0 і температурі 85-90 °С за присутності стабілізатора (0,25 %-й розчин натрію нітриту). Екстракція відбувається протягом години, після чого водний розчин охолоджують, нейтралізують розчином NaOH, додають коагулянти білка (хлорид заліза тривалентного і алю-мінію сульфату) з подальшою фільтрацією. Фільтрат упарюють і додатково очищують, використовуючи методи іонного обміну і хроматографії, потім проводять кристалізацію вітаміну при температурі 3-4 °С з водно-ацетонового розчину.

Кристалічний ціанкобаламін можна одержати за допомогою резорцину або фенолу, що утворюють з ним аддукти, які порівняно легко розкладаються на складові компоненти.

При реалізації даного біотехнологічного процесу потрібно зважати на високу чутливість до світла вітаміну В12. Через це усі операції необхідно проводити в умовах затемнення (або при червоному світлі).

На ацетонобутиловій або спиртових бардах з додаванням солей кобальту і метанолу одержують кормовий препарат КМБ12 - концентрат, який містить вітамін В12 та інші ростові біологічно активні речовини. Біоб'єктом є змішана культура метаногенних бактерій.

Навчальний матеріал теми викладено у підручниках:

1. Технологія ліків промислового виробництва: підруч. для студентів ВНЗ: у 2 ч. / В. І. Чуєшов та ін. 2-ге вид., перероб. і допов. Х. : НФаУ: Оригінал, 2012. 2013. Ч. 1. 694 с. ; Ч. 2. 638 с.
2. Сидоров Ю. І., Чуєшов В. І., Новіков В. П. Процеси і апарати хіміко-фармацевтичної промисловості. Вінниця : Нова Книга, 2010. 816 с.
3. Обладнання технологічних процесів фармацевтичних та біотехнологічних виробництв : навч. посіб. для студ. напряму «Фармація» і «Біотехнологія» ВНЗ / М. В. Стасевич та ін.; за ред. В. П. Новікова; Нац. ун-т «Львів. політехн.», Нац. фармац. ун-т. Вінниця : Нова Книга, 2012. 407 с.
4. Біотехнологія: Підручник / В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін.; Під ред. В.Г. Герасименка. К.: «ІНКООС», 2006. 647 с.
5. Краснопольський Ю.М., Пилипенко Д. М. Фармацевтична біотехнологія: Біотехнології виробництва готових лікарських форм: навчальний посібник для студентів біотехнологічних спеціальностей / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : ТОВ «Друкарня мадрід», 2020. – 279 с.

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

<i>Навчальна дисципліна</i>	Промислова біотехнологія лікарських засобів
<i>Модуль №</i>	1
<i>Змістовний модуль №</i>	1
<i>Практичне заняття</i>	Імунобіологічні лікарські засоби. Вакцини.
<i>Курс</i>	5(6)

Цілі практичного заняття:

- знати та вміти класифікувати вакцини
- знати та вміти характеризувати виробництво живих, інактивованих, білкових, прямих полісахаридних, ДНК вакцин

№ з/п	Основні питання теми
1.	Класифікація вакцин.
2.	Живі вакцини.
3.	Субодиничні / інактивовані вакцини.
4.	Цілісний патогенний організм.
5.	Білкові вакцини. Прямі полісахаридні вакцини.
6.	ДНК вакцини. Вірусна і бактеріальна доставка.

Зміст теми

Вакцини і антисироватки є першою групою препаратів, отриманих за допомогою біотехнології. Жодній медичній науці людство не завдячує порятунком стількох життів, як вакцинології. Вакцинопрофілактика довела свою ефективність як найекономічніший засіб попередження інфекційних хвороб. Створені вакцини проти 34 соціальнозначущих інфекцій, що привело до значного зниження захворюваності на дифтерію, правець, кір, туляремію, поліомієліт і зникнення віспи та ін.

Вакцини і антисироватки є першою групою препаратів, отриманих за допомогою біотехнології. Жодній медичній науці людство не завдячує порятунком стількох життів, як вакцинології. Вакцинопрофілактика довела свою ефективність як найекономічніший засіб попередження інфекційних хвороб. Створені вакцини проти 34 соціальнозначущих інфекцій, що привело до значного зниження захворюваності на дифтерію, правець, кір, туляремію, поліомієліт і зникнення віспи та ін.

Основним завданням досліджень в галузі вакцинології є розробка безпечних і високоефективних вакцинних препаратів. Весь шлях створення вакцин був можливий тільки при використанні основних досягнень біотехнологічної науки – відкриття анатоксинів та можливість їх отримання, створення клітинних культур, атенуація вірусів і бактерій, виділення та очищення полісахаридів, створення рекомбінантних технологій. Кожне відкриття біотехнології та імунології – це черговий крок до створення нових вакцин, причому не тільки для профілактики інфекційних захворювань.

Сьогодні вакцини активно використовуються для лікування ряду захворювань: алергічних, аутоімунних, онкологічних та ін. Так, наприклад, в Україні зареєстровано дві вакцини для лікування і профілактики онкологічних захворювань: вакцина UROBCG, яка використовується для лікування поверхневого раку сечового міхура (виробництва NVI, Нідерланди), і вакцина Гардасил проти вірусу папіломи людини, рекомбінантна (виробництва Merck Sharp & Dohme B.V., Нідерланди).

Багатообіцяючими є комбіновані вакцини, що забезпечують імунізацію проти кількох інфекційних захворювань. Удосконалення і розвиток виробництва традиційних вакцин йде паралельно з розвитком технологій принципово нових вакцинних препаратів: ДНКвакцин; вакцин на основі пептидів; мукозальних і рибосомальних вакцин; створення препаратів, за допомогою яких з'явиться можливість впливати на імунну систему при використанні нових імуномодуляторів, які підвищують імунну відповідь; створення нових систем переносників, наприклад, ліпосом для доставки антигенів або імуномодуляторів; рекомбінантних вакцин і ряду інших.

Інтенсивний розвиток біотехнології, біохімії, імунології визначив прогрес у розвитку світової фармації і створенні високоефективних вакцин, як традиційних, так і вакцин нового покоління, препаратів крові, інтерферонів, цитокінів і рекомбінантних продуктів різної спрямованості.

З розвитком технології рекомбінантних ДНК стало можливим створення вакцин нового покоління, позбавлених недоліків традиційних вакцин. У теперішній час в арсеналі імунопрофілактичних препаратів – вакцини, які розрізняють за видом і характером технології виробництва, способом застосування і ефективністю, а саме: живі (атенуйовані); інактивовані: корпускулярні, хімічні та класичні – анатоксини. За новими технологіями отримують вакцини: рибосомальні, рекомбінантні субодиничні зі штучних антигенів. Для кращого розуміння існуючих сьогодні технологій отримання вакцинних препаратів ми наводимо основні стратегії отримання препаратів із зазначенням типу вакцини та виду мікроорганізмів.

Вірусні вакцини:

- а) класична стратегія (атенуація в клітинній культурі) – віруси поліомієліту, кору, епідемічного паротиту, краснухи, вітряної віспи;
- б) мутанти, відібрані шляхом температурного впливу, – ротавіруси, віруси грипу;
- в) рекомбінантні віруси – простого герпесу (HSV), коров'ячої віспи);

Бактеріальні вакцини:

- а) класичні стратегії – туберкульоз БЦЖ (бацила Кальмета–Герена), черевний тиф (*Salmonella typhi*);
- б) рекомбінантні бактерії – холера (*Vibrio cholerae*),
- в) рекомбінантні бактеріальні вектори – *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*;

Субодиничні / інактивовані вакцини (цілісний патогенний організм):

- а) інактивовані бактерії – кашлюк (*Bordetella pertussis*), холера;
- б) інактивовані віруси – поліомієліту, грипу, сказу, японського енцефаліту, гепатиту А;

Вакцини на основі білків: природні (вірус гепатиту В (HBV), кашлюк);
Хімічно інактивовані вакцини – правець (*Clostridium tetani*), дифтерія (*Corynebacterium diphtheriae*), кашлюк (*Bordetella pertussis*);

Генетично інактивовані вакцини – кашлюк, дифтерія;

Рекомбінантні поліпептиди – хвороба Лайма (*Borrelia burgdorferi*), HBV; ***Вакцини на основі білків:*** гібридний білок (малярія), кон'югат (малярія), клітинний епітоп (рак, HBV);

Вакцини на основі полісахаридів: простий полісахарид (*Haemophilus influenzae* тип b (Hib)), менінгококовий (*Neisseria meningitides*), пневмококовий (*Streptococcus pneumoniae*); кон'югат (Hib);

Вакцини на основі ДНК – грип, гепатит В.

Стратегічне рішення з приводу розробки живої, субодиничної / інактивованої вакцини або вакцини на основі нуклеїнової кислоти необхідно приймати, зваживши епідеміологічні, патогенетичні та імунобіологічні аспекти інфекції або захворювання, що розглядається, а також технічну здійсненність різних підходів. Епідеміологія диктує цільову популяцію вакцини. Вік і стан здоров'я цієї популяції зазвичай визначають конкретні стратегії як більш бажані для стимуляції захисного імунітету.

Наприклад, для вакцини, призначеної для здорових немовлят, дуже важлива мінімальна реактогенність, а деякі типи вакцин марні для немовлят, оскільки вони не стимулюють захисний імунітет. Однак рівень реактогенності менш важливий в таких випадках, як терапевтична протиракова вакцина. Знання імунобіології може допомогти виявити природу захисного імунітету, який повинен стимулюватися вакциною; певні імунні реакції можуть бути захисними, а інші – марними для запобігання або лікування конкретної інфекції.

Наприклад, наявність природної інфекції може корелювати з появою антитіл проти певного мікробного антигену; це обумовлює ймовірність того, що даний антиген є вакцинним імуногеном. З іншого боку, дослідження в імунобіотехнології значною мірою полегшується або стає можливим при розробці експериментальної тваринної моделі, наявність якої дозволяє тестувати та оптимізувати можливі вакцини для досягнення ефективного захисту до того, як виводити кращі з них у фазу клінічних випробувань. Історично для конкретної вакцини є тільки обмежений ряд технічних підходів. Проте, з огляду на зростаючу кількість технічних підходів, у майбутньому, ймовірно, буде можливо створювати багато вакцин «на замовлення» для досягнення оптимальних ефективності та переносимості.

Живі вакцини

Живі вакцини готують з атенуєваних штамів (авірулентних або слабковірулентних), які нездатні викликати захворювання, але зберегли властивість розмножуватися в організмі. Вимоги до штамів для створення живих вакцин: 1 – повинні належати до слабковірулентних або авірулентних; 2 – мати високу антигенність та імуногенність; 3 – бути здатними до розмноження у конкретних органах, а також короткочасної персистенції в органах.

Деякі живі вакцини значно наближаються до «ідеальної вакцини», будучи здатними стимулювати захист на все життя з мінімальною реактогенністю при використанні однієї або двох доз. Такі вакцини можуть бути доступні у випадках, коли природна інфекція дає хазяїну захист на все життя. Ці вакцини складаються з мікроорганізмів (зазвичай вірусів), які реплікуються в організмі хазяїна таким же чином, як і природний мікроорганізм, тобто вакцина може стимулювати імунну реакцію, аналогічну викликаній природною інфекцією.

Жива вакцина атенується, її здатність викликати захворювання виключається. Необхідно забезпечити, щоб жива вакцина не залишалася ні недостатньо атенуваною (не зберігала патогенність навіть на мінімальному рівні), ні надмірно атенуваною (не була недостатньо інфекційною для функціонування як вакцини). Живі вакцини зазвичай викликають як гуморальний імунітет (антитіла), так і клітинний (наприклад, цитотоксичні Тлімфоцити). Жива вакцина може бути недостатньо атенуваною і згодом викликати своє природне захворювання з низькою частотою або бути повністю атенуваною, що значною мірою знижує імуногенність.

Завдяки тому, що жива вакцина може реплікуватися, існує потенційна можливість її перетворення на більш властиву їй патогенну форму. Живі вакцинні штами можуть передаватися з вакцини невакцинованій людині, що може бути досить серйозним у разі, якщо реципієнт має імунодефіцит або проходить хіміотерапевтичне лікування раку.

Класичні стратегії. Термін «класичні» стосується технологічних стратегій, в яких не використовується технологія рекомбінантних ДНК. Виробництво живих вірусних вакцин ґрунтується на ефективному розмноженні вірусу в культурі клітин. **Атенуація *in vitro*.** Розробка живих атенуованих бактеріальних вакцин класичними методами шляхом культивування бактерій *in vitro* для їх атенуації при збереженні імуногенності є не дуже успішною. Конкурентний або селективний тиск на бактерії, що робить їх менш вірулентними, при проведенні пасажів *in vitro* може бути невеликим; бактерії можуть припинити експресувати фактори вірулентності *in vitro*, але повернутися до їх експресії *in vivo* (реверсія).

Одна з широко розповсюджених живих бактеріальних вакцин, оснований на серійних пасажах *in vitro*, – це вакцина проти туберкульозу. У перші десятиліття ХХ століття найважливішою спробою створення живих вакцин була розробка вакцини проти туберкульозу. Вона відома як БЦЖ – бацила Кальметта–Герена (BCG, *Bacillus of Calmette–Guerin*), за іменами двох французьких вчених, які отримали ослаблений штам туберкульозних бактерій. Вакцина була отримана протягом 13 років шляхом багаторазових

серійних пасажів (231 послідовний пересів *in vitro*) штаму *Mycobacterium bovis*. Вакцина складається з живого атенуйованого штаму *Mycobacterium bovis*. БЦЖ фактично була першою живою бактеріальною вакциною, в широких масштабах застосованою на людині. Досвід показав, що вакцини виготовлені з цих ослаблених туберкульозних бацил, абсолютно безпечні, і з 1950 року у Великій Британії та більшості інших країн почалися широкі компанії з імунізації школярів. Сьогодні імунізація вакциною БЦЖ проводиться у новонароджених на 37 день життя підшкірно. Ревакцинацію проводять дітям у віці 7 і 14 років. Щорічно вакциною БЦЖ прищеплюються близько 100 млн осіб. Вакцина БЦЖ являє собою ліофілізовані живі мікобактерії вакцинних штамів, висушені в стабілізаторі – глютамінаті натрію. В одній дозі 0,05 мг вакцини міститься $1,5 \cdot 10^5$ – $6,0 \cdot 10^5$ живих мікробних клітин. Всього зареєстровано 16 субштамів БЦЖ (відомо більше 30). Субштами розрізняються за морфологією клітин і колоній (від довгих паличок до кокоподібних форм), залишковою вірулентністю, імуногенністю, антигенним складом. Так, наприклад, субштам Токіо 172, отриманий в Японії, характеризується дуже дрібними клітинами, низькою залишковою вірулентністю, зниженою імуногенністю і незначною реактогенністю. Такі субштами прийнято називати «слабкими». «Сильні» субштами відрізняються більшою залишковою вірулентністю і високою захисною здатністю. У той же час ці штами більш реактогенні (штами, які використовуються у Франції – Pasteur 1173 P2, Данії – Copenhagen 1331, Болгарії – Sofia SL 222 та ін.). Вакцини, виготовлені з «сильних» субштамів, викликають великий відсоток гнійних лімфоденітів при вакцинації. Раніше в Україні використовували тільки вакцину, вироблену в Росії, в якій застосовано субштам БЦЖ (BCG – 1 Russia, що містить 4 антигени, відсутні у більшості інших субштамів), що займає при високій імуногенності середнє положення за залишковою вірулентністю серед інших субштамів, тобто при високих захисних властивостях вакцина має невисоку реактогенність. У теперішній час для вакцинації дітей в Україні використовують вакцину БЦЖ SSI виробництва Данії (Державний серологічний інститут, штам Copenhagen 1331, який відносять до сильних штамів).

Наявні вакцини БЦЖ відрізняються переносимістю, імуногенністю та ступенем ефективності захисту в клінічних випробуваннях. Вакцини БЦЖ зазвичай мають прийнятні профілі переносимості. Слід очікувати, що для атенуації нового бактеріального штаму застосовуватимуться методики рДНК-технології.

Тому, з огляду на наявні технічні та регуляторні стандарти, дуже малоймовірно, що буде розроблена нова жива бактеріальна вакцина,

атенуїована із застосуванням виключно класичної стратегії. Застосування першої класичної стратегії для вірусів стало можливим в 1950х рр. Разом з можливістю вирощування вірусів у культурах клітин. Цей підхід є емпіричним, тобто вірус дикого типу, ізольований з людської інфекції, проходить пасажі *in vitro* через один або більше тип клітин з метою ослаблення його патогенності. В такому випадку може мати місце селективний тиск у напрямі меншого пошкодження клітин. Механізм, завдяки якому в ході атенуації вводяться мутації, не до кінця зрозумілий.

У деяких випадках (наприклад, вірус поліомієліту) було можливо продемонструвати атенуацію на приматах, хоча в більшості випадків атенуація підтверджується лише в ході інтенсивних клінічних випробувань. Успіх даного емпіричного підходу, який застосовувався як для вакцин для перорального введення (вакцина вірусу поліомієліту (OPV) для перорального введення), так і для вакцин, що вводяться ін'єкційним (парентеральним) шляхом (кір, епідемічний паротит, краснуха, вітряна віспа), підтверджується кількістю наявних ліцензованих вакцин. Реактогенність таких вакцин досить низька для того, щоб деякі з них (поліомієліт, кір) були широко прийняті в усьому світі у звичайній педіатричній практиці. Завдяки інтенсивним програмам імунізації OPV поліомієліт рухається в бік викорінення в усьому світі.

Реасортантні геноми. Вірус-реасортант, отриманий після сумісного інфікування культури двома різними вірусами з сегментованими геномами, містить гени обох батьківських вірусів. Для підвищення ефективності ротавірусів тварин були ізольовані ротавіруси-реасортанти, які містять переважно гени ротавірусів тварин, що несуть фенотип атенуації для людини, а також ген(и) поверхневого білка ротавірусів людини, що стимулюють вироблення серотипспецифічних нейтралізуючих антитіл ротавірусу людини.

Ротавірусна інфекція викликає гострий гастроентерит і є однією з основних причин, що призводить до смерті від важкої дегідратуючої діареї у дітей молодше 5 років у всьому світі.

Живі вакцини проти ротавірусного гастроентериту першого покоління являли собою атенуїовані штами ротавірусів тварин: ротавіруси мавп RRV (Rhesus Rotavirus Vaccine Strain MMU 18006 G3P5B); бичачий – NCDV (Bovine Rotavirus Vaccine Strain RIT 4237 G6 [P6] UK G6 [P5]) і WC3 (Bovine Rotavirus Vaccine Strain WC 3 G6 P7) та ін. Ефективність вакцини проти ротавірусного гастроентериту на основі штаму RIT 4237 коливалася від 0 до 64 %, а проти важких форм – від 0 до 84 %. Вакцини не забезпечували відтворюваного захисту проти інфекції. Далі виробничі вакцинні штами були

використані для отримання вакцин другого покоління. З них були отримані реасортанти епідеміологічно важливих серотипів штамів ротавірусу людини G1G4 і штамів ротавірусів тварин, здатних розмножуватися в кишечнику людини, не викликаючи захворювання.

На основі штаму ротавірусу мавп резус RRV і штаму ротавірусу телят UK були розроблені тетравалентні вакцини RRVTV і BRVTV. Перша ліцензована вакцина Rota Shield (RRVTV, США) була дозволена до застосування в 1998 році. Ця вакцина містила три штами реасортанту, які мали: по 10 генів атенуйованого штаму RRV і по одному гену ротавірусу людини, що кодує VP7 серотипів G1, G2, G4 і штаму RRV з антигеном VP7 серотипу G3.

Однак внаслідок підвищеного рівня проникнення в тканини, що спостерігався відразу після імунізації, застосування вакцини було припинено. Це відкликання показує, що безпека є ключовою проблемою при розробці нових живих вакцин. У наш час активно використовуються вакцини проти ротавірусної інфекції на основі реасортантних штамів ротавірусу. Це вакцини RotaTeg і RotaRik. RotaTeg (Merck, США) містить антигени п'яти реасортантних штамів ротавірусу, геноми яких експресують білки VP7 (G1G4) і VP4 ротавірусу людини і білки VP7 і VP4 ротавірусу теляти.

Таким чином, вакцина RotaTeg містить живі реасортанти людського і бичачого типу, подана таким складом: реасортантом G1 не менше $2,0 \cdot 10^6$ інфікуючих одиниць (ІО); реасортантом G2 не менше $2,8 \cdot 10^6$ ІО; реасортантом G3 не менше $2,2 \cdot 10^6$ ІО; реасортантом G4 не менше $2,0 \cdot 10^6$ ІО; реасортантом P1A не менше $2,3 \cdot 10^6$ ІО. Як допоміжні речовини у вакцині присутні: сахароза, натрію цитрат дигідрат, натрію гідроксид, натрію дигідрофосфат, полісорбат 80.

Аналогічний підхід був застосований до вакцин проти грипу, в яких новий відібраний вірус грипу надавав гени, що кодують імуногенні поверхневі глікопротеїни (гемаглютинін і нейрамінідазу), а атенуйований вірус забезпечував всі інші гени, а також фенотип атенуації. Такі віруси грипу – реасортанти можуть бути адаптовані до росту в клітинних лініях ссавців, таких, як MDCK12 (лінія клітин нирок собаки), як клітинного субстрату замість курячих яєць. Переважна більшість сезонних і пандемічних вірусів мають реасортантне походження. Це насамперед стосується і сучасного вірусу грипу H1N1v2009, який викликав пандемію грипу.

Тому застосування живих грипозних вакцин для запобігання виникнення реасортантів з новими властивостями обмежено на підйомі захворюваності на грип і тим більше в умовах пандемії грипу.

Термочутливі мутанти. Вірусні мутанти можуть бути відібрані за їхньою здатністю до зростання при різних температурах. Ці віруси називаються термочутливими, нездатними до зростання при підвищених температурах, або адаптованими до холоду, відібраними за здатністю до зростання *in vitro* при температурах нижче фізіологічних (37 °C), тобто до 25 °C. Ідея, втілена в цьому підході, полягає в тому, що віруси будуть менш активними при зростанні *in vivo*, ніж батьківські віруси дикого типу, а отже, менш вірулентними та фенотипічно атенуйованими. Живі грипозні вакцини, вперше запропоновані А.А. Смородинцевим у 1938 році, успішно застосовуються в Росії протягом багатьох років. У США жива інтраназальна вакцина була схвалена FDA у червні 2003 року і дозволена для використання у віковій категорії від 5 до 49 років. Завдяки багаторазовим пасажам на курячих ембріонах в умовах зниження температури стало можливим отримання ослабленого вірусу, який не реплікується при високих температурах, характерних для легенів людини, але здатний розмножуватися в носоглотці при температурі 34 °C, викликаючи локальну інфекцію, що призводить до вироблення секреторної та генералізованої імунної відповіді. У зв'язку з тим, що жива грипозна вакцина нагадує природну транзиторну інфекцію, вона має досить високу ефективність і, за різними даними, характеризується 94 %вою сероконверсією у дітей, а в комбінації з інактивованою вакциною викликає позитивну імунну відповідь у 68 % літніх людей.

Хімічний мутагенез. Ще однією методикою створення атенуйованого штаму є хімічний мутагенез з подальшою селекцією. Таким способом було отримано штаму Ty21a *Salmonella typhi*, призначений для запобігання черевному тифу. Дозвіл на використання атенуйованого штаму отримано на основі даних про його безпеку та ефективність.

Рекомбінантні віруси. Підвищена стабільність фенотипу атенуації досягається внаслідок створення модифікацій або делецій у вірусних генах, досить великих для того, щоб повернення до вихідного стану шляхом зворотних мутацій було неможливим або вкрай мало ймовірним. На відміну від цього, атенуйовані віруси, отримані із застосуванням класичних стратегій, можуть мати тільки точкові мутації, а отже, і здатність до повернення в початковий стан. У гені вірусу простого герпесу (HSV), що кодує глікопротеїн, необхідний для інфекційності, була створена мутація. Даний глікопротеїн вводиться у вірус із клітинної лінії в ході культивування *in vitro*, і завдяки цьому отриманий вірус може ініціювати інфекцію *in vivo*, але не здатний поширюватися, що забезпечує його молекулярну атенуацію.

Рекомбінантні бактерії. Конструювати атенуовані бактерії складніше, ніж віруси, беручи до уваги значно більший розмір бактеріальних геномів. Стратегія полягає у виявленні гену(ів), відповідальних за бактеріальну вірулентність або колонізацію і виживання, а потім або видалення гену (кращий варіант), або виключення чи моделювання його експресії *in vivo*. Як і для вірусів, може існувати баланс між вірулентністю та активністю вакцини, що означає можливість надмірної атенуації бактеріального штаму до такої міри, коли він більше не здатний реплікуватися в достатній кількості для стимуляції ефективної імунної відповіді. Атенуація штамів *V. cholerae* була проведена шляхом рДНК-спрямованої делеції генів, що кодують фактори (такі, як холерний токсин). Живі атенуовані можливі вакцини холери, виготовлені таким способом, пройшли клінічну оцінку, і одна з них була ліцензована. Щоб закріпити атенуацію, знизивши ймовірність повернення в початковий стан, бажано делетувати два або більше незалежних гени або генетичні локуси, які беруть участь у забезпеченні вірулентності.

Рекомбінантні вектори. Іншим застосуванням технології рДНК у розробці нових живих вакцин є конструювання вірусів в якості векторів для «чужорідних» поліпептидів інших патогенних мікроорганізмів. Метою створення таких векторів є презентація чужорідного антигену імунній системі в контексті живої інфекції, щоб імунна система реагувала на антиген, як на живий імуноген, і таким чином виробляла ширший імунітет (гуморальний і клітинний) на відповідний патогенний мікроорганізм людини. Рекомбінантний поліпептид експресується в інфікованій клітині і транспортується до клітинної поверхні з метою стимулювання вироблення антитіл або розпадається на пептидні фрагменти, які транспортуються до клітинної поверхні. Дана стратегія також має потенційну перевагу ампліфікації імуногенного сигналу при реплікації живого вектора.

Вірусні вектори. Прототипом вірусного вектора є вірус коров'ячої віспи. У вірусі коров'ячої віспи експресували десятки різних рекомбінантних поліпептидів. Щонайменше на 25 моделях для різних інфекцій було показано, що вакцинація тварин може захистити їх від патогенного мікроорганізму, який кодує рекомбінантний поліпептид. Рекомбінантні віруси коров'ячої віспи, які експресують пухлинні антигени, також проявляли захисні функції в дослідженнях із введенням антигенного стимулу на моделі раку гризунів. З огляду на відомі ускладнення імунізації проти віспи, більш тяжкі у людей з ослабленим імунітетом, вірус коров'ячої віспи був сам по собі сконструйований таким чином, щоб знизити його

вірулентність без зменшення його ефективності як живого вірусного вектора. Цитокіни можуть впливати на природу або величину імунної реакції.

З метою селективного маніпулювання типом імунної відповіді на вакцинний антиген в контексті вакцинації живим вектором був сконструйований рекомбінантний вектор, експресуючий як цитокін, так і рекомбінантний вакцинний антиген. Віруси віспи свійської птиці та канарки розробляються як живі вектори, здатні інфікувати клітини людини, але не дають інфекційного вірусного потомства. Ця нездатність до поширення дозволяє класифікувати дані вірусні вектори також як вакцини на основі ДНК. Інші віруси ссавців також послужили основою для конструювання живих векторів. Штами аденовірусів, які широко використовуються як вакцини серед військовослужбовців з метою запобігання гострих респіраторних захворювань, були сконструйовані таким чином, щоб експресувати чужорідні поліпептиди, і стимулювали захисний імунітет на декількох вірусних моделях антигенного стимулу у тварин. Оптимізація експресії рекомбінантних поліпептидів залишається важливою технічною задачею для всіх цих живих вірусних векторів.

РНКвіруси можуть бути сконструйовані аналогічним чином. Сіндбіс (Sindbis) та інші альфавіруси користувалися підвищеною увагою завдяки широкому спектру хазяїнів, здатності інфікувати клітини, що не діляться, а також потенційного високого рівня експресії в перерахунку на клітину. З огляду на ці властивості, із Сіндбіс була розроблена вакцина на основі нуклеїнової кислоти.

Бактеріальні рекомбінантні вектори. На основі патогенних бактерій можна конструювати живі рекомбінантні вектори для експресії чужорідних поліпептидних антигенів. Найбільш частим способом застосування було конструювання шлункових патогенних організмів таким чином, щоб вони могли індукувати імунітет слизових оболонок проти чужорідного поліпептиду при його пероральному введенні. У сфері розробки живих бактеріальних векторів, що стосуються розробки штамів, імунології, молекулярних розробок і клінічних випробувань, максимальні зусилля були сконцентровані на *S. typhi*, *V. cholera* і *S. flexneri* також були перетворені на рекомбінантні вектори для перорального введення для клінічної оцінки. Проблемою таких живих атенуєваних векторів залишається збереження достатньої вірулентності для реплікації в травному тракті та експресія чужорідних поліпептидів на необхідному рівні, а також досягнення достатньої атенуації для забезпечення прийнятної переносимості. Здатність деяких з цих видів бактерій реплікуватися всередині клітини може посилити

здатність експресованих чужорідних поліпептидів стимулювати клітинні імунні реакції проти відповідних патогенних організмів.

Серед перспективних розробок вірусних вакцин перевага віддається створенню мукозальних препаратів, тобто препаратів, що вводяться в слизову оболонку. Можливе створення ректальних живих вакцин проти вірусних інфекцій на основі атенуйованих рекомбінантних штамів *Salmonella*, які несуть протективні вірусні антигени.

Супозиторії для імунопрофілактики вірусних інфекцій містять такі компоненти: на один супозиторій масою 2.0 г мас. % суспензія клітин рекомбінантних атенуйованих штамів *Salmonella*, трансформованих рGEX2TBI, рсDNATCI або рКНВс, що несуть гени проти вірусних антигенів і що входять в супозиторну основу в кількості 10⁶–10⁹ живих клітин. Застосування супозиторіїв дозволяє індукувати специфічний гуморальний і клітинний імунітет у відповідь на відповідні антигени. Непатогенні атенуйовані штами *Salmonella* здатні інвазувати слизову і деякий час жити в клітинах лімфоїдної тканини організму ссавців. Клітинавектор, будучи природним депо і ад'ювантом для антигену, представляє його в максимально імуногенній формі, збільшує час персистенції і сприяє накопиченню антигену в імунокомпетентних клітинах.

Субодиничні / інактивовані вакцини

Перевага субодиничних вакцин полягає в їх нездатності розмножуватися в організмі хазяїна. Зазвичай вони добре переносяться, особливо більшість таких вакцин, що піддаються багатоступінчастому очищенню з метою видалення інших макромолекул. Імуногенність такої вакцини можна посилити шляхом її спільного введення з ад'ювантом або за допомогою системи доставки. Проте слід починати програму розробки з розумінням того, що для досягнення тривалого захисного імунітету потрібно неодноразове введення вакцини, часто з подальшим введенням бустерних доз. Такі вакцини зазвичай функціонують шляхом стимулювання гуморальної імунної реакції, а також ініціювання імунологічної пам'яті. Необхідно зазначити, що конструювання рекомбінантних вірусних вакцин включає в себе:

- клонування і експресію в різних векторах індивідуальних вірусних генів з метою отримання вірусних антигенів у різних експресійних системах в якості високоочищених вакцинних препаратів;
- клонування і експресію індивідуальних вірусних антигенів з метою отримання вірусоподібних частинок;
- клонування і експресію вірусних антигенів в еукаріотичних векторах з метою отримання ДНКвакцин.

Для розгляду даного питання зупинимося на протигрипозних вакцинах. На поверхні вірусної частинки локалізуються такі білкиантигени: гемаглютинин (Н), нейрамінідаза (N) і білок М2. Встановлено, що в «голівці» апікальної частини молекули Н локалізується 5 антигенних сайтів, і віруснейтралізуюча активність антитіл пов'язана з імунною відповіддю на ці сайти. Антитіла до Н блокують взаємодію вірусу з клітинними рецепторами, тобто інфікування клітин. Антитіла до N блокують виділення вірусів інфікованими клітинами (тобто поширення інфекції). Антитіла до білка М2 також значною мірою блокують від'єднання інфекційних вірусних частинок від мембран інфікованих клітин.

Виходячи із зазначеного вище ясно, що з трьох основних поверхневих білків принципове значення має Н, що і лежить в основі технології виробництва субодиничних вакцин, які містять переважно Н. Вважається, що імунітет на N має допоміжне значення. Білок М2 через високу консервативність став об'єктом для конструювання універсальної вакцини проти грипу А. Таким чином, рекомбінантні вакцини з використанням індивідуальних компонентів вірусів грипу типу А орієнтовані головним чином на ключовий і сильно варіабельний компонент вірусу – молекулу Н. Із внутрішніх антигенів вірусної частинки як матеріал для отримання вакцин активно розглядаються білки NP, M1, NS1.

Цілісний патогенний організм

Найперший підхід до виготовлення інактивованих вакцин полягає у використанні цілісних бактерій або вірусів з метою стимулювання утворення антитіл до багатьох антигенів, деякі з яких зможуть нейтралізувати патогенний організм.

Бактерії. Такі вакцини виготовляються шляхом культивування бактерій, збору клітин та їх інактивації за допомогою нагрівання або хімічних агентів, таких, як мертиолят, фенол, формалін. Кінцева вакцина не піддається подальшому очищенню. Завдяки відсутності очистки таких вакцин, які містять практично всі бактеріальні клітинні компоненти (а також продукти метаболізму і залишкові кількості поживних середовищ), їх реактогенність при парентеральному введенні (наприклад, *Bordetella pertussis* або *St. aureus*) зазвичай вище, ніж у інших типів вакцин. З іншого боку, інактивовані цілісноклітинні вакцини *V. cholerae* та ентеротоксигенної *Escherichia coli* добре переносяться при пероральному введенні. Пероральна інактивована цілісноклітинна вакцина холери (WCC), позбавлена токсину (і його токсичного впливу), як виявилось, добре переноситься, а її рівень ефективності склав приблизно 60 % при випробуванні на популяції високого ризику протягом 3 років. Для стимуляції антитіл, які зможуть нейтралізувати

токсини і підвищити ефективність, рекомбінантна Всубодиниця токсину, яка не має активності токсину, незалежно експресується, очищається і знову додається до вакцини WCC. Показано, що ця комбінована вакцина WCC + rВсубодиниця токсину має дещо вищий рівень ефективності, ніж сама вакцина WCC.

Віруси. Деякі інактивовані вірусні вакцини використовуються вже протягом десятиліть і зазвичай добре переносяться. Оскільки віруси при вирощуванні *in vitro*, як правило, виходять у клітинне культуральне середовище, то збирають середовище від інфікованих культур, що не містить клітин. Великий розмір частинок вірусів у порівнянні з іншими макромолекулами середовища дозволяє легко відокремити частинки з використанням простих технологій очищення на основі поділу частинок за розміром. Прикладами таких вакцин є віруси поліомієліту, грипу, сказу та японського енцефаліту. В альтернативному підході, що застосовується у випадку вбитої вірусної вакцини гепатиту А (HAV), інфіковані клітини піддають лізису і проводять очистку вірусних частинок. Вірусні частинки інактивуються хімічним шляхом, зазвичай за допомогою обробки формаліном, а потім їх дія може посилюватися за рахунок ад'ювантів (наприклад, гідроксиду або фосфату алюмінію). Можливе використання ліпосом для посилення імуногенності вірусних вакцин. У Швейцарії в Swics Serum and Vaccine Institute розроблена і ліцензована ліпосомальна вакцина проти гепатиту А – «Ерахал Верна»; фірмою «Лірохен» запропонована вакцина проти гепатиту В – «НераХел». Тривають розробки й інших вірусних вакцин: проти сказу, герпесу. Фірмою «Лірохен» розроблена платформа «ImmuXen», що дозволяє розробляти ліпосомальні форми вакцинних вірусних матеріалів в імунну систему таким чином, щоб імітувати реакцію природного контакту з інфекційним агентом. Технологія «ImmuXen» викликає сильні імунологічні реакції подібні до тих, які досягаються за допомогою ослаблених вакцин, при цьому повністю зникає ризик зараження. Як приклад наводимо склад ліпосомальної вакцини для профілактики грипу «Інфлексал V», виробництва Верна Біотек (Швейцарія), що містить фосфатидилхолінові віросоми, очищені гемаглютиніни і нейрамінідазу грипу А і В: А (H1N1) – 15 мкг; А (H3N2) – 15 мкг і В – 15 мкг. Допоміжні речовини: фосфатидилхолін, натрію хлорид, фосфати натрію і калію. У наших попередніх матеріалах більш детально розглянуті питання отримання і характеристики ліпосомальних вакцинних препаратів.

Захисні епітопи на поверхні багатьох некапсульованих дрібних вірусів, що стимулюють захисну імунну реакцію часто мають конформаційну структуру, будучи сформованими з високоорганізованої сукупності

структурних білків в антигенні структури. Для більшості перерахованих вірусів, для яких були розроблені і зареєстровані інактивовані вакцини, виявилось неможливо повністю відтворити конформацію таких епітопів за допомогою інших технологій, наприклад, рекомбінантних поліпептидів. Інактивовані вірусні вакцини зазвичай мають високу імунологічну активність, наприклад, 1 доза вакцини гепатиту А забезпечує захист у кількості 50 нг. Таким чином, ця класична стратегія, що характеризується бездоганною історією створення добре переносимих і ефективних вакцин, залишається вельми перспективною технологією, яка обирається для багатьох вірусних вакцин.

Білкові вакцини

Розробка вакцини на основі білка є кращою стратегією для багатьох патогенних організмів, в яких поліпептид містить захисні епітопи, враховуючи вищевказані моменти, що стосуються інактивованих вакцин. Підходи, які беруть за основу білок, ґрунтуються на генетичних, біохімічних та імунологічних методиках, що дозволяють виявляти захисні епітопи та їх відповідні поліпептиди як можливі вакцинні антигени.

Останнім часом, у біотехнології, замість раніше необхідних біохімічних даних або інформації про антигени, дозволяють виявляти нові вакцинні антигени. Як тільки отримана повна послідовність (або її частини) геномної ДНК або РНК, виявляються відкриті рамки зчитування. Отриману амінокислотну послідовність можна перевірити на наявність структурних властивостей, таких, як гомологія з білками інших споріднених патогенних організмів, які є кандидатами для створення вакцин, або гідрофобні Nкінцеві послідовності, які передбачають поверхневу локалізацію. Гени експресуються в рекомбінантних клітинах хазяїна (зазвичай *E. coli*), а рекомбінантний поліпептид очищається і використовується для імунізації тварин з метою отримання поліклональних антитіл для того, щоб виявити, чи виробляється патогенним організмом даний гіпотетичний білок. Антисироватку можна використовувати також для біологічних аналізів (нейтралізація вірусів, опсонізація бактерій), щоб перевірити чи може даний білок бути привабливим кандидатом для створення вакцини. Новий білок може також використовуватися для імунізації та контрольного зараження тваринної моделі. Деякі з ранніх застосувань технології геноміки до вірусів мали на меті виявлення вірусу гепатиту С (HCV) і вірусу гепатиту Е (HEV), що привело до безпосереднього визначення ймовірних вакцинних антигенів. Геномний підхід був застосований і до *Neisseria meningitidis*, в ході чого було виявлено кілька ймовірних вакцинних антигенів.

Природні. Перші вакцини на основі білка були основані на природних джерелах антигенів. У даному відношенні вакцина гепатиту В першого покоління унікальна тим, що в ній за джерело вакцинного антигену використовується тканина людини (плазма). Гепатит В – захворювання, що передається парентеральним або статевим шляхом і є однією з причин захворюваності і смертності на планеті. Інфікування вірусом гепатиту В викликає різні клінічні прояви: блискавичну, гостру, хронічну і приховані форми гепатиту. Блискавична і гострі форми є вкрай важкими і дають високу смертність. Хронічний гепатит несе відповідальність за поширення вірусу і потенційно може розвинутися в цироз і рак печінки. Щороку помирає понад мільйон хронічних вірусоносіїв. Вакцинопрофілактика – єдиний ефективний спосіб попередження цього захворювання.

Спочатку було створено вакцину для профілактики гепатиту В, яку отримували із плазми людини. Вельми цікавим є досвід, накопичений у ході створення інактивованої вакцини проти вірусу гепатиту В, який, як відомо, не культивується *in vitro* і не розмножується в організмах тварин, придатних для широкого використання. Клітини печінки людей, хронічно інфікованих вірусом гепатиту В виділяють надлишок вірусного поверхневого білка, тобто поверхневого антигену гепатиту В – (HBsAg) в кров у вигляді вірусоподібних частинок розміром 22 нм із захисними епітопами. Тому для виробництва вакцини було запропоновано вилучати із плазми клінічно здорових антигеноносіїв поверхневий антиген (HBsAg), очищати і концентрувати його, а потім інактивувати формаліном. Антиген виділяли за допомогою ультрацентрифугування, хроматографії та ферментативної обробки.

Отриманий препарат піддавали інактивації для знищення вірусу гепатиту В та інших потенційно патогенних для організму людини контамінантів. Препарат проходив клінічні випробування в США, Франції, Англії, Голландії, Японії. Однак у зв'язку з технологічними труднощами при отриманні вакцини, обмеженістю в сировині і можливості контамінації препарату ця вакцина не отримала широкого застосування. З 1987 року стали доступні дві рекомбінантні вакцини, які виробляються дріжджами і містять головний поверхневий білок вірусу гепатиту В – Sбілок (HBsAg), вироблені лідерами виробництва вакцин: Merck Sharp Dohme (США) і Smith Kline Beecham (Бельгія).

За оцінкою FDA було визнано безпеку вакцини проти гепатиту В на основі дослідження 12 млн доз, введених дітям у віці до 12 місяців. Вакцина продемонструвала високу ефективність для захисту від гепатиту В. У наш час рекомбінантну вакцину для профілактики гепатиту В виробляють:

GlaxoSmithKline (Бельгія), Heberbiotec (Куба), Verna Biotech (Корея), Instituto Butantan (Бразилія), наукововиробнича компанія «Комбіотех» (Росія) і ряд інших виробників. В Україні дана вакцина входить до переліку обов'язкових щеплень «Календаря щеплень». Білки, очищені з культур *B. pertussis*, комбінуються для створення неклітинних вакцин проти кашлюку, які повинні замінити цілісноклітинну вакцину кашлюку для поточних педіатричних вакцинацій в багатьох розвинених країнах. Залежно від кількості різних білкових антигенів, ці вакцини називають одно-, дво-, три-, чотири або п'ятикомпонентними; дані вакцини були ліцензовані на підставі недавніх досліджень ефективності. Всі ці вакцини містять як компонент токсод кашлюку.

Хімічна інактивація

Багато бактерій виробляють білкові токсини, відповідальні за патогенез інфекції. Уже кілька десятиліть тому стало відомо, що якщо токсин після інфікування залишався патогенним, то антитоксини (антисироватка, збагачена токсинспецифічними антитілами), які були ефективними в нейтралізації активності токсину *in vivo*, можуть запобігти або змінити в кращий бік симптоми деяких бактеріальних інфекцій. Цей прецедент став підґрунтям для введення бактеріальних токсинів до складу активних вакцин. Молекули токсину очищаються із бактеріальних культур (наприклад, *Corynebacterium diphtheriae* (D), *Clostridium tetani* (T), *B. pertussis* (P)), а потім проходять детоксикацію шляхом інкубації з таким хімічним реагентом, як формалін або глутаральдегід. Токсини, позбавлені токсичних властивостей, названі токсодами (анатоксинами), являють собою дві частини (D, T) комбінованої вакцини проти дифтерії, правця та кашлюку (DTP).

Кашлюковий анатоксин, поєднаний з іншими антигенами кашлюку, складає ацелюлярні кашлюкові вакцини. В основі процесу знешкодження токсину лежить принцип незворотної зміни ділянки його білкової молекули, відповідальної за прояв токсичності, при повному збереженні антигенної активності. Наприклад, метод детоксикації дифтерійного токсину формальдегідом при температурі 37 °C був запропонований Рамоном в 1924 році. При вивченні механізму анатоксинування було встановлено, що процес переходу токсину в анатоксин проходить у два етапи. Перший етап пов'язаний з реакцією між формальдегідом і NH₂-групою білка.

При цій реакції утворюється метиламінна група. На цьому етапі детоксикація дифтерійного токсину проходить дуже швидко; вже на 12 добу спостерігається зниження токсичності на 95 %. Однак таке знешкодження зворотне, і, якщо з препарату видалити надлишок формаліну, токсичність відновлюється (реверсія). На другому етапі відбуваються

внутрішньомолекулярні реакції: метиламінні групи взаємодіють з деякими активними радикалами амінокислот (амідні, індольні, фенольні та ін. групи), що призводить до створення стабільних метиленових містків. Стабільного знешкодження можна домогтися тільки після другого етапу формальдегіної детоксикації – утворення метиленових груп. Другий етап є незворотним. Він проходить досить повільно (20–40 діб) при температурі 39–40 °С в зоні нейтральних або слабколужних значень рН і завершується утворенням дифтерійного анатоксину. Необхідно відзначити, що умови детоксикації токсинів специфічні для кожного виду токсину.

Генетична інактивація

Хімічна процедура отримання анатоксинів має певні недоліки, в тому числі зміна захисних епітопів, що веде до зниження імуногенності, і потенційне повернення до біологічноактивного токсину (реверсія). Для отримання стабільних анатоксинів кашлюку створювалася мутація кодонів амінокислот, необхідних для біологічної активності токсину (аденозиндифосфат (ADP) рибозилтрансфераза). Змінений ген замінив собою нативний ген у батьківському організмі, на основі якого потім був отриманий імуногенний, але стабільно інактивований анатоксин кашлюку. У вдосконаленому варіанті цієї стратегії в токсин кашлюку були введені дві мутації для забезпечення неможливості повернення в початковий стан.

Цей подвійний мутант кашлюкового токсину (який також обробляється формаліном у більш м'яких умовах, щоб поліпшити його імуногенність або стабільність) є компонентом ацелюлярної вакцини кашлюку. У близькому до цього варіанті застосування мутантні культури *S. diphtheriae* піддавали скринінгу для виявлення секреції ферментативно неактивних, але антигенних молекул анатоксину. Подальше клонування і секвенування одного з таких мутантних генів токсину виявило мутацію однієї амінокислоти у ферментативно активному сайті (також ADPрибозилтрансферази). Цей генетичний анатоксин (CRM197)⁴⁷ є білкомносієм ліцензованої кон'югованої вакцини Hib. Дана технологія застосовувалася також до токсину *V. cholerae* (СТ) та ін.

Рекомбінантні поліпептиди

Першим застосуванням технології рДНК при виробництві вакцин було створення вакцини проти гепатиту В. Враховуючи те, що отриманий з крові HBsAg проявив себе як ефективна вакцина із доброю переносимістю, ген S, який кодує HBsAg, експресували в пекарських дріжджах *S. cerevisiae*, що приводило до утворення частинок HBsAg розміром 22 нм всередині клітин. Поверхня HBsAg подібна поверхні віріонів HBV. Вакцина, отримана з дріжджів, доступна у всьому світі у великих кількостях, значною мірою

витіснила настільки ж ефективну і добре переносиму вакцину на основі плазми. Крім того, HBsAg експресували в трансгенному листі тютюну і бульбах картоплі; виділений і очищений HBsAg зберігав високу імуногенність.

Проводяться численні наукові дослідження, розробки та застосування технології рДНК до виробництва білків – можливих компонентів вакцин. Основний поверхневий білок *Borrelia burgdorferi* (OspA), експресований у *E. coli* у вигляді рекомбінантного ліпопротеїну, був зареєстрований як вакцина проти хвороби Лайма. Отримані рекомбінантним шляхом глікопротеїни HSV, експресовані в клітинах яєчників китайського хом'яка (CHO) і введені у вакцину, були досліджені на клінічних випробуваннях. Найчастіше великі частинки більш імуногенні, ніж окремі поліпептиди. Більш того, як і у випадку VLP HBsAg, частинки зазвичай стимулюють вироблення антитіл на їхні конформаційні епітопи, тоді як ізольовані поверхневі поліпептиди можуть не стимулювати продукування таких антитіл.

Віріон людського вірусу папіломи (HPV) – це високоорганізована структура, основним білком якої є L1. Експресія L1 в клітині (наприклад, *S. cerevisiae*) призводить до утворення VLP L1, який після імунізації стимулює вироблення антитіл, які зв'язуються з віріонами. Рекомбінантні VLP ротавірусу і парвовірусу також експресувалися у вигляді потенційних батьківських вакцин. Багато клітинхазяїв використовувалися для експресії гетерологічних рекомбінантних генів. Крім зазначених раніше (*E. coli*, *S. cerevisiae* і CHO), були розроблені системи експресії для клітин інших видів бактерій і дріжджів, а також інших стабільних клітинних ліній (SCL) ссавців, наприклад, клітини нирки африканської зеленої мавпи (Vero). Цілі тварини і рослини також можуть використовуватися як хазяїн для рекомбінантної експресії. В цілому, дрібніші білки, які не потребують посттрансляційних модифікацій, можуть ефективно експресуватися у вихідній формі в мікробних системах експресії. На відміну від цього поліпептиди, яким для імуногенності потрібні посттрансляційні модифікації, наприклад глікозилювання для належної імуногенності, експресуються в SCL ссавців, здатних до правильного здійснення таких модифікацій.

ДНК вакцини. Вірусна і бактеріальна доставка

Новий підхід, який дозволяє індукувати в організмі імунну відповідь без введення антигену і ґрунтується на включенні в клітини тваринимішені гена, що кодує білокантиген, привів до появи нового типу вакцин – ДНКвакцин (генетична імунізація). Виявлено, що фрагменти ДНК вірусів і бактерій, імплантовані в клітини тварин, здатні синтезувати власні білки. Клітини, які отримали гени іншого організму, у відповідь починають

виробляти антитіла на заново синтезовані білки. Експерименти зі створення ДНК-вакцин ведуться переважно з бактеріальними плазмідами – невеликими стабільними кільцевими позахромосомними ДНК.

Перевага плазмід у тому, що вони самі по собі не провокують розвиток інфекції. Їх використовують як вектор – засіб доставки. Для того щоб викликати необхідну імунну відповідь, виділені з бактерій плазмиди модифікують, вносячи певні зміни в структуру ДНК, а саме «вшивають» гени, які кодують один або кілька конкретних білківантігенів, які виробляються конкретними вірусами або бактеріями. Так само вбудовуються в плазмиду гени, необхідні для забезпечення експресії всієї конструкції. Дуже важливо, що фрагменти ДНК, відповідальні за відтворення і розвиток інфекційного процесу, в плазмиди не вводяться. Однією зі стратегій було внутрішньом'язове введення розчину ДНК, що кодує вакцинний антиген. Клітини поглинають плазмідну ДНК, транскрибують її та синтезують антиген, який може проходити таку ж обробку, як і в процесі вірусної інфекції. Перевагами використання ДНК є відносна технічна простота виготовлення і можливість направляти синтез численних копій мРНК, звідки впливає очікуване посилення як синтезу антигену, так і імунної реакції. Такі вакцини проявили свою ефективність на багатьох тваринних моделях інфекції, особливо вірусних моделях. У пошуках нового шляху доставки ДНК без оболонки наносили на шкіру мишей, звідки вона поглиналася волосяними фолікулами з метою стимуляції імунної відповіді. Хоча ДНК без оболонки і проявляє стимулюючу дію на вироблення специфічних антитіл, вона особливо ефективно стимулює клітинні імунні реакції.

У перших експериментах такого роду *E.coli* плазмиду, що містить клонований ген білкаантигена, транскрипція якого перебувала під контролем промотора вірусу тварин, кон'югували з мікрочастинками золота і бомбардували ними клітини вуха миші за допомогою «генної гармати». У цьому методі використовується стиснений гелій, що містить частинки колоїдного золота із сорбованими на ньому плазмідами, які експресують антиген. При цьому препарат вводиться в епідерміс.

Перевагами цього методу є потрапляння плазмід безпосередньо в клітини і факт того, що велика частина плазмід прямо контактує з клітинами Лангерганса. Це важливо у зв'язку з тим, що шкіра багата антигенпрезентуючими клітинами (клітини Лангерганса), які синтезують молекули II класу МНС (головний комплекс гістосумісності – major histocompatibility complex). Тому ДНК, що введена безпосередньо в шкіру, може бути легко захоплена ними. Згодом з'ясувалося, що клоновану ДНК можна вводити в клітини і шляхом внутрішньом'язової ін'єкції розчину з

великою кількістю плазмід, які несуть відповідну ДНК. Для цього необхідно в 103104 разів більше ДНК, ніж при бомбардуванні мікрочастинками. В одному з експериментів більш ніж у 75 % випадків ген включався в клітини миші, і синтезований білокантиген індукував синтез антитіл.

В одній із серій експериментів мишам в задні кінцівки вводили розчин з *E. coli* плазмідною, що несе ДНК нуклеопротеїну вірусу грипу А, транскрипція якої знаходилася під контролем промотора вірусу саркоми Рауса або цитомегаловірусу. Хоча рівень експресії гена нуклеопротеїну був настільки низький, що не піддавався реєстрації, через 2 тижні після імунізації в крові мишей виявлялися антитіла до вірусу грипу А. Вживання імунізованих мишей виявилось значно вищим, ніж мишей з контрольної групи. Крім того, вони були нечутливими і до іншого штаму вірусу грипу. Такий перехресний захист не виробляється при введенні традиційних протигрипозних вакцин. Пізніше відбулися перші клінічні випробування на людині, які перш за все продемонстрували безпеку нового методу. Гени ВІЛ вносили в клітини пацієнтів вже заражених вірусом. Ще пізніше аналогічні експерименти провели зі здоровими людьми. Крім генів ВІЛ пересаджували гени грипу та гепатиту В. У всіх випадках вакцини приводили до імунної відповіді у вигляді вироблення специфічних антитіл.

Вакцини вводили або шляхом ін'єкцій, або за допомогою так званої «генної гармати». Цей апарат, випускаючи струмінь стисненого гелію, пробиває клітинні мембрани мікроскопічними металевими частинками покритими ДНК. Існують дані про можливість «вистрілювати» ДНКвакцину, упаковану в ліпосоми. Полегшення впливу може відбуватися на рівні клітинного всмоктування, експресії або імунологічної активації. Однією із стратегій було включення ДНК в мікроскопічні бомбардуючі частинки, які «вистрілюють» в клітини, які продукують кодований антиген.

Ця технологія «генної гармати», яка згідно зі звітами потужно стимулює імунну реакцію, вже пройшла вихідні клінічні випробування. Для підвищення ефективності всмоктування ДНК укладали в оболонку з катіонних ліпідів, ліпоспермінів або інших молекул, які нейтралізують їх заряд і мають ліпідні групи для покращення проникнення крізь мембрану. Такі композиції досліджувалися також на предмет альтернативних шляхів введення (наприклад, пероральний або назальний), які можуть стимулювати імунітет слизових оболонок. Було показано, що анестезуюча речовина бупівакаїн, що вводиться разом із ДНК, підсилює всмоктування і експресію ДНК. АДФрибозилуючі екзотоксини, що вводяться разом із ДНК і наносяться на шкіру, можуть стимулювати трансдермальну імунізацію. Особливо необхідно зупинитися на вірусній доставці ДНКвакцин.

Всі зазначені вище вакцини на основі нуклеїнових кислот призводять до введення плазмиди в клітину. З метою доставки ДНК за допомогою вірусу віспи домашньої птиці експресійна касета рекомбінантного білка інтегрується у вірусний геном. Ці пташині поксвіруси можуть інфікувати клітини ссавців (людини), але не можуть продукувати інфекційний вірус, отже, даний підхід можна вважати основаним на нуклеїнових кислотах. Цього єдиного циклу самообмежуючої інфекції може бути досить для стимуляції широкого імунітету проти патогенного організму, рекомбінантний поліпептид якого експресується цими пташиними поксвірусами в інфікованих клітинах, тоді як реактогенність повинна бути мінімальною через нездатність вірусу розповсюджуватися в організмі хазяїна.

Одним із варіантів конструкції експресійної плазмиди є застосування системи експресії ДНК на основі вірусу, яка може підвищувати рівень РНК і білкової експресії, що відбувається при живій вірусній інфекції, як було розроблено для вірусних векторів Sindbis.

Використання векторів для конструювання та виробництва вірусоподібних частинок як вакцин є вельми перспективним. Аденовіруси багато років використовуються як інструмент у модельних дослідженнях з генотерапії. В останні роки переваги векторів на основі аденовірусів приваблюють фахівців у галузі конструювання рекомбінантних вакцин. Особливо цінною є висока продуктивність аденовірусів і висока ефективність переносу генів та експресії. Вектори для вакцин конструюються з делеціями за ранніми генами E1 і E2. У ряді досліджень аденовірусні вектори використовують для експресії індивідуальних вірусних антигенів і, зокрема, гемаглютининів вірусів грипу. Серйозним недоліком цих векторів є наявність в популяції людей поширеного імунітету, що призводить до швидкого обмеження експресії цільових антигенів.

Від 15 до 25 % популяції людей в епідемічні періоди страждають аденовірусною інфекцією. Найсильнішим антигеном серед білків аденовірусу є гексон (гексон аденовірусу містить рідоспецифічні антигени і має досить консервативну амінокислотну послідовність серед аденовірусів різних типів, крім того, білок синтезується в інфікованих клітинах у великій кількості), антитіла до якого виявляються у понад 75 % здорових людей.

У зв'язку з цим при плануванні робіт з використання таких векторів слід враховувати їхню популяційну сприйнятливість. Вектори на основі альфавірусів – відносно новий інструмент для конструювання рекомбінантних вакцин. Вірус венесуельського енцефаломієліту коней, вибірково патогенний для коней, належить до привабливих об'єктів вірусологів. Фундаментальні проблеми реплікації та експресії геному

РНКвірусів досліджуються з початку 70х років ХХ століття. Експресія геному цього вірусу забезпечується двома оперонами, ранніми та пізніми генами.

У рамки зчитування пізніх генів здійснюють вставку чужорідних генів із забезпеченням високого рівня їх експресії, який можна порівняти із рівнем експресії поверхневих мажорних білків альфавірусів. Компанія Alfa Vax є світовим лідером у використанні альфавірусів як векторів для конструювання вакцин. При цьому слід підкреслити безпечність векторів на основі альфавірусів: вони непатогенні для людини, і в людській популяції не існує імунітету проти цих вірусів, оскільки вони ніколи не циркулювали серед людей.

Бактерії, які реплікуються внутрішньоклітинно, можна піддати генноінженерній обробці з метою доставки плазмідної ДНК в клітини для експресії рекомбінантних білків. *S. flexneri* було атенувано шляхом створення делеційного мутанта за життєво важливим геном (*asd*). Хоча такий штам може розмножуватися *in vitro* за наявності діамінопімелінової кислоти (DAP) і може окупувати клітини, він не здатний розмножуватися *in vivo*, за відсутності DAP.

Цей штам було трансформовано плазмідною, яка несе еукаріотичний промотор і рекомбінантний ген. Отриманий рекомбінантний штам *S. flexneri strain* виявився здатним заселяти клітини ссавців *in vitro* і експресувати білок, який кодується плазмідною, як потенційний вакцинний антиген. Оскільки *S. flexneri* реплікується в кишечнику і стимулює імунітет слизових оболонок, даний вектор можна вводити пероральним шляхом з метою доставки ДНК до клітин, в яких стимулюється імунітет слизових оболонок. Інші атенуовані штами різних видів бактерій, наприклад, *Salmonella*, які здатні до заселення клітин ссавців, але не до поділу, також можуть доставляти рекомбінантні плазмідні пероральним шляхом для експресії рекомбінантних білків як вакцинних антигенів. При введенні ДНК-вакцини активізуються клітини імунної системи: В-лімфоцити виробляють антитіла, що нейтралізують антигени в рідких міжклітинних тканинах (гуморальна імунна відповідь), а цитотоксичні Т-лімфоцити руйнують бактерії і віруси всередині клітин (клітинна імунна відповідь). Отримано експериментальні дані, що один і той же антиген, введений в організм звичайним методом і за допомогою ДНКвакцини, продукує різні варіанти імунної відповіді. При ДНК вакцинації синтезуються імуноглобуліни – IgG2a (максимум через 6 тижнів), а при традиційному введенні – IgG1 (через 12 тижні). При ДНК-вакцинації Т-хелпери тварин секретують інтерферон гамма, а після звичайної вакцинації інтерлейкіни: ІЛ4 і ІЛ5.

Таким чином, використання ДНК-вакцини призводить до так званої Т-хелперної відповіді (Th1), а звичайна вакцинація – до Th2 (Т-хелпери активують В-лімфоцити, сприяючи розвитку гуморального імунітету, наприклад, продукції інтерлейкінів). Інтерес до ДНК вакцин стимулюється низкою їх властивостей. Використовуючи один і той же плазмідний або вірусний вектор, можна створювати вакцини проти різних інфекційних захворювань, змінюючи тільки послідовність, що кодує необхідні антигени. У той же час, на думку ряду дослідників, пряма інокуляція плазмідної ДНК повинна приводити до синтезу білків *in vivo*, конформаційна і посттрансляційна модифікація яких ідентична синтезованим при інфекційному процесі зараження вірусом.

Перевагою ДНК-вакцин є: відсутність спеціальних методів доставки і висока стабільність (ДНК-вакцини стабільні навіть при кімнатній температурі), високий ступінь очищення, відсутність баластних білків і контамінації сторонніми агентами, індукування у тварин системного і місцевого імунітету. Дворазова внутрішньом'язова вакцинація собак плазмідною ДНК, що експресує глікопротеїн вірусу сказу, захищає тварин від контрольного зараження вірулентним штамом вірусу сказу. Уже розроблені і проходять випробування ДНК-вакцини проти інфекцій, що викликаються вірусами гепатиту В і С, грипу, лімфоцитарного хоріоменінгіту, сказу, японського енцефаліту, туберкульозу, лейшманіозу, малярії та ін. Потрібний ген вставляють в плазмиду або безпечний вірус.

Такий носій-вектор проникає в клітину і синтезує необхідні білки, що мають протективну дію. Для впровадження цих вакцин в медичну практику потрібно вирішити ще дуже багато питань. Наприклад, генами кодуються білкові антигени, і поки немає альтернативи полісахаридних антигенів, які входять до складу ряду традиційних вакцин. Безсумнівно важливою є розробка методів отримання та очищення плазмідної ДНК, звільнення від баластних домішок бактеріального походження, хромосомної ДНК і домішок РНК. Самостійним питанням є підбір для ДНКвакцин ад'ювантів і носіїв. Звертає на себе увагу питання про долю введеної в клітину ДНК. На сьогоднішній день немає однозначної відповіді. ДНК може інтегруватися в геном хазяїна з дуже серйозними наслідками, якщо при цьому відбувається злаякісна трансформація клітин або зачіпається якийнебудь важливий ген, що призводить до мутагенного ефекту.

На думку багатьох дослідників, такий розвиток подій вважається вкрай малоімовірним. На їхню думку, така ДНК деякий час проіснує в клітині у вигляді позахромосомного елемента, який не реплікується, а потім зруйнується. На нашу думку, ці питання ще недостатньо вивчені і

впровадження ДНКвакцин в медичну практику вимагає всебічного вивчення, а саме: доля введеної ДНКвакцини; тривалість експресії антигену; нешкідливість ДНКвакцин; утворення антитіл до самої ДНК і домішок вакцини та ін.

Таким чином, було показано, що після того, як клітини *in vivo* приймають ДНК, що кодує вакцинні антигени, які можуть секретуватися або зв'язуватися з клітинною поверхнею, запускається гуморальна або клітинна імунна відповідь. Крім того, поглинання ДНК можна посилити хімічним шляхом або при використанні для доставки вірусів або бактерій. Останні підходи відповідають визначенню вакцини на основі ДНК як нездатної реплікуватися в організмі людини.

Вакцини на основі ДНК без оболонки, які були вдосконалені і вводяться за допомогою вірусів, нещодавно почали проходити клінічні випробування. Незважаючи на те, що ДНК-вакцини розробляються більше 20 років, жодна з таких вакцин досі не дозволена до застосування. Генетична імунізація – метод, оснований на ДНК-вакцинації, оскільки в організм вводять не білокантиген, а нуклеїнові кислоти (ДНК або РНК), в яких закодована інформація про білок. У наш час розроблена відносно безпечна система, яка забезпечує ефективність дії нуклеїнових кислот в тканинах.

Потрібний ген включають в плазмиду або безпечний вірус. Такий носійвектор проникає в клітину і синтезує потрібні білки. Трансформована клітина перетворюється на фабрику з виробництва вакцин всередині організму. ДНК-вакцина приводить до повноцінного імунітету і забезпечує захист від вірусної інфекції. Ці системи випробовували при гепатиті В і С, грипі, сказі, сальмонельозі, туберкульозі, лейшманіозі, малярії.

Навчальний матеріал теми викладено у підручниках:

1. Технологія ліків промислового виробництва: підруч. для студентів ВНЗ: у 2 ч. / В. І. Чуєшов та ін. 2–ге вид., перероб. і допов. Х. : НФаУ: Оригінал, 2012. 2013. Ч. 1. 694 с. ; Ч. 2. 638 с.
2. Сидоров Ю. І., Чуєшов В. І., Новіков В. П. Процеси і апарати хіміко-фармацевтичної промисловості. Вінниця : Нова Книга, 2010. 816 с.
3. Обладнання технологічних процесів фармацевтичних та біотехнологічних виробництв : навч. посіб. для студ. напряму «Фармація» і «Біотехнологія» ВНЗ / М. В. Стасевич та ін.; за ред. В. П. Новікова; Нац. ун-т «Львів. політехн.», Нац. фармац. ун-т. Вінниця : Нова Книга, 2012. 407 с.

4. Біотехнологія: Підручник / В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін.; Під ред. В.Г. Герасименка. К.: «ІНКОС», 2006. 647 с.
5. Краснопольський Ю.М., Пилипенко Д. М. Фармацевтична біотехнологія: Біотехнології виробництва готових лікарських форм: навчальний посібник для студентів біотехнологічних спеціальностей / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : ТОВ «Друкарня мадрид», 2020. – 279 с.