

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

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
з організації самостійної роботи 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
з організації самостійної роботи 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 з організації самостійної роботи 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 з організації самостійної роботи 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 навчальний посібник містить деякі матеріали, що стануть у нагоді здобувачам вищої освіти у роботі над опануванням тем, що винесені для самостійної роботи.

Теми самостійної роботи

1. Біотехнологія отримання гормональних препаратів
2. Отримання інтерферонів, інтерлейкінів, факторів крові
3. Моноклональні антитіла і ДНК-або РНК-проби
4. Рекombінантні вакцини та вакцини-антигени
5. Нові технології у виготовленні імунобіологічних препаратів
6. Рослини у фармацевтичній біотехнології
7. Джерела отримання лікарських речовин
8. Нові технології у виготовленні імунобіологічних препаратів
9. Генно-інженерна фармакологія
10. Біонанотехнологія в фармації та медицині
11. Шляхи біотехнологічного отримання антибіотиків
12. Отримання антибіотиків з використанням біосинтезу
13. Отримання антибіотиків з використанням генної інженерії
14. Отримання антибіотиків з використанням іммобілізованих ферментів

15. Біотехнологічне отримання низькомолекулярних гепаринів
16. Виробництво препаратів інсуліну
17. Виробництво гормонів росту людини
18. Живі вакцини
19. ДНК вакцини. Вірусна і бактеріальна доставка
20. Біотехнологія цитокінінів
21. Біотехнологія препаратів фагів
22. Отримання нуклеїнових кислот з дріжджів
23. Ферменти, що виділяються з дріжджів
24. Вторинні метаболіти рослин - фармакологічно активні речовини
25. Рослинні вакцини
26. Рослини-продуценти імуноглобулінів
27. Біотехнологічне отримання фосфоліпідів
28. Умови культивування продуцентів антибіотиків
29. Основні технологічні етапи отримання антибіотиків і методи їх очистки
30. Історія відкриття антибіотиків
31. Основні методи ідентифікації і контролю препаратів, що містять вітаміни
32. Історія створення і виробництва природного та рекомбінантного інсуліну
33. Структура фагів і перевага їх використання в порівнянні з антибактеріальними препаратами

Мікробна екосистема людини

Мікробна екосистема людини анатомічно й функціонально пов'язана з усіма органами і тканинами, які мають прямий або непрямий контакт із зовнішнім середовищем: найтонша біологічно активна мікробна плівка вкриває слизові оболонки ротової порожнини, носоглотки, стравоходу, шлунка, тонкої й товстої кишки, сечостатевої системи, а також шкіру. Біоплівка є основним місцем проживання симбіотичної (нормальної) мікрофлори в організмі. Вона складається зі слизу, який продукується особливими клітинами людини, та в якому перебувають численні поселення симбіотичних мікроорганізмів, вироблені ними корисні речовини, а також молекули й клітини імунної системи. Концентрування основної маси симбіотичних мікроорганізмів на межі тіла людини із зовнішнім середовищем дає їм можливість ефективно виконувати свої захисні функції та підвищувати адаптаційні можливості й потенції організму. Мікробні плівки, унікальний витвір еволюції, — це своєрідний біологічний фільтр, який здатний пропускати корисні сполуки та

затримувати живі мікробні клітини й токсини. Надзвичайно важливо те, що приепітеліальні біоплівки служать бар'єром проти певних патологічних ефектів. Мікробний орган дорослої людини важить 2-5 кг і нараховує від 10¹⁴ до 10¹⁶ (тобто, до 10 000 000 000 000 000) клітин мікроорганізмів, що в 10—1000 разів більше, ніж сумарне число людських клітин. Тільки у кишечнику людини, що є основним сховищем симбіотичної мікрофлори, у нормі живе від 500 до 1000 видів різних мікроорганізмів. Це свідчить про виняткову важливість мікробної системи людини та надзвичайну потребу її підтримки.

Здоровий мікробний орган бере участь у виконанні величезного різноманіття функцій, які відіграють виняткову роль у нормалізації життєдіяльності організму і які не спроможний виконати жоден інший орган. Симбіотичні мікроорганізми мають величезний сумарний біологічний потенціал, цілком достатній для того, щоб і забезпечити повний захист організму, і підтримати його обмінні процеси.

Вони регулюють нормальну роботу всіх органів, забезпечують біологічну стабільність організму й значну тривалість життя людини. Нормальна мікрофлора захищає організм від хвороботворних мікробів; зміцнює імунітет; поліпшує процес перетравлювання їжі; підтримує діяльність клітин ротової порожнини, травного тракту, дихальних шляхів, сечостатевої системи та шкіри в здоровому стані; постачає до організму вітаміни, гормони й інші корисні сполуки; оптимізує обмін речовин; регулює метаболізм жовчних кислот, холестерину й статевих гормонів; посилює всмоктування через стінки кишечнику іонів кальцію та заліза; знешкоджує харчові й мікробні токсини, ксенобіотики, радіонукліди, мутагени, канцерогени; протидіє злоякісним новоутворам; нормалізує концентрацію ліпідів у крові, що сприяє профілактиці атеросклерозу; запобігає утворенню жовчних і ниркових каменів; служить джерелом енергії; позитивно впливає на нервову систему, пам'ять, мислення й виконує широкий спектр інших цінних функцій.

Тобто, це багатофункціональний матрикс життя, без якого нормальне функціонування організму неможливе. Якщо нормальну мікрофлору якимось чином видалити з організму людини, тобто зруйнувати мікробну екологічну систему, вона швидко втрачає життєздатність через відсутність інших органів і систем, які могли б у повному обсязі взяти на себе життєво важливі функції нормальної симбіотичної мікрофлори. Зокрема, нормальну мікрофлору порівнюють із другою печінкою, оскільки 50% токсинів знешкоджується мікрофлорою, а 50% печінкою, тобто мікрофлора захищає печінку від перевантаження.

Історія розвитку антибіотиків

350–550 роки

Історія антибіотиків починається ще задовго до винаходу пеніциліну. У останках скелету людини з історичної суданської області Нубії вчені виявили рештки тетрацикліну. Дослідники пояснили це лише тим, що в раціоні людей того часу були деякі речовини, що містили цей антибіотик. Інший приклад – дослідження тканин стегнових кісток скелетів з оазису Дахлех в Єгипті, де вчені також знайшли рештки тетрацикліну. Припускають, що споживання тетрацикліну в цих районах захищало людей від захворювань, бо кількість хворих в суданській нубійській популяції була низькою, а в кістках з оазису Дахлех і зовсім не знайшли інфекцій.

Існують докази, що стародавні цивілізації використовували різні природні препарати для лікування, до прикладу, трави, мед чи фекалії тварин. Один з успішних методів – використання запліснявілого хліба на відкритих ранах. Про його корисні властивості говорили ще у Древньому Єгипті, Сербії, Китаї, Греції та в Римі.

1676 рік

Мікроскопіст Антоні ван Левенгук першим побачив бактерії за допомогою розробленого їм мікроскопу. Але після нього біля сотні років бактерії більше ніхто не бачив.

1855 рік

Під час Кримської війни французький хірург Шарль Емануель Седійо виявив, що гнійні рани декотрих солдат зафарбовують бинти в аквамариновий колір. Цей же лікар запропонував термін «мікроби», аби надати описання невидимим мікроорганізмам.

Але сам пігмент виявили лише в 1869 році мікробіолог Рудольф Еммеріх та хірург Оскар Льов. Вони помітили, що зелені бактерії інгібують (пригнічують) ріст інших мікробів. Тоді вони виростили декілька партій синьогнійної палички (*Pseudomonas aeruginosa*) та використовували супернатант – надосадкову рідину – як ліки, але з перемінним успіхом. Ймовірно, отриманий фермент піоціаназа був першим антибіотиком для лікування інфекцій.

1859 рік

Мікробіологи Луї Пастер та Роберт Кох встановили зв'язок між окремими видами бактерій та хворобами за допомогою розмноження їх на штучних середовищах та тваринах. Так вони стали першими послідовниками мікробної теорії хвороб. Кох вивчав збудників холери, сибірської виразки та туберкульозу. У 1905 році він отримав Нобелівську премію по фізіології та медицині за дослідження та відкриття щодо туберкульозу.

У 1882 році він схарактеризував постулати, котрі допомагають визначити, чи стали причиною інфекції бактерії. Проте, вперше їх сформулював патологоанатом та фізіолог Якоб Генле. Присутність збудника в кожному випадку хвороби має бути доведено виділенням у чистій культурі.

Збудник не повинен виявлятися при інших хворобах. Виділений збудник повинен відтворювати хворобу в експериментальних тварин. Збудник має бути виділений від тварини при експериментально викликаній хворобі.

1905 рік

Дерматолог-сифілідолог Еріх Гоффман та протозоолог Фриц Шаудін відкрили збудник сифілісу – блідну трепонему. Шаудін побачив у полі мікроскопу незафарбовані мазки, котрі зробив Гоффман з папули жінки, у яких був сифіліс.

1910 рік

Коли імунолог-бактеріолог Пауль Ерліх дізнався про блідну трепонему, він почав шукати ліки проти цієї хвороби. Сифіліс вважався практично невиліковною хворобою.

У 1907 році він виділив з виробничого миш'яку атоксилу, котрий використовували проти сонної хвороби, препарат №606. Його назвали арсфенаміном або ж сальварсаном, його продажем займалася компанія Hoechst. Перші клінічні випробування показали його ефективність проти сифілісу, у 1910 році Ерліх оголосив про своє відкриття суспільству.

Це, ймовірно, стало першим сучасним дієвим протимікробним засобом, але в серйозному розумінні цього слова він не міг бути антибіотиком.

Але вже пізніше з'ясувалося, що якщо пацієнту дати недостатню кількість ліків, то бактерія швидко виробляла імунітет до них. Таким чином, вчений відкрив імунітет до ліків – резистентність та в 1912 році створив новий препарат неосальварсан. Це були перші хімотерапевтичні препарати направленої дії. Дивовижно, що механізм роботи цих препаратів досі невідомий, а суперечки про їх хімічну структуру вирішилися лише у 2005 році.

1928 рік

Мікробіолог Олександр Флемінг, здається, був недостатньо охайним у своїй роботі. Коли він повернувся з відпустки, то помітив, що гриб *Penicillium notatum* забруднив всю культурну тарілку зі стафілококом, котру залишив відкритою. Де б не ріс гриб, у цій зоні бактерій не було.

Він виявив, що пеніцилін – це достатньо ефективний засіб навіть в низьких концентраціях проти розвитку стафілококу та одночасно менш токсичний засіб, ніж протимікробні засоби того часу. Протягом 12 років він намагався зацікавити хіміків відкриттям, але в 1940 році сам же втратив цікавість до цього проєкту. В цьому ж році фармаколог та патолог Говард Флорі та

біохімік Ернст Чейн представили метод очищення, котрий дозволив в 1945 році зробити пеніцилін більш доступним.

Але Флемінг не був першим, хто винайшов антибактеріальні властивості пеніциліну. У 1870 році сер Джон Скотт Бурдон-Сандерсон описав, як культивована рідина, покрита пліснявою, перешкоджає росту бактерій. Через рік хірург Джозеф Лістер експериментував з *Penicillium glaucium* та з'ясував, що препарат має антибактеріальну дію на тканинах людини. У 1875 році доктор Джон Тиндалл представив Королівському суспільству експерименти з *Penicillium notatum*.

У 1897 році військовий лікар Ернест Дюшен з'ясував, як арабські хлопці лікують седільні виразки пліснявою, котра росла на їх сидіннях. Він використовував підтверджену форму *Penicillium notatum* та використовував її для лікування тифу у морських свинок.

1931 рік

Фармацевтична компанія Bayer розробила перший синтетичний антибактеріальний препарат пронтозіл, з'єднавши синтезований в 1908 році протимікробний препарат сульфаніламід та барвник. Засіб був ефективним для лікування стрептококової інфекції у мишей.

У 1933 році ліки використали для лікування хлопчика, котрий помирив від стафілокової септицемії.

У 1935 році дослідники зрозуміли, що барвник не потрібен так, як діюча речовина все-таки сульфаніламід. З того часу почалася ера сульфаніламідів — синтетичних протимікробних препаратів.

1940 – 1962 роки

Почалась «золота ера» антибіотиків. За цей період винайшли більшість різновидів антибіотиків, котрі використовуються сьогодні для лікування, наприклад, тетрациклін та ванкоміцин. Кращим джерелом нових агентів були інші природні мікроорганізми. У 1944 році із *Streptomyces griseus*, організму, який виявили в землі, виділили стрептоміцин. Після цього почався всесвітній пошук ліків по різних куточках нашої планети.

У 1952 році в ґрунті острова Борнео знайшли мікроорганізми *Streptomyces orientalis* та виділили з них ванкоміцин. Ліки почали застосовувати для лікування у 1958 році. До цього часу стійкість до антибіотиків стала очевидною. Тоді вчені почали шукати нові способи покращити існуючі лікарські засоби.

У 1959 році фармацевтична компанія Beecham розробила метицилін — антибіотик проти грам-позитивних бактерій, до прикладу, золотистого стафілокока. До того часу він вже виробив стійкість до більшості пеніцилінів.

У 1960-х роках почали з'являтися цефалоспорини. Зараз їх розділяють на чотири покоління відповідно до їх спектру активності. Завдяки винаходу антибіотиків тривалість життя між 1944 та 1972 роками збільшилась на 8 років.

1970-і роки

Швидкість виявлення нових видів лікарських засобів раптово впала. Проблема резистентності зростала. Саме через це дослідники шукали можливість модифікувати вже існуючі ліки, аби надати їм більшу активність, а також меншу токсичність та чутливість до механізмів резистентності.

З цих перегонів дослідники зробили висновок, що рано чи пізно бактерії стануть стійкими та модифікуються до нових версій. В наступні роки вчені займалися відкриттям нових груп антибіотиків та модифікація старих груп.

Наш час

Вже зараз через резистентність обмежений вибір для лікування бактеріальних інфекцій, що приводить до високої захворюваності та смертності. Щорічно в США бактерії заражають 2 млн людей, хвороби яких стійкі до антибіотиків, через це помирає як мінімум 23 тис. людей.

Існують альтернативи антибіотикам – пасивна імунізація (вакцинація) та фагова терапія (лікування за допомогою вірусів, до прикладу, бактеріофагів), але дослідники продовжують шукати більш ефективні форми лікарняних препаратів. Більшість протимікробних препаратів, котрі використовують сьогодні, виділили в «золоту еру» з ґрунту. Але подальше вивчення цієї екологічної сфери не привело до появи нових класів.

Можливі нові підходи — дослідження інших екологічних сфер, до прикладу, морського середовища, запозичення антимікробних речовин у тварин та рослин, імітація природних бактерій та грибів, а також використання повністю синтетичних ліків, як це було за перших роки епохи антибіотиків.

На відміну від нових лікарських засобів від раку або рідкісних захворювань, ціни на антибіотики залишаються низькими, тому у фармацевтичних компаній мало стимулів для розробки нових препаратів. Тому інвестори уникають стартапи, котрі хочуть перемогти резистентність супербактерій. З 2003 до 2013 року менш як 5% венчурних інвестицій були саме у фармацевтичні дослідження та різноманітні розробки.

Чотири роки назад фармацевтична компанія Tetrphase Pharmaceuticals оцінювалась в суму \$2 млрд, зараз її акції продаються за

\$0,7. Аби вижити, компанія скоротила дослідження, персонал та кількість препаратів, що знаходяться в розробці. Вона зосередила свої зусилля на просунення препарату, котрий бореться з важкими інфекціями черевної порожнини.

Великі виробники поступово йдуть з ринку антибіотиків, залишаючи безліч продуктів у руках стартапів. Але більшість нових антибіотиків погано продаються, так, як лікарі тримають їх про запас для важких випадків.

Стартап-виробник антибіотиків Achaogen подав заявку про банкрутство вже через рік після отримання дозволу на препарат для лікування інфекцій сечовивідних шляхів. У пробірці лікарський засіб вбивав стійкі штами. Колись ринкова вартість компанії сягала \$1 млрд, а в червні 2019 року її продали за \$16 млн на аукціоні для банкрутів.

Історія створення препаратів інсуліну

Цукровий діабет за поширенням займає третє місце після серцевосудинних і онкологічних захворювань. Враховуючи тяжкість захворювання діабетом, стає зрозумілим, чому вже більш 100 років проводяться різнопланові дослідження зі створення й вивчення препаратів інсуліну. У зв'язку із цим представляє інтерес історія створення лікарських препаратів інсуліну:

- 1902 р. - російський лікар І. М. Соболєв встановив, що рівень цукру в крові людини регулюється спеціальним гормоном підшлункової залози;
- 1921 р. - уперше інсулін був виділений з підшлункової залози у чистому вигляді канадськими вченими Бантингом Ф. і Бестом Ч., і застосований у Торонто з високим ефектом для лікування 10- літнього хлопчика, хворого діабетом;
- 1923 р. - фірмою "EliLilly" (США) промислово отриманий інсулін з підшлункових залоз великої рогатої худоби й свиней. Інсулін з великої рогатої худоби має трохи більшу антигенність для людини в порівнянні зі свинячим інсуліном (з 1200 кг підшлункової залози можливо одержати близько 100 г кристалічного інсуліну). Інсулін з підшлункової залози великої рогатої худоби відрізняється трьома амінокислотами від інсуліну людини, свинячий - однієї амінокислотою. Інсулін, виділений з підшлункової залози тварин, використовували до початку 80- х років ХХ століття;
- 1935 р. - Хагедорн Г. Х. у Данії оптимізував дію інсуліну в організмі, запропонувавши пролонгований препарат - протамін-цинк-інсулін (вводили один раз у добу);
- 1952 р. - отриманий гомогенний кристалічний інсулін, який назвали однокомпонентним;

- 1954 р. - англійський біохімік Сенджер Г. одержав Нобелівську премію за встановлення структури інсуліну;

- 1963-1965 р.р. - трьома колективами дослідників у США, Китаї і ФРГ, а на початку 70- х років радянськими вченими здійснений синтез обох ланцюгів і їх з'єднання дисульфідними зв'язками для одержання інсуліну.

Даний метод синтезу не знайшов промислової реалізації у зв'язку з низьким виходом, високою ціною й складністю проведення синтезу поліпептидного гормону, що складається з десятків амінокислотних залишків;

- 1980 р. - датська компанія "Novo" розробила метод перетворення інсуліну свині в інсулін людини шляхом ферментативного заміщення 30-го залишку аланіну в ланцюзі В на залишок треоніну. Надалі проводили хроматографічне очищення продукту, чистота якого була не нижче 99 %.

Обидва інсуліни не відрізнялися за активністю й часу дії.

Тільки наприкінці 50- х, початку 60- х років ХХ століття були з'ясовані відмінності структури людського інсуліну від інсулінів тваринного походження, які викликали алергійні реакції. Результати даних досліджень лягли в основу розробок промислового одержання інсуліну людини. У цей час основними способами одержання інсуліну, ідентичного людині, є напівсинтетичний і генноінженерний. Можливість створення людського інсуліну стала реальною тільки після встановлення факту, що біосинтез інсуліну в β -клітинах островкової тканини відбувається за наступними основними етапами:

- закодована інформація про структуру інсуліну міститься в гені інсуліну (ділянка ДНК) 11- й хромосоми;

- у результаті стимулюючої дії, насамперед глюкози й деяких інших речовин, ця інформація списується РНК-полімеразою з інсулінового гена у вигляді мРНК на рибосомах, у яких здійснюється з'єднання амінокислот з утворенням білків. На рибосомах відбувається складання поліпептидного ланцюга з 109 амінокислот з утворенням препроінсуліну під впливом рестриктаз, у результаті утворюються фрагменти від декількох сотень до декількох тисяч нуклеотидів;

- при синтезі препроінсуліну в β - клітинах підшлункової залози перші 23 амінокислоти "проводять" молекулу через мембрану клітини.

Ці амінокислоти відщеплюються рестриктазами й утворюється пептид проінсулін, що складається з 86 амінокислот. Молекула проінсуліну звивається таким чином, що початковий і кінцевий її сегменти зближаються, а центральна частина молекули віддаляється під впливом ферменту рестрикції.

Роботи з генно-інженерного одержання інсуліну почалися з 1978 року, коли з'явилося повідомлення (США) про одержання штаму кишкової палички, що продукує щурячий проінсулін.

В 1978 році були синтезовані окремі ланцюги людського інсуліну за допомогою експресії їх синтетичних генів у клітинах *E. coli*. Кожний з отриманих синтетичних генів підбудовувався до 3'-кінця гена ферменту β галактозидази й уводився у векторну плазмиду (pBR322).

Клітини *E. coli*, трансформовані такими рекомбінантними плазмідами, робили гібридні (хімерні) білки, що складаються із фрагмента β галактозидази й А або В пептиду інсуліну, приєднаного до неї через залишок метіоніну. При обробці хімерного білка бромціаном пептид звільнюється. Однак замикання дисульфідних містків між утвореними ланцюгами інсуліну відбувалося із труднощами.

В 1981 році синтезований ген-аналог проінсуліна - міні Спроінсулін, у якому 35-ланцюговий С- пептид був замінений на сегмент із шести амінокислот: Арг-Арг-Глі-Сер-Ліз-Арг й показана його експресія в *E. coli*.

В 1980 році У. Гилберт зі співробітниками виділили мРНК інсуліну з пухлини β -клітин підшлункової залози пацюка й за допомогою зворотної транскриптази одержали з неї кДНК. Отриману кДНК вмонтували в плазмиду pBR322 *E. coli*, у середню частину гена пеніцилінази. Рекомбінантна плазмida містила інформацію про структуру проінсуліну. У результаті трансляції мРНК у клітинах синтезувався гібридний білок, що містить послідовності пеніцилінази й проінсуліну, який відщепляли з такого білка трипсином.

В 1980 році американськими вченими Міллером і Бакстером був уперше описаний процес клонування людського гена в *E. coli* з наступною індукцією й одержанням білка інсуліну, ідентичного людському. У промислових умовах рекомбінантний інсулін уперше був отриманий американською фармацевтичною компанією "EliLilli" спільно з біотехнологічною компанією "Genentech" (США) і продукт був випущений на ринок в 1982 р. При виробництві людського інсуліну використана технологія рекомбінантних ДНК: поміщають кДНК гена людського проінсуліна в *E. coli* або *S. cerevisiae* і гідролізують отриманий проінсулін до молекули інсуліну.

У це ж час компанія " Novo-Nordisk" (Данія) розробила технологію одержання генно-інженерного інсуліну людини, засновану на використанні генетично модифікованих дріжджових культур у ролі суперпродуцентів інсуліну людини. Використання еукаріот, що мають подібну з людської систему процесінгу білків у ролі продуцентів інсуліну, дозволило одержати гормон або його попередник в нативній формі. Значною перевагою даної технології є повна відсутність у препаратах бактеріальних токсинів і пірогенів

клітинної стінки. Незважаючи на всі ці переваги, одержання інсуліну з використанням бактеріальних штамів суперпродуцентів залишається більш кращим завдяки більш високому рівню експресії інсуліну в складі гібридного білка.

Виробництво препаратів інсуліну

Інсулін – білковий гормон, що виробляється підшлунковою залозою і регулює рівень цукру (глюкози) в крові. Основна функція інсуліну - забезпечувати проникність клітинних мембран для молекул глюкози, яка і використовується для синтезу інших молекул, що містять вуглець і є єдиним джерелом енергії для мітохондрій.

Без інсуліну проникність клітинної мембрани для глюкози падає в 20 разів, і клітини помирають від голоду, а розчинений в крові надлишок цукру отруює організм. В організмі людини інсулін синтезується в β -клітинах острівців Лангерганса підшлункової залози. При відсутності або нестачі його синтезу розвивається таке захворювання як цукровий діабет. Речовину інсулін одержують із підшлункової залози свиней і великої рогатої худоби. Випускаються також напівсинтетичні препарати інсуліну, отримані внаслідок заміни амінокислот у молекулі інсуліну свиней, і рекомбінантний інсулін людини.

В даний час інсулін людини, в основному, отримують двома способами: модифікацією свинячого інсуліну синтетико-ферментативним методом і генно-інженерним способом.

Штам *E. coli* BL21/pPINS07 - продуцент гібридного білка з послідовністю проінсуліну має значні переваги перед аналогічними штамми-продуцентами. Це, зокрема, зростання внутрішньоклітинного вмісту рекомбінантного препроінсуліну людини як наслідок неактивного стану генів *lon* і *otrT*, що кодують відповідно АТФ-залежну протеїназу і протеїназу зовнішньої мембрани бактеріальних клітин. Крім того, в клітинах даного штаму відсутні продукти деградації попередника інсуліну, що ускладнюють його очищення.

Технологічний процес виробництва інсуліну відбувається за наступною схемою:

1. Отримання посівного матеріалу штаму-продуцента (відновлення консервованої культури; вирощування маточної культури; вирощування інокулята).
2. Біосинтез рекомбінантного білка (вирощування продуцента в ферментері (ферментація); отримання біомаси (сепарування); дезінтеграція

клітинної суспензії; виділення і відмивання тілець включення (центрифування)).

3. Виділення і очищення рекомбінантного білка (солюбілізація тілець включення і відновлення; ренатурація і подальша хроматографічна очистка).
4. Ферментативне розщеплення рекомбінантного білка .
5. Хроматографічна очистка інсуліну.
6. Отримання кристалів інсуліну

Суть рекомбінантного методу полягає в тому, що фрагмент ДНК, який кодує утворення проінсуліну, вводиться в генний апарат кишкової палички і мікроорганізми, що при розподілі активно виробляють інсулін. За тривалістю дії інсуліни поділяють на препарати короткої, середньої тривалості й тривалої дії. Добову дозу і хронологію введення інсуліну протягом доби визначають відповідно до глікемічного профілю й рівня глюкозурії.

Відомо, що людський інсулін являє собою поліпептид с молекулярною масою 5808, що полягає з 51- й амінокислоти, які утворюють два поліпептидні ланцюги, з'єднані дисульфідними містками. Один ланцюг, називаний А містить 21 амінокислоту, другий ланцюг - В містить 30 амінокислотних залишків. Амінокислотний склад ланцюгів видоспецифічний. Пептидні ланцюги А та В з'єднано за допомогою двох дисульфідних містків (-S-S-), які необхідні для прояву гормональної активності інсуліном (їх руйнування приводить до втрати активності).

Попередник інсуліну продукується усередині β -клітин за допомогою ДНК і РНК- керованого синтезу. Синтезуемий інсулін у вигляді одноланцюгового попередника - препроінсуліну (107 амінокислотних залишків) сигнальний пептид, що містить кінцевий (23 амінокислотних залишку) і 35-ланковий сполучний пептид (С-пептид).

При видаленні сигнального пептиду в клітині утворюється проінсулін з 86 амінокислотних залишків, у якому ланцюги інсуліну (А та В) з'єднані С-пептидом, що забезпечують їм необхідну орієнтацію при замиканні дисульфідних зв'язків. Довгий ланцюг проінсуліну в апараті Гольджі упаковується в гранули, де в результаті гідролізу віддаляються чотири амінокислоти з утворенням інсуліну і еднального С-пептиду. Інсулін і С-пептид в еквівалентних концентраціях секретуються у відповідь на всі стимулятори секреції інсуліну (глюкоза, маноза). Після протеолітичного відщиплення С-пептиду утворюється інсулін. В гранулах β -клітин інсулін депонується у вигляді кристалів, що складаються із двох атомів цинку й шести молекул інсуліну. Цинк, концентрація якого в β -клітинах острівців Лангерганса досягає високих значень, формує комплекси з інсуліном. Інсулін усіх хребетних утворює димери за допомогою водневих зв'язків між

пептидними групами залишків В24 і В26 дві мономерів, які при високих концентраціях гормону, в свою чергу, реорганізуються в гексамери, що містять по два атоми цинку в кожному. Наявність таких високовпорядкованих комплексів суттєво полегшило вивчення кристалічної структури інсуліну. При фізіологічних концентраціях інсулін перебуває в мономерній формі.

У цей час генно-інженерний інсулін роблять шляхом ферментації генетично змінених мікроорганізмів: кишкової палички або дріжджів, які здатні синтезувати попередник інсуліну (проінсулін) у складі химерного протеїну. З отриманого біосинтетичним шляхом проміжного продукту реконструюють інсулін людини (ензиматичним шляхом) за наступною схемою:

- культивування штаму із вбудованим геном гібридного білка, що включають повну послідовність інсуліну людини;
- очищення й ренатурація гібридного білка;
- протеолітичне розщеплення гібридного білка з одержанням інсуліну;
- очищення інсуліну.

Дана схема багато в чому нагадує процес біосинтезу інсуліну в острівцях Лангерганса, де гормон спочатку з'являється у вигляді білка-попередника (проінсуліну), а потім протеолітичними ферментами від проінсуліну відщеплюється сполучний С-пептид. У виробництві для розщеплення гібридного білка використовують подібні за специфічністю ферменти: трипсин і карбоксипептидазу В. Гідроліз здійснюють шляхом обробки ферментами послідовно або одночасно.

Біотехнологія отримання гормональних препаратів

Технологія одержання гормонів за допомогою рекомбінантних ДНК включає такі етапи: 1) одержання генетичного матеріалу (генів); 2) введення генетичного матеріалу в генетичний апарат бактеріальної клітини і створення умов для його експресії.

Одержання генів. Необхідний генетичний матеріал (ген або групу генів) для їх подальшого примноження методами генетичної інженерії з метою синтезу біологічно активних білків, що кодуються цими генами, можна досягнути трьома різними методами: 1) виділенням його з ДНК; 2) хіміко-ферментативним синтезом; 3) ферментативним або матричним синтезом на основі виділеної з клітини матричної РНК (мРНК).

Перший метод полягає в тому, що з природного генетичного матеріалу - ДНК - за допомогою відповідних ферментів (рестрикційних ендонуклеаз)

«вирізають» потрібний ген. Цей підхід має суттєві недоліки. По-перше, важко підібрати дію ферментів таким чином, щоб вирізати з ДНК необхідний ген. Як правило, разом з геном залишаються «по боках» зайві нуклеотидні послідовності, що заважає наступному використанню одержаного гена, або, навпаки, ферменти відрізають частину гена, що робить його функціонально неповноцінним. По-друге, гени еукаріотичних організмів мають складну «мозаїчну» (екзонінтронну) будову, що в подальшому при розмноженні в мікроорганізмах може перешкоджати їх нормальному функціонуванню, тому що в бактеріях не відбувається видалення зайвих частин (інтронів). Тому цей прийом виділення генів краще спрацьовує стосовно вірусів і бактерій, але не еукаріот. По-третє, якщо ген становить незначну частку від цієї ДНК, з якої його виділяють, то можуть виникнути серйозні труднощі щодо його ізоляції та ідентифікації.

Другий метод полягає у хіміко-ферментативному синтезі гена, якщо відома первинна структура того білка або поліпептида, який кодується синтезованим геном. Він є важливою альтернативою «вирізанню» генів за допомогою рестриктаз із нативної ДНК. Метод включає хімічний синтез коротких (8-16 нуклеотидних) одноланцюгових фрагментів ДНК за рахунок поетапного утворення ефірних зв'язків між нуклеотидами і зшивання олігонуклеотидів між собою за допомогою ДНК-лігази з утворенням дволанцюгових полінуклеотидів.

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

Третій метод одержання генів матричним синтезом найбільш розповсюджений і є основним джерелом генів, які потім розмножуються у формі рекомбінантних ДНК в одноклітинних організмах, а інколи і в багатоклітинних. Суть методу полягає в одержанні генів шляхом їх ферментативного синтезу і коротко зводиться до наступного. Спочатку із клітин виділяють матричні (інформаційні) РНК (мРНК), серед яких присутня мРНК, що кодується геном, який потрібно виділити. Потім у спеціальних умовах здійснюють РНК-направляючий синтез ДНК (одноланцюгової), який каталізується ферментом зворотною транскриптазою (ревертазою). Після завершення реакції синтезовану одноланцюгову ДНК (яку називають комплементарною ДНК, кДНК) очищують і використовують як матрицю для

другої реакції - ДНК залежного синтезу другої нитки ДНК. Це можливо завдяки відкриттю у 1970 році (США) ферменту зворотної транскриптази головною властивістю якої є здатність здійснювати синтез, зворотний тому, який проходить при транскрипції - синтез мРНК на матриці ДНК. Це стало науковою сенсацією і спростувало «центрально догму» молекулярної біології, яка стверджувала, що передача генетичної інформації триває тільки в одному напрямі: ДНК → РНК → білок.

Виробництво гормону росту людини

Гормон росту людини (ГРЛ) – білок, що виробляється передньою часткою гіпофіза, який поступає у кров під впливом гіпоталамічного соматостатину й ГРЛ-релізінг-фактору соматоліберину. Вивільнення гормону регулюється соматостатином, а кількість виділюваного 79 ГРЛ визначається соматоліберином.

Гормон росту людини відноситься до групи анаболічних гормонів. Молекула ГРЛ являє собою один поліпептидний ланцюг, що складається з 191 амінокислотного залишку, з молекулярною масою 22,125 кДа. За хімічною структурою, фізичним, хімічним і біологічним властивостям ГРЛ подібний із пролактином і плацентарним лактогеном. Молекула ГРЛ містить 2 залишки триптофану, 2 тирозину й 4 цистеїну. Останні утворюють у молекулі два дисульфідних містка, які формують дві петлі - велику, що включає центральну ділянку амінокислотної послідовності між цистеїном-54 і цистеїном-165, і малу, що перебуває на С-кінцевій ділянці між цистеїном-182 і цистеїном-189.

Просторову структуру молекули соматотропіну відрізняє високий ступінь упорядкованості. У поліпептидному ланцюзі ГРЛ виявлено 4 альфаспіральних і 3 нерегулярних ділянки. Високий вміст у молекулі гормону залишків неполярних амінокислот обумовлює утворення у водному розчині димерів і більших агрегатів. Уперше гормон був виділений і очищений в 1963 році з гіпофіза, отриманого із трупного матеріалу. Дефіцит цього гормону приводить до гіпофізарної карликовості, частота зустрічальності якої оцінюється як 10 випадків на 1 млн. людей (серед дітей західних країн вона становить 1 на 5000 людей).

Гормон видоспецифічний і є єдиним засобом лікування дітей, що страждають від його недоліку. Внутрішньом'язове введення гормону росту людини (10 мг/кг протягом року по три ін'єкції у тиждень) збільшує ріст протягом першого року лікування більш ніж на 6 см. Для досягнення більш відчутних результатів введення гормону необхідно продовжувати від віку 4-5 років до полові зрілості й далі. Загальної кількості фармацевтичного

препарату, що випускається компаніями великих виробників соматотропного гормону, вистачало для лікування лише однієї третини випадків гіпофізарної карликовості в розвинених країнах;

Нестача соматотропіну виявився ще більш гострим з урахуванням інших випадків його застосування: незагойні переломи, опіки, виразки, порушення гемопоезу. Крім того гормон, що виділявся із трупного матеріалу відрізнявся гетерогенністю. Незважаючи на вдосконалення виділення й очищення гормону, в 5 % хворих, що одержували препарат, утворювалися антитіла, які повністю інактивували його біологічну активність. Необхідно також відзначити, що гіпофізарний матеріал заражений нейротоксичним вірусом з надзвичайно тривалим інкубаційним періодом. У зв'язку із цим діти, що одержували соматотропний гормон, потребували багаторічного медичного спостереження. Вірус, що втримувався в препаратах гормону, нерідко приводив до летального результату.

З 1985 р. ВОЗ заборонено застосування гормону, що було виділено з людських гіпофізів. Рекомбінантний соматотропін, що одержав назву "Соматрем", став другим, (після людського інсуліну) фармацевтичним препаратом, отриманим біотехнологічним шляхом. Гормон росту людини, біологічно чистий і вільний від вірусних забруднень, уперше був отриманий в 1980 році фірмою "Genentech". Гормон, синтезований у генетично сконструйованих клітинах *E. coli*, відрізняється від гормону, виділеного з гіпофіза, додатковим залишком метіоніну на NH₂-кінці молекули. Гормон має біологічну активність нативного гормону й навіть більшим ефектом, ніж гормон росту, виділений з гіпофіза, очевидно, через більшу чистоту.

У дітей, страждаючих гіпофізарною карликовістю, зареєстрований приріст 8-18 см у рік, що трохи більше ефекту гормону, отриманого з гіпофіза. На першому етапі клонували двонитчасту ДНК-копію мРНК і розщепленням рестрекційними ендонуклеазами одержали послідовність, яка кодує всю амінокислотну послідовність гормону, за винятком перших 23 амінокислот. Потім клонували синтетичний поліпептид, відповідний до амінокислот від 1-ї до 23-ї. Далі два фрагменти поєднували, потім "підбудували" до пари промоторів і ділянці зв'язування рибосом. Кінцевий вихід гормону склав 2,4 мкг на 1 мл культури *E. coli* (100000 молекул 81 гормону на клітину). Гормон росту людини, синтезований у бактеріях, мав потрібну молекулярну масу й не пов'язаний з яким-небудь бактеріальним білком, від якого його необхідно було б відщеплять. Змінюючи амінокислотну послідовність гормону росту людини, тобто його первинну структуру, за допомогою модифікації его гена, що кодує, у бактеріальних клітинах можна синтезувати аналоги гормону, дуже важливі для вивчення активних ділянок молекули (наприклад, ділянок, які

стимулюють ріст або виявляють дію на неоглюкогенез) і етиології карликовості на молекулярному рівні. Використовуючи методи рекомбінантних ДНК, можна синтезувати й інші фактори росту, і фактори диференціювання тканин, виділивши спочатку їх мРНК, потім одержавши відповідні гени. Це відноситься до соматомедину А (стимулює фіксацію сірки в хрящі), утворення якого індукується соматотропіном. В 1982 році виділений і синтезований поліпептид, що складається з 44 амінокислотних залишків, що й володіє повною біологічною активністю гіпоталамічного рилізінг-фактору соматотропіна (СТГ-РФ). Уведення СТГ-РФ здатне компенсувати недолік соматотропіну. Застосування СТГ-РФ можливо не тільки для лікування гіпофізарної карликовості, але й при деяких формах діабету й для прискорення регенерації тканин у людей, що одержали сильні опіки. Стратегію конструювання нових білків шляхом заміни функціональних доменів або за допомогою спрямованого мутагенезу можна використовувати для посилення або ослаблення біологічної дії білка. Наприклад, нативний гормон росту людини зв'язується в різних типах клітин, як з рецептором гормону росту, так і із пролактиновим рецептором. Щоб уникнути небажаних побічних ефектів у процесі лікування, потрібно виключити приєднання гормону росту людини до пролактинового рецептору. Оскільки ділянка молекули гормону росту, що зв'язується із цим рецептором, по своїй амінокислотній послідовності лише 82 частково збігається з ділянкою молекули, яка взаємодіє із пролактиновим рецептором, вдалося вибірково знизити зв'язування гормону з останнім. Для цього використовували сайт-специфічний мутагенез, у результаті якого відбулися певні зміни в бокових групах деяких амінокислот (His-18, His21, Glu-174) - лігандів для іонів Zn^{2+} , необхідних для високоефективного зв'язування гормону росту людини із пролактиновим рецептором. Отриманий модифікований гормон росту людини зв'язується тільки зі "своїм" рецептором. Однак, модифіковані гормони росту людини поки не знайшли застосування в клініці. Технологію одержання рекомбінантного гормону росту людини (соматотропного гормону) запропоновано російськими вченими інституту біоорганічної хімії РАН. Запропонований метод одержання включає шість основних стадій: ферментацію, виділення тілець включення, ренатурацію, іонообмінну хроматографію на носії Q-sepharose FF, гідрофобну хроматографію на сорбенті ButylSephacrose 4 FF і гель-фільтрацію з використанням Sephacryl S-100 HR. Для створення штаму- продуцента був синтезований штучний ген [Met1] pГРЛ,

структура якого була оптимізована для ефективно́ї транскрипції й трансляції в *E. coli* BL21(DE3). Був отриманий відповідний штам- продуцент *E. coli* BL21(DE3)|pES1-6, що володіє продуктивністю 300 мг цільового білка в 1 літрі культури при вирощуванні в лабораторних умовах.

Біотехнологія одержання рекомбінантного гормону росту людини (соматотропного гормону).

1. Ферментація. Культуру *E. coli* BL21(DE3), трансформовану плазмідною pES1- 6[Met-1] рГРЧ, вирощували у ферментері 1000 л, заповненого поживним середовищем (панкреатичний гідролізат казеїну, дріжджовий екстракт, K_2HPO_4 , NaCl, $MgSO_4$) при температурі 37 °С та рН 7,0. Кількість посівного матеріалу становило 2 % від обсягу поживного середовища. Протягом процесу культивування у ферментер подавали стерильне повітря, водний розчин аміаку й розчин глюкози. Питому витрату повітря підтримували на рівні 0,5 л у хвилину. Підвищення концентрації кисню в середовищі досягали за рахунок збільшення швидкості перемішування культуральної рідини. Через 3 години культивування додавали ізопропіл-тіо- β -d-галактозид до концентрації 52 мг/л і продовжували процес ще 3 години. При індукції за допомогою β - ізопропіл-тіо- β -d-галактозиду відбувався ефективний біосинтез рекомбінантного білка, який накопичувався в клітинах у вигляді тілець включення. За допомогою електрофорезу в SDS- ПААГ показане, що через 3 години після внесення індуктора вміст цільового продукту в клітинах продуцента досягало 30 % від сумарного клітинного білка. На процес ферментації впливає температура, тиск, рН, вміст розчиненого кисню у культуральній рідині й швидкість подачі глюкози. Одним з найважливіших параметрів процесу ферментації є вміст у середовищі розчиненого кисню, який дозволяє регулювати режими перемішування культуральної рідини, подачі повітря й глюкози. Вміст розчиненого кисню в культуральній рідині визначали за допомогою датчиків парціального тиску у відсотках від максимального насичення. Після чого, клітини, що містять тільця включення, осаджували сепаруванням на сепараторі "Westfalia CSA-19". Сиру біомасу суспензювали в буферному розчині А (50 мМтрис-основи з ЕДТА, рН 7,0) у співвідношенні 1:5 (маса : обсяг) і руйнували в проточному дезінтеграторі "Gaulin". Для цього суспензію пропускали через дезінтегратор 3-4 рази при тиску 600 атм. Після дезінтеграції клітинну суспензію сепарували на сепараторі "Сера Z81" при 16000 об/хв. Осад суспензювали в буферному розчині Б (50 мМтрис-НСl, рН 8,0) і знову центрифугували в тих же умовах. Вміст рекомбінантного білка у сумарному клітинному лізаті й чистоту тілець включення аналізували за допомогою електрофорезу в ПААГ.

2. Виділення тілець включення. Процес виділення телець включення із клітин супроводжується формуванням димерів і олігомерів цільового білка з утвором ковалентних зв'язків між молекулами. Для одержання мономерної форми не завжди досить застосовувати агенти, що тільки відновлюють, такі як дитиотреїтол, β - меркаптоетанол і ін. Для досягнення оптимального результату, як правило необхідно використовувати буферні розчини, що містять детергенти й хаотропі агенти. Відновлення дисульфідних зв'язків у рекомбінантному білку. Вологі тілець включення (60 г) суспензювали в 1 л буферу, що містить 7 М гуанідин-НСl, 20 мМтрис-НСl, рН = 8,0; прогрівали протягом 60 хвилин при 37 °С а потім додавали 30 мМ дитиотреїтолу. Продовжували інкубацію протягом 60 хвилин при 37 °С. Розчин відновленого білка Met-РрГРЧ центрифугували 60 хвилин при 10000 g для одержання солюбілізату. Солюбілізацію Met-рГРЧ і тілець включення проводять за стандартною методикою із застосуванням високих концентрацій хаотропних агентів (7 М гуанідин-НСl, 8 М сечовина) у присутності дитиотреїтола при 37 °С. Максимальна розчинність білка в 8 М сечовині становила 4-5 мг/мл. У той же час використання 7 М гуанідин-НСl дозволило забезпечити найбільш повне розчинення тілець включення, відновлення дисульфідних зв'язків у молекулі й збільшити концентрацію солюбілізованого Met- рГРЧ до 9-10 мг/мл. Гель-фільтрація на носії Sephadex G-25. Розчин відновленого Metр ГРЧ (1 л) наносили на стовпчик ВРГ (140 x 500 см), заповнену носієм G-25 Fine. Колонку попередньо врівноважували буферним розчином, що містить 20 мМ трис-НСl, і 8 М сечовини, рН = 8,0. Цей же буферний розчин використовували для проведення розділення при швидкості потоку 120 мл/хв. Вміст білка в елюаті вимірювали за допомогою проточного фотометра при довжині хвилі 280 нм.

3. Ренатурація. Ключовою стадією в процесі одержання рекомбінантних білків є стадія ренатурації, у процесі якої денатурований білок здобуває нативну просторову структуру, що забезпечує його біологічну активність. Розчин білка (Met-рГРЧ, 2 л), отриманий після гель-фільтрації, при постійному перемішуванні зі швидкістю 100-120 мл/хв додавали до 80 л буферного розчину, що містить 40 мМтрис-НСl, 10 мМNaCl, 3 мМ цистеаміну, 0,3 мМ цистаміну, 0,05 мМ ЕДТА й 0,01 % детергенту Brij 35P (Serva), рН = 8,5. Отриманий розчин залишають при 4 °С на 4-6 годин. В умовах промислового виробництва процес ренатурації необхідно проводити при оптимальному обсязі розчину, отриманого в результаті ренатурації; концентрація білка при цьому

повинна бути максимально можливою. Однак підвищення концентрації білка тягне за собою збільшення вмісту в реакційній суміші нерозчинних білкових агрегатів. Найбільш інтенсивна агрегація Met- рГРЧ відбувається в процесі ренатурації при переході від сильно денатуруючих до слабо денатуруючих умов. Застосування неіонних детергентів стабілізує білок у водяному розчині й перешкоджає утворенню агрегатів не ковалентної природи. Відомо, що детергент Brij 35P блокує утворення агрегатів ГРЛ у розчині в концентрації, рівній критичній концентрації міцелоутворення. Твін-80 має ту саму властивість, але в концентрації, що перевищує концентрацію міцелоутворення. Тому в якості стабілізатора Met- рГРЧ у процесі ренатурації був обраний Brij 35P. Для утворення нативних дисульфідних зв'язків була використана система буферних розчинів, що містять окисно-відновну пару цистеамін / цистамін у співвідношенні 1:0,1. Оптимізацію умов проводили по декільком параметрам: ступінь і швидкість розведення солюбілізата, склад буферного 86 розчину для ренатурації. Процес вели методом розведення білка буферним розчином з низькою іонною силою. Процедура ренатурації складалася з декількох етапів. Спочатку розчинений в 7 М гуанідин- хлориді білок за допомогою гель-фільтрації переводили в буферний розчин, що містить 8 М сечовини й 10 мМ цистеаміну. Умови процедури були підібрана таким чином, щоб кінцева концентрація білка становила 4-5 мг/мл. Потім отриманий розчин білка розбавляли при кімнатній температурі буферним розчином для ренатурації й інкубували протягом 8 годин.

4. Іонообмінна хроматографія. Хроматографічне очищення рекомбінантного соматотропіну проводили при температурі 4 °C на радіальній і аксіальній колонках обсягом 0,5 і 1 л, відповідно. У якості сорбенту використовували Q-sepharose FF. Розчин білка після ренатурації (82 літра) за допомогою перистальтичного насоса ("Masterflex") зі швидкістю 300 мл/хв наносили на радіальний стовпчик ("Sepragen 500"), урівноважену 20 мМ трис-НСІ буферним розчином, рН=8 (стартовий буфер). Після нанесення всього обсягу білка сорбент промивали трьома обсягами стартового буфера. Потім до виходу радіального стовпчика приєднували аксіальну колонку ("Pharmacia XK50"), також попередньо врівноважену стартовим буферним розчином. Білок елюїрували відповідно до фотометричного профілю при довжині хвилі 280 нм. Фракції, що містять Met- рГРЧ, поєднували (1,0-1,2 л). Відщиплення N-кінцевого метіоніну. До розчину білка, отриманого після очищення на Q-sepharose FF, додавали лейцинову амінопептидазу (*Aeromonas proteolytica*) у розрахунках 7,5 од. на 1 г білка. Реакцію відщиплення проводили протягом 16 год при кімнатній температурі, повноту гідролізу контролювали за допомогою ізокритичної ЗФ ВЕРХ на колонку Symmetry 300 C18 (4,6 x 250 мм). Після

закінчення гідролізу пік, що відповідає Met-pГРЧ, на хроматограмі не виявляється. У результаті експериментів виявлене, що більш високі значення ступеня гідролізу 87 досягнуто при температурі 20-22 °С и 37 °С. Однак при й 37 °С відбувалося утворення побічних продуктів гідролізу. Проведення реакції при температурі 20-22 °С забезпечувало, з одного боку, високий ступінь відщиплення N-кінцевого метіоніну, а з іншого - низький вихід небажаних домішок. Тому для проведення гідролізу була обрана кімнатна температура. Однак при 20-22 °С кількість внесеного в реакційну суміш ферменту повинно підтримуватися на рівні 7,5 од/г білка; зменшення концентрації амінопептидази супроводжується зниженням ступеня гідролізу Met-pГРЧ.

5. Гідрофобна хроматографія. До розчину рГРЛ після відщиплення N-кінцевого залишку метіоніну додавали NaCl до кінцевої концентрації 2 М. Потім отриманий розчин наносили на аксіальний стовпчик ВРG (140 x 500 мм) ("AmershamBioscience"), заповнену гелем ButylSephарose 4 FF і попередньо урівноважену буферним розчином, що містять 20 мМтрис-НСl, 2 М NaCl, рН = 8,0. Після нанесення колонку промивали тим же буферним розчином. Елюцію проводили при швидкості потоку 80 мл/хв за допомогою зворотного градієнта NaCl (контролювали за допомогою кондуктометра виробництва " Amersham-Bioscience") від 2 до 0 М у тому ж буферному розчині при температурі 4 °С. Детекцію здійснювали за допомогою проточного УФдетектора з фільтром 280 нм. Фракції, що містять не менш 95 % мономерної форми рекомбінантного білка, поєднували. 6. Гель-проникаюча хроматографія. Остаточне очищення рГРЛ проводили на колонці ВРG (140 x 950 мм) гелю Sephacryl S-100 HR, попередньо врівноваженої буферним розчином, що містять 20 мМ Na₂НРО₄, 0,2% гліцину й 4 % маніта, рН = 6,8. Цей же буферний розчин використовували для фракціонування при швидкості потоку 35 мл/хв. Білок в елюатідетектирували за допомогою проточного фотометра при довжині хвилі 280 нм. Фракції, що містять рГРЛ у мономерній формі, поєднували. Отриманий білок розводили до 88 концентрації 1,3 мг/мл, заморожували й зберігали до використання при мінус 20 °С. На фармацевтичному ринку України присутні препарати рекомбінантного гормону росту людини: "Биосома" (Teva, Ізраїль), "Генотропин" (PfizerInc., Швеція), "Нордитропин" (NovoNordisk, Данія), "НутропинАq" (BeaufourIpsenInternational, США), "Сайзен" (Industria Farmaceutica Seronos.p.a., Італія) і ін. Необхідно відзначити, що препарат "Сайзен" отриманий методом генної інженерії з використанням лінії

клітин ссавців, а саме за допомогою клітин молочної залози. Інші перераховані препарати отримані з використанням бактерій *E. Coli*.

Біонанотехнологія в фармації та медицині

Рівень розвитку сучасної науки в цілому зобов'язує дослідників у галузі фармації та медицини до застосування інноваційних технологій в своїй діяльності. До найбільш значущих напрямів наукових досліджень можна віднести пошук і впровадження нових інноваційних технологій в галузі медичної практики і розробки лікарських засобів із заданими властивостями. У даний час дослідники в усьому світі відзначають, що багато фундаментальних завдань, що стоять перед медичною та фармацевтичною наукою, можуть бути вирішені за допомогою нанотехнології. Це направлення, що стрімко розвивається й має справу з сукупністю теоретичного обґрунтування, практичних методів дослідження, аналізу і синтезу, а також методів виробництва та застосування продуктів із заданою атомною структурою шляхом контрольованого маніпулювання окремими атомами і молекулами. Розробки в області біонанотехнологій, зокрема медичних програм, привели до виникнення нової галузі - наномедицини.

Сучасна фармацевтична наука вже може похвалитися цілою низкою успішних прикладів використання досягнення нанотехнології як при створенні лікарських засобів із спрямованої доставкою, так і при їх аналізі. На світовому фармацевтичному ринку намічається постійний тренд зростання інноваційної науково-дослідницької активності. Традиційні лікарські форми не забезпечують доставку всередину цільових клітин. Цю задачу вирішують наноносії, за допомогою яких можливий цілеспрямований транспорт в організм або тканину-мішень, що є одним з базових елементів технології контрольованого вивільнення лікарської речовини. На відміну від макро- і мікрокапсул (розміром 10-500 мкм), наприклад, желатинових, наноносії призначені не тільки для перорального, але і для внутрішньовенного (транспорт до органів-мішеней або тривала циркуляція в кров'яному руслі), внутрішньом'язового, ін'єкційного введення. Крім того, можливо інгаляційне і інтраокулярне введення наноносіїв, а також інтра- і трансдермальна подача лікарських речовин з їх допомогою. Іншими важливими перевагами нанопрепаратів є зниження токсичного ефекту діючої речовини, зменшення разової дози і розвитку резистентності. З використанням ряду наноносіїв можна вирішити проблему біодоступності малорозчинних речовин. Виявлено, що застосування наночасток срібла та вісмуту може виявитися корисним при лікуванні таких захворювань, як трофічні виразки (час заживання рани

скорочується в кілька разів), гнійного остеомієліту, бактеріального вагінозу, різного виду опіків, захворювання ЛОР-органів. У ряді напрямків наномедицини також досягнуто суттєвих результатів. Це знайшло відображення, насамперед, в медичному матеріалознавстві і дезінфекції. Так, наприклад, матеріали з наночастинками срібла, що володіють антибактеріальними властивостями, застосовуються у вигляді фарб, безхлорних засобів дезінфекції, перев'язувальних матеріалів, лаку для покриття катетерів і т.д. Про економічні аспекти досліджень в області спрямованої доставки лікарських речовин можна судити по ряду фактів. Відомо, що подібні препарати зараз складають 86% від обороту в світовій наномедицині, а їх розробкою та впровадженням займаються 50% фармацевтичних компаній-виробників. Застосування нанотехнології дозволяє якісно підняти ефективність багатьох видів медичної діяльності. Зокрема, вони дозволяють створити матеріали, що володіють підвищеною біосумісністю з кров'ю, живими тканинами і фізіологічним розчином людського організму. Говорячи про створення нових лікарських форм, слід зазначити, що безліч розробок рухаються по шляху конструювання наносистем, здатних доставляти лікарський засіб безпосередньо до клітин-мішеней і органів.

Завдяки поліпшеному транспорту лікарських засобів в осередок розвитку патологічного процесу виникає можливість домогтись підвищення ефективності вже існуючої лікарської терапії. Сукупний обсяг продажів у США різного роду лікарських засобів з системою поліпшеної доставки на сьогоднішній день становить 20% від загального обсягу ринку фармацевтичних препаратів. За даними Global Industry Analysts, сукупний обсяг світового ринку наноструктурованих металевих матеріалів, з яких виготовляються, зокрема, наноімпланти, в 2008 році складає 28 млн доларів, а в 2010 році – 198 млн доларів, тобто за 2 роки він виріс більш ніж в 7 разів.

Зростання обсягу ринку обумовлено підвищенням попиту на використання нанобіотехнологічної продукції. У всьому світі зростає потреба в заміниках живих тканин і наноструктурованих імплантатах, необхідних в таких областях медицини, як травматологія, стоматологія, нейрофізіологія, офтальмологія і т.д. Застосування нанотехнології в медицині і фармацевтиці представляє собою приклад виключно плідного синтезу фізичних, хімічних і біотехнологічних наукових знань, в кінцевому підсумку сприяє підвищенню якості надання медичної допомоги та поліпшенню стану здоров'я населення

Генно-інженерна фармакологія

Найпершими, хто серйозно зацікавився генною інженерією, були фармацевтичні фірми. Вони швидко зрозуміли, що завдяки новим технологіям можна отримувати практично будь-які білки і у великих кількостях.

Що таке білок? Це робоча молекула клітини. Вона грає величезну роль регуляції тих процесів, які у організмі. Майже всі гормони є невеликими білковими молекулами. Вони містять кілька десятків амінокислотних залишків. До генної інженерії виробництво гормонів було надзвичайно складною справою.

Людям просто пощастило з інсуліном, оскільки він був тваринним білком, взятим у свині чи великої рогатої худоби, і міг бути заміною гормону людини. Але здебільшого таке просто неможливо. А ось завдяки генній інженерії за короткий термін були отримані штами бактерій, здатні виробляти найрізноманітніші людські гормони.

Наприклад, можна розглянути гормон росту. Організм може його не виробляти внаслідок генетичного дефекту. І тут людина стає карликом. Щоб запобігти такому, дитині необхідно вводити цей найважливіший гормон. За старих часів отримати його можна було лише з людських трупів. В наш час він широко виробляється в лабораторних умовах.

Що ж до інсуліну, то він потрібен насамперед людям, які страждають на цукровий діабет. Ця недуга поширена досить широко. Ті, хто їм страждає, переважно обходяться тваринним інсуліном. Але в окремих хворих він спричиняє алергію. Їм потрібний не тваринний, а людський інсулін. На сьогоднішній день це питання вирішене.

Інтерферон. Великим досягненням стала можливість отримання людського інтерферону. Інтерферон – білок, який має надзвичайно ефективну антивірусну дію. Найголовніше ж – його універсальність. Цей білок ефективний проти різноманітних вірусів. За своєю суттю він є таким самим засобом для вірусів, як антибіотики для бактерій. Але є одна важлива відмінність. Антибіотик пригнічує бактерію лише в тому випадку, якщо вона не має гена стійкості. А для інтерферону характерна видова специфіка. У людському організмі пригнічувати вірусну інфекцію здатний лише людський інтерферон, у деяких випадках можна використовувати мавп. Але донедавна налагодити отримання людського інтерферону не вдавалося. Фахівці навіть не могли визначити амінокислотну послідовність цього білка. Проте генно-інженерна фармакологія практично протягом року кардинально все змінила.

Отримання інтерферону. З клітин крові, заражених вірусною інфекцією, виділили інтерферонову мРНК. За допомогою ревертази

(фермент, що веде синтез ДНК за матрицею РНК) синтезували ген інтерферону та впровадили його в плазмиду. Так було отримано бактеріальний штам, здатний виробляти штучний інтерферон. По ньому визначили амінокислотну послідовність. А вже по ній побудували нуклеотидну послідовність гена, синтезованого. Його також вбудували у плазмиду, і вийшов ще один штам, який виробляє потрібний білок. Щодо штучного інтерферону, то він виявився надзвичайно ефективним противірусним засобом.

Було здійснено наступний дослід. Взяли 8 мавп і поділили їх на 2 групи. Всім тваринам запровадили вірус енцефаломіокардиту. До цього вірусу тварин імунітету був. Тому вони були приречені на смерть. Одна контрольна група тварин загинула через кілька днів після зараження. А другій групі за кілька годин до зараження, а потім кілька разів після зараження вводили штучний інтерферон. Усі 4 мавпи залишилися живими. В даний час даним препаратом лікують вірусні захворювання, гепатит та венеричні хвороби, що викликаються папіломою.

Вакцинація. Вакцинація – надзвичайно ефективний засіб для попередження вірусних епідемій. Як правило, для вакцинації використовуються убиті віруси. Вони виведені з ладу РНК, тоді як білки збережені. Вбиті віруси потрапляють до організму, а той виробляє антитіла. Якщо надалі в організм зможуть потрапити живі віруси, то імунна система їх дізнається та вб'є виробленими антитілами. Завдяки вакцинації, було ліквідовано такі страшні інфекції як віспа та чума. У Середньовіччі від них вмирили мільйони людей.

Однак існують віруси, яких не вдається позбутися. Сюди можна зарахувати ВІЛ, вірус грипу, а тварин тварин вірус ящуру. У разі вакцинація або взагалі нічого не дає, або призводить до часткового успіху. Причина полягає у мінливості вірусів. Це означає, що в їх білках відбуваються заміни амінокислот, і ці віруси стають невідомими для імунної системи людини.

Відповідно, щороку доводиться проводити нову вакцинацію. Однак це загрожує негативними факторами. Коли вакцинацію проводять у величезних масштабах, то важко гарантувати, що всі вірусні частки, що вводяться в організм, убиті. Тому є ймовірність, що такий захід може обернутися не порятунком, а епідемією.

За допомогою генно-інженерної фармакології можна отримати ідеальну нешкідливу вакцину. І тому бактерію змушують виробляти білок оболонки вірусу. У цьому випадку вакцина взагалі не містить інфікованих РНК, тому вона вже спочатку не може порушити хворобу.

А ось пробудити імунітет може. Така вакцина була отримана та випробувана. Фахівці провели дослід з білком оболонки вірусу ящуру.

Випробування дали певні позитивні результати, але не такі ефективні, як передбачалося спочатку. Імунізація такої вакцини у 1000 разів гірша, ніж якщо використати вбитий вірус. Вакцина проти віспи Розглядаючи питання виробництва вакцин, не можна не сказати про використання живої вакцини проти віспи. Ця історія по праву заслуговує на всіляку повагу. Почалася вона в той час, коли віспа лютувала на території Європи і забирала мільйони життів. Тоді всі лікарі шукали засіб, здатний перемогти страшне захворювання. У 1798 році це вдалося англійському лікареві Едварду Дженнеру. Він звернув увагу на те, що доярки іноді заражалися від корів легкою формою віспи. Дане захворювання було не смертельним, і жінки одужували. Але надалі вони вже не хворіли на ту віспу, від якої гинули люди. Едвард Дженнер почав спеціально заражати людей коров'ячою віспою. І в такий спосіб захистив їх від справжньої смертельної віспи. Так англійський лікар започаткував вакцинацію (латинське слово *vaccinus* – коров'яча).

Коров'ячий і людський вірус віспи різні, але мають багато спільного. Але найголовніше те, що окремі білки на поверхні коров'ячого вірусу, який отримав назву вірусу осповакцини, абсолютно схожі на аналогічні білки на поверхні людського вірусу. Саме тому імунна система, приведена в бойову готовність внаслідок щеплення вірусу осповакцини, чудово захищає організм і від смертельного вірусу віспи. Слід зазначити, що вісповакцина виявилася унікальним засобом для епідеміології. Цей вірус для людини абсолютно нешкідливий і надзвичайно ефективний. 1977 року ВООЗ оголосила, що з віспою на планеті покінчено. Адаже вона забирала десятки мільйонів людських життів. Але потреба у вакцині проти віспи не зникла.

Співробітники Інституту охорони здоров'я США вирішили через генно-інженерну фармакологію змінити ефективний вірус так, щоб він захищав не тільки від віспи, але ще й від гепатиту. У молекулу ДНК вірусу осповакцини було вбудовано ген поверхневого білка вірусу гепатиту. При цьому він був забезпечений ефективним промотором (частина ДНК, з якою зв'язується РНК-полімераза для початку синтезу мРНК). Після цього провели дослід на кроликах. Вони показали, що при вакцинації таким вірусом у крові виробляється білок гепатиту, але відразу у відповідь з'являються антитіла, здатні протистояти цьому захворюванню. Даний метод допоміг створити цілу групу вакцин проти різних вірусних захворювань, що спостерігаються як у людини, так і тварин. За основу було взято осповакцину. У її ДНК вбудовували відповідні гени поверхневих білків. В даний час генно-інженерна фармакологія взяла цю методику на озброєння. Вона розвивається

надзвичайно успішно. Їй пророкують велике майбутнє у боротьбі з багатьма вірусними хворобами.

Отримання інтерферонів, інтерлейкінів, факторів крові

Імунобіотехнологія (лат. *immunitas* — звільнення + грец. *bios* — життя + *techné* — мистецтво + *logos* — слово) — галузь біотехнології, що має на меті розробку та отримання біофармацевтичних препаратів, необхідних для корекції імунних дисфункцій. І. об'єднує виробництво вакцин (див. Вакцини), імуноглобулінів крові, імуномодуляторів, імуномедіаторів, моноклональних антитіл та ін.

Методи створення імунобіотехнологічних препаратів залежать від їх призначення та складу. Неспецифічні стимулятори імунної відповіді отримують мікробним синтезом. Продуцентами бактеріальних ліпополісахаридів, що входять до складу таких стимуляторів, служать *Pseudomonas aeruginosa* (пірогенал), *Bacterium prodigiosum* (продигіозан), *Streptomyces divoreticuli* (бестатин), *Saccharomyces cerevisiae* (зимозан) та ін. Препарати на основі первинних метаболітів мікроорганізмів стимулюють переважно клітинний імунітет, підвищуючи кількість та функціональну активність макрофагів і лейкоцитів у периферичній крові.

Використання генно-інженерних методів дозволило виробляти інтерлейкіни та інтерферони. ЛП на основі рекомбінантних білків отримують, уводячи гени, що містять інформацію про синтез білків людини, таких як гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор, альфа-2 β -інтерферон, альфа-2 α -інтерферон, інтерлейкін-2 до геному *Escherichia coli* (нейпоген, егіферон, лаферон, пролейкін та ін.) або до цитоплазми у вигляді плазмід (лейкомакс). Промислове виготовлення вакцин проходить у кілька технологічних етапів. Перший з них — накопичення біомаси мікроорганізмів або продуктів їх життєдіяльності. Ця стадія пов'язана з теорією і практикою керованого біосинтезу. Виробничими етапами також є інактивація мікроорганізмів, концентрація, очищення та ліофілізація.

Розфасування вакцинних препаратів залежить від способу їх введення (для перорального використання — рідкі, таблетовані або дражовані препарати, для підшкірного або в/м введення — в ампулах). Контроль виготовленої вакцини проводять на стерильність, щільність мікробної суспензії, імуногенність та інші якості. Імуноглобуліни, імунні сироватки отримують з крові гіперімунізованих тварин або з

крові людей-донорів. Гібридомні технології дозволяють створювати діагностичні сироватки на основі моноклональних антитіл. Серед перспективних напрямків І., що знаходяться на стадії пошуку, слід відзначити розробку ЛП-імуномодуляторів з метою лікування аутоімунних захворювань та пошук ЛП, що допоможуть подолати проблеми, пов'язані з трансплантаційним імунітетом.

Індуктори інтерферону — це речовини природного чи синтетичного походження, які стимулюють в організмі людини продукцію власного інтерферону, що сприяє формуванню захисного бар'єру, який запобігає інфікуванню організму вірусами та бактеріями, а також регулює стан імунної системи та інгібує ріст злоякісних клітин.

Перспективними інтерферогенами є низькомолекулярні похідні акридонуксусної кислоти (карбоксиметилакридон — СМА), а також різні похідні флуоренонів. Прикладом найвідоміших лікарських препаратів-індукторів інтерферону є циклоферон та тілорон.

Індукторам інтерферону притаманним є явище гіпореактивності, тобто зниження рівня індукції при введенні експериментальним тваринам наступних доз індуктору з інтервалом в 12-24 години до повної відсутності відповіді. Робилися численні та марні спроби подолати цей стан.

Сучасні уявлення про механізм індукції, синтезу та дії інтерферонів дозволяють припустити, що гіпореактивність є захисним механізмом від гіперпродукції інтерферону та реалізується за принципом негативного зворотнього зв'язку.

Дія на клітини (синтезованого внаслідок індукції) інтерферону призводить до пригнічення синтезу білків в цих клітинах, внаслідок чого синтез нових порцій інтерферону у відповідь на наступні індукційні сигнали стає раз від разу слабкішим. Таким чином, погляд на гіпореактивність як на недолік індукторів інтерферону слід вважати помилковим.

Інтерлейкіни являють собою досить різноманітну родину цитокінів за молекулярною масою та біологічними властивостями. Більшість з них поліфункціональні та можуть вироблятися клітинами різних типів: в основному Т-клітинами, моноцитами, макрофагами, В-лімфоцитами, а іноді — фібробластами, тучними клітинами, базофілами та нейтрофілами.

Виявлено, що деякі інтерлейкіни можуть дублювати один одного. Але найбільш важливу роль в реалізації імунної відповіді відіграють інтерлейкіни, що утворюються макрофагами (ІЛ-1), Т-хелперами (ІЛ-2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 13)

Технологія інтерферонів

Інтерферон був відкритий в 1957 році Н. Isaacs і J. Lindenmann. Авторами виявлене цікаве явище - зараження клітин крові вірусом до виділення ними білка, який має противірусну активність. Цей білок одержав назву інтерферону (інтерференція - відштовхування). Інтерес до цього феномена був величезний. Інтерферони - низькомолекулярні білки з молекулярною масою 20- 40 кДа. Синтез інтерферону здійснюється клітинами у відповідь на проникнення в них вірусу, у результаті чого припиняється розвиток і розмноження вірусу у тканинах. Біологічна дія інтерферону характеризується наступними факторами: - універсальність - інтерферон активний проти більшості ДНК- і РНК містких вірусів; - виражена тканинна специфічність; - наслідок - після видалення інтерферону в оброблених клітинах зберігається здатність пригнічувати розмноження вірусів; - внутрішньоклітинна активність із дистанційним характером дій (інтерферон діє на віруси лише в процесі їх розмноження, через цитоплазматичну мембрану клітини, а не безпосередньо на геном); - нечутливість до антитіл проти вірусів, що їх індукують. Загальні ефекти в дії інтерферонів можуть проявлятися як противірусні, антипроліферативні й імуномодуючі. Антипроліферативна дія інтерферонів обумовлена безліччю ефектів: інгібуванням трансляції, придушенням експресії клітинних протоонкогенів і інших ростових факторів клітини. 95 Залежно від виду індуктора й типу клітин-продуцентів інтерферони розділяють на альфа, бета й гама типу: альфа-інтерферон або лейкоцитарний інтерферон продукує лейкоцити, які оброблені вірусами або іншими агентами (віруси, бактерії і їх токсини, полісахариди й синтетичні речовини); бета-інтерферон або фібробластний інтерферон продукується фібробластами, обробленими вірусами або іншими агентами; гама-інтерферон або імунний інтерферон. Існує декілька підтипів інтерферонів. Молекули інтерферону мають відмінності в амінокислотному складі. За своїми структурними і функціональними властивостями інтерферони підрозділяють на дві групи: - інтерферони I типу - альфа, бета, омега, капа, епсилон, тау, дельта; - інтерферони II типу - гама. Усі інтерферони I типу мають дуже багато загального в амінокислотних, і відповідно, у нуклеотидних послідовностях і структурі відповідних генів. Інтерферон - альфа у всіх видів тварин складається з багатьох індивідуальних представників (близько 20 підвидів), гомологічність між якими на рівні нуклеотидних послідовностей становить близько 80 %. Усі гени цього сімейства формують кластер, згрупований переважно на одній хромосомі (у

людини - хромосома 9). На відміну від інтерферону- альфа у більшості видів тварин інтерферон- бета існує у вигляді тільки одного представника. Крім того, на відміну від інтерферону-альфа, інтерферони - бета являють собою глікопротеїни. Інтерферони-омега, які були відкриті при аналізі бібліотеки ДНК, присутні не у всіх видів тварин, а в людини з 6 представників цього сімейства тільки один існує у функціональній формі, а інші представлені псевдогенами. Інтерферон- тау був виявлений тільки в корів і овець в епітелії ембріонів на ранніх стадіях ембріонального розвитку. Інтерферон-гама не має структурної гомологічності з інтерферонами I типу. На відміну від генів інтерферону I типу, гени інтерферону II типу містять інтрони. Інтерферони-гама, як і інтерферони- 96 бета, являють собою глікопротеїни. Інтерферони I й II типів об'єднані тільки за основною функцією, а саме по противірусній активності. Інтерферони типу II виконують важливі функції регуляторів імунної системи. Як правило, у нормі клітини не продукують помітної кількості інтерферонів доти, поки не відбудеться його індукція. Однак дуже невеликі кількості іРНК інтерферону можна визначити за допомогою високочутливих методів аналізу й без якої-небудь явної індукції інтерферону. Можна говорити про те, що при нормальних умовах постійної продукції інтерферону не спостерігається. Необхідно зупинитися на механізмі дії інтерферонів. Самі по собі молекули інтерферону не впливають безпосередньо на внутрішньоклітинні процеси. Подібно гормонам, факторам росту й іншим медіаторам міжклітинної взаємодії інтерферони взаємодіють лише з рецепторами, розташованими на поверхні клітинних мембран. Ендогенні інтерферони для прояву своєї біологічної активності повинні спочатку секретуватися клітинами, у яких вони синтезуються, а потім взаємодіють із поверхневими рецепторами. Після зв'язування інтерферону з рецепторами ініціюється ланцюг складних внутрішньоклітинних реакцій, які починаються передачею сигналу до ядра й активацією транскрипції генів, які відповідають на інтерферони. Транскрипція відповідних генів і синтез відповідних білкових продуктів приводить до вироблення ефекторних внутрішньоклітинних механізмів, що і є специфічною дією інтерферонів. В остаточному підсумку, ми спостерігаємо ланцюжок численних ефектів інтерферону, як на клітинному рівні, так і на рівні організму в цілому, головним з яких є інгібування реплікації вірусу в інфікованих клітинах. Рецептори інтерферону I й II типу різні, хоча й мають певну структурну спільність. Усі інтерферони I типу (як альфа, так і бета) конкурують за ті самі рецептори, у той час як взаємодія інтерферону-гама із клітинами здійснюється при участі інших рецепторів. Під дією інтерферонів спостерігається продукція інших цитокінів, індукція специфічних 97 ферментів, пригнічення проліферації клітин, імуномодуляція

(посилення фагоцитарної активності макрофагів, специфічної цитотоксичності лімфоцитів стосовно клітин- мішень) і т.ін. На сьогоднішній день в Україні зареєстрований ряд препаратів інтерферону: 1 природні: - альфа-інтерферони: людський лейкоцитарний інтерферон (ЗАТ "Біолек", ВАТ "Біофарма"); - бета-інтерферони: людський фібробластний інтерферон бета 1b (Бетаферон - "Schering AG"); 2 рекомбінантні (Роферон-Альфа 2a - "Roche", Інтрон- А - альфа 2b - "Schering-Plough", Лаферон - альфа 2b - "ФАРМБІОТЕК").

Одержання лейкоцитарного альфа-інтерферону

Лейкоцитарний інтерферон відноситься до інтерферонів першого покоління і його виробництво дотепер існує в ряді країн (Фінляндія, Україна, Росія й ін.) Ми розглянемо основні етапи одержання інтерферону з лейкоцитів крові людини під впливом вірусу - інтерофероногена. Насамперед, зупинимося на культивуванні вірусів за допомогою курячих ембріонів і контролі вірусів на культурі клітин у реакції гемаглютинації або визначення цитопатичної дії. Початок застосування курячих ембріонів, що розвиваються для вирощування вірусів припадає на 1928-1935 рр. Цей період австрійський вчений Бернет назвав "першою золотою епохою" розвитку вірусології, оскільки вона відкрила можливість культивування вірусів на досить зручній лабораторній моделі, як правило, інтактною відносно багатьох збудників інфекційних захворювань. По суті, це був перший біотехнологічний процес накопичення вірусів, придатний для промислового й масового виробництва вірусної біомаси. 98 Курячі ембріони, що розвиваються, є універсальним і простим для маніпуляцій об'єктом. Це пояснюється тим, що курячий ембріон містить чотири різні природні поживні субстрати для накопичення вірусів: амніотичну й аллантаїсну рідини, хорионаллантїсну оболонку й жовтковий мішок, клітини яких, як і клітки самого ембріона, є високочутливими до різних вірусів. Для одержання курячих ембріонів використовують яйця від білих леггорнів, що мають тонку шкарлупу. Вони можуть бути використані тільки протягом 10 днів після знесення. А якщо ні, то розвиток зародка, незважаючи на запліднення, сильно затримується. Інкубацію проводять у звичайних інкубаторах з автоматичним пристосуванням для перекидання яєць, вентилятором, термометром і гігрометром, при температурі 37,2-37,8 °С й вологості 60-70 %. Роботу із зараження курячих ембріонів проводять в асептичних умовах. У цей час, згідно з міжнародними вимогами (GMP), роботу з вірусомістким матеріалом проводять у ламінарних боксах, забезпечених надлишковим потоком

стерильного повітря, що пройшло через мембранні фільтри. Для одержання вірусу при виробництві інтерферону, зараження проводять в аллантаїсну порожнину. Зараження здійснюють на 10-11 добу розвитку ембріона. В області повітряної камери шкарлупу дезінфікують спиртовим розчином йоду й пропалюють. Потім проколюють її зондом і в отвір, що утворювався, вносять 0,1-0,2 мл інокуляту з відтитрованим вірусом. При цьому ін'єкційну голку вводять на 1- 2 мм нижче границі. Зараження проводять вірусом у певному титрі. Щоб мати стерильну суспензію вірусу до вірусного матеріалу додають по 100- 1000 мг стрептоміцину й 100-1000 ОД пеніциліну. Після зараження ембріона отвір у шкарлупі заливають парафіном і яйця поміщають в інкубатор. Яйця з ембріонами витримують протягом 48 годин. Потім їх охолоджують протягом 3-4 годин при температурі 2-4 °С та піддають овоскопії. При виявленні загиблих ембріонів яйця вибраковують. Перед одержанням вірусу шкарлупу дезінфікують над повітряною камерою й відокремлюють пінцетом. Аллантаїсну рідину відсмоктують піпеткою або за допомогою спеціального 99 апарата. З одного ембріона, залежно від його віку, можна зібрати до 8-10 мл аллантаїсної рідини. Аллантаїсну рідину можна одержати без еритроцитів, піддавши її центрифугуванню при 3000 об/хв протягом 20-30 хвилин при температурі 2- 6 °С. Після одержання аллантаїсної рідини її перевіряють на стерильність, а також на вміст вірусу і його кількості шляхом титрування, наприклад, у реакції гемаглютинації або визначення цитопатичної дії. Для критерію оцінки біологічної активності вірусів використовують титрування на клітинній культурі - виявляють дозу, що викликає цитопатичний ефект в 50 % заражених культур (ЦПД 50) або визначають гемаглютинаційні одиниці вірусу. Одним з методів контролю активності вірусу є реакція гемаглютинації, заснована на здатності вірусу склеювати еритроцити. Для проведення реакції готують ряд послідовних дворазових розведень вірусу й додають до них певну кількість еритроцитів (наприклад, курячих). У тих зразках, де кількість вірусу було достатньо для повної аглютинації, спостерігається утворення конгломератів з еритроцитів, які швидко осідають на дно, утворюючи на всій поверхні червону плівку. При відсутності вірусу еритроцити осідають на дно у вигляді компактного осаду. За титр приймають граничне розведення вірусомісткої рідини, що викликало аглютинацію еритроцитів на 50 %. Цитопатична дія вірусу (ЦПД 50), що використовується при виробництві лейкоцитарного інтерферону повинна бути від 10⁸ до 10⁹ ЦПД 50. Титрування вірусів проводять на культурі клітин, наприклад, фібробластів. Рідину, що містить вірус розводять методом послідовних розведень (на середовищі Ігла, середовищі 199 і ін.) від 10¹ до 10¹⁰. Зразки розведень вірусу 10⁸ -10¹⁰ у необхідній кількості переносять у

лунки плашок, що містять культуру клітин. Плашки з культурою клітин, заражених вірусом, поміщають у термостат при температурі $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ на 72 години. Потім проводять облік біологічної активності вірусу за ефектом цитопатичної дії. Титром вірусу вважається максимальне розведення вірусу при якому ефект цитопатичної дії виражений в зразках з однаковим розведенням. Технологія одержання лейкоцитарного альфа-інтерферону складається з наступних стадій: 1. Для одержання лейкоцитарної плівки використовують кров або плазму донорів зі спеціалізованих центрів (в Україні це центри переливання крові), затверджених національним органом контролю імунобіологічних препаратів. Донори проходять контроль на контамінацію вірусними (гепатити В і С, ВІЛ і ін.) і бактеріальними агентами. Кров або плазму центрифугують при 1000-1500 об/хв протягом 20-25 хвилин при температурі $2-8 ^\circ\text{C}$. Відокремлюють шар лейкоцитів зі значним вмістом еритроцитів. У ряді методів пропонується використовувати полівініловий спирт для кращого поділу компонентів крові. Кількість живих лейкоцитів в отриманій плівці повинна бути не менш 97 %. Визначення нежиттєздатних лейкоцитів проводять фарбуванням еозинамом натрію. 2. Еритроцити лізують за допомогою хлориду амонію (0,83 %-ий розчин при значенні рН - $7,0 \pm 0,5$) згідно з методикою Кентелла (1981 р.). 3. Оброблену хлоридом амонію лейкоцитарну плівку ресуспендирують у середовищі Ігла MEM, що містить бікарбонат натрію, антибіотик і сироватку крові людини, очищену від імуноглобулінів. 4. У якості праймера додають 20 ОД/мл сирого альфа-інтерферону (сирий альфа-інтерферон - це продукт, отриманий у результаті процесу індукції, але не очищений й не оброблений хлороводневою кислотою при рН 2,0 протягом 5 днів з метою інактивації вірусних агентів). 5. Отриману суспензію інкубують у стерильних скляних ємностях. Лейкоцити праймірують протягом 2-3 годин при температурі $(36 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ й періодичному перемішуванні (50-200 об/хв), а потім додають вірусіндуктор (вірус Сендай або вірус хвороби Ньюкасла й ін.) до кінцевої концентрації 150-250 мл гемагглютинаційних одиниць. Використовується алантоїсна рідина з титром вірусу не менш 108 мл ЦПД 50. Після 1 години 101 інкубації для прикріплення вірусу лейкоцити розводять до $4 \cdot 10^6$ кл/мл (в 2,5 рази) тим же середовищем. Потім культуру інкубують 15-20 годин при $(36 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$, видаляють клітини й дебрис при 500-1000 об/хв протягом 15-20 хвилин при температурі $2-8 ^\circ\text{C}$. В отриманому розчині визначають титр інтерферону. 6. Розчин інтерферону концентрують в 50 раз,

використовуючи фільтруючу систему з тангенціальним потоком, через яку проходять з'єднання з молекулярною масою 10 кДа й менш. Процес проводять при температурі 2-8 °С. Концентрований розчин інтерферону центрифугують при 9000 g протягом 30 хвилин при температурі 2-8 °С. Можливе зберігання розчину при температурі мінус 60-70 °С. 7. Потім проводять очищення інтерферону за допомогою афінної хроматографії. Даний метод очищення передбачає використання моноклональних антитіл, специфічних до альфа-інтерферону людини, наприклад, антитіл NK2 комерційного виробництва (Celltech Limited, Englan). Моноклональні антитіла з'єднують із активованої CNBrсефарозой 4В. Концентрований сирий інтерферон розморожують і очищають центрифугуванням 15000-18000 g протягом 60 хвилин при температурі 2-8 °С. Прозорий розчин інтерферону фільтрують через фільтри з розміром пор 0,22-0,45 мкм і наносять на стовпчик з моноклональними антитілами. Інтерферон Елююють зі стовпчика розчином, що містять 0,1 М лимонної кислоти й 0,3 М хлористого натрію (рН - 2,0). 8. Кислотну інкубацію й нейтралізацію вірусів при рН 2,0 проводять при 4 °С протягом 5 доби (не менш). За цей період відбувається необхідна інкубація сторонніх агентів, включаючи віруси. 9. Після 5 днів інкубації рН розчину доводять до значення 7,2-7,4 і стандартизують розчин до вмісту білка 1-3 мг/мл. 10. Проводять гель-фільтраційну хроматографію інтерферону. Розчин інтерферону наносять на стовпчик із препаративною гранульованою 102 сефарозою у кількості 5 % від обсягу стовпчика. Елюювання проводять фосфатним буфером. Усі фракції, що містять основну кількість інтерферону поєднують і піддають стерилізаційній фільтрації через мембрани с розміром пор 0,22 мкм. Розчин зберігають при температурі мінус 60-70 °С. 11. При одержанні інтраназального інтерферону проводять очищення ультрафільтрацією через мембрани з порогом відсікання 300 кДа (без проведення стадії афінної хроматографії). До розчину інтерферону додають криопротектори, препарат розливають у флакони й піддають ліофілізації. Таким чином, провівши аналіз матеріалів, присвячених технології одержання лейкоцитарного альфа-інтерферону можна запропонувати наступну технологічну схему його виготовлення, яка показана на рис. 7.1. Існує думка, що природні інтерферони, які є сумішшю різних підкласів і видів, мають більш високу терапевтичну ефективність у порівнянні з рекомбінантними інтерферонами. Так, природний інтерферон- альфа може використовуватися для лікування кондилом з однаковою ефективністю в дозах в 4 рази менших у порівнянні з рекомбінантним інтерфероном.

Одержання рекомбінантного інтерферону

У цей час більшість препаратів інтерферону отримано методами генної інженерії. Застосування рекомбінантного інтерферону дозволило розширити арсенал лікарських засобів для лікування дуже багатьох важких захворювань: новотворів лімфатичної системи й системи кровотворення (хронічний мієлолейкоз, шкірна Т-клітинна лімфома, неходжкінська лімфома низького ступеня злоякісності й ін.); солідні пухлини (саркома Капоши у хворих СНІДом, метастазуюча меланома, меланома після хірургічної резекції й ін.); вірусні захворювання (хронічний активний гепатит В и гепатит С и ін.). Першим етапом створення рекомбінантного інтерферону є виділення кДНК інтерферонів. Для виділення генів або кДНК білків людини використовують різні підходи. У ряді випадків виділяють потрібний білок і визначають амінокислотну послідовність відповідної ділянки молекули. Виходячи із цього знаходять, що кодує його нуклеотидну послідовність, синтезують відповідний олігонуклеотид і використовують його в якості гібридизаційного зонда для виділення потрібного гена або кДНК із геномних або кДНК-бібліотек. Інший підхід полягає у виробництві антитіл до очищеного білка й використанні їх для скринінгу бібліотек, у яких відбувається експресія певних генів. Для білків людини, синтезованих переважно в якійсь одній тканині, кДНК-бібліотека, отримана на основі мРНК, виділена із цієї тканини, буде збагачена послідовністю ДНКмішені. Наприклад, основним білком, синтезованим клітинами острівців Лангерганса підшлункової залози, є інсулін, і 70 % мРНК, виділених із цих клітин, кодує саме його. Однак принцип збагачення кДНК не застосуємо для тих білків людини, кількість яких дуже мало або місце синтезу яких невідомо. У цьому 105 випадку знадобитися використовувати інші експериментальні підходи. Інтерферони (альфа, бета, гама) - це природні білки, кожний з яких може знайти своє терапевтичне застосування. При виділенні їх кДНК довелося розробити новий підхід, що дозволяє подолати труднощі, пов'язані з недостатнім вмістом відповідних мРНК і білків. Процедура виділення кДНК інтерферонів полягала в наступному: 1. З лейкоцитів людини виділили мРНК і фракціонували її за розмірам; провели зворотну транскрипцію й вмонтували в сайт PstI плазмиди pBR322. 2. Отриманим продуктом трансформували *Escherichiacoli*. Утворені 6000 клонів підрозділили на 12 груп: по 512 клонів у кожній. Тестування проводили на групі клонів, що дозволило прискорити процес їх ідентифікації. 3. Кожну групу клонів гібридизували з неочищеним препаратом

інтерферон-мРНК. 4. З утворених гібридів, що містять клоновану ДНК і мРНК, виділили мРНК і провели її трансляцію в безклітковій системі синтезу білка. 5. Визначили інтерферонну противірусну активність кожної суміші, отриманої в результаті трансляції. Групи, що виявили інтерферонну активність, містили клон із кДНК, гібридизованої з інтерферон- мРНКк; 6. Позитивні групи розбили на 8 підгруп, що містять по 64 клони, і знову провели тестування. Розбивку на підгрупи повторювали до тих пір, поки не ідентифікували клон, що містить повнорозмірний інтерферон- кДНК людини. Одним з перших рекомбінантних препаратів інтерферону є Роферон-А, (альфа-2а) HoffmanlaRoche - високоочищений білок, який містить 165 амінокислот з молекулярною масою близько 19 кДа. Препарат одержують за технологією рекомбінантної ДНК із використанням генноінженерного штаму E. coli із включеною плазмідною, що містить ген інтерферону лейкоцитів людини. 106 Показано експериментально, що рівень експресії генів інтерферона дійсно збільшується пропорційно числу тандемних копій гена, принаймні, до чотирьох копій на плазмиду. Однак тандемні повтори іноді виявляються нестабільними й згодом деякі з них або навіть усі втрачаються плазмідною. Палзмідозалежні технології є високо продуктивними, проте, мають серйозний недолік. Цільовий продукт, як правило, утворює в клітині не розчинні у воді кристалоподібні форми, так названого "тільца включення". Процес виготовлення й очищення інтерферону при використанні плазмідної технології складається з таких стадій: - збирання клітинної біомаси, її дезінтеграція; - розчинення "тілець включення" шляхом денатурації білкових структур за допомогою сечовини або гуанідихлориду; - ренатурація денатурованих молекул інтерферону; - очищення інтерферону від баластових компонентів. У процесі ренатурації молекул інтерферону спостерігається утворення некоректних внутрішньо- і міжмолекулярних зв'язків. Це приводить до часткового утворення неправильних мономерних форм рекомбінантного інтерферону, конформація яких відрізняється від такої в природнього інтерферону, і виникненню його олігомерних структур, які відсутні в природньому інтерфероні. Запропонований оригінальний спосіб одержання рекомбінантного інтерферону з використанням вбудованого в бактеріофаг гена інтерферону. Бактеріофаг, заражаючи бактеріальну клітину, розмножується в ній, копіюючи багаторазово свою ДНК і вбудований у неї ген інтерферону, синтезує свої білки, у тому числі й інтерферон. На певній стадії розвитку бактеріофаг лізує бактеріальну клітину. Інтерферон виходить у культуральну рідину, причому, у водорозчинному стані, не утворюючи нерозчинних форм. Синтез організований таким чином, що інтерферон накопичується поза клітиною, у культуральному середовищі, 107 тому не

утворює "тілець включення", як це має місце в плазмідній технології одержання інтерферону (Intron-A, Roferon-A і ін.). Накопичення інтерферону в культуральній рідині дозволяє очищати його за спрощеною схемою: відсутність необхідності збору біомаси, її дезінтеграції, денатурації білків з метою розчинення "тілець включення" і ренатурації молекул інтерферону. Відсутність стадії концентрування клітин (збір біомаси), а також і клітинних білків, дозволяє одержати високоочищений препарат інтерферону менш складним методом, ніж той, що використовується при "плазмідній" технології. Очищення здійснюється іонообмінною хроматографією. За запропонованою технологією був отриманий рекомбінантний інтерферон "Лаферон". В отриманому препараті виявляється не менш 95 % білка інтерферону. Перший ген інтерферону був виділений на початку 80-х рр. З тих пір було виявлено кілька різних інтерферонів. Виходячи з хімічних і біологічних властивостей, їх можна підрозділити на три групи: інтерферон-альфа, інтерферон-бета, інтерферон-гама. Інтерферон-альфа й інтерферон-бета синтезуються клітинами, обробленими препаратами вірусів або вірусної РНК, а інтерферон-гама виробляється у відповідь на дію речовин, що стимулюють ріст клітин. Інтерферон-альфа кодується сімейством генів, що включають як мінімум 15 неаллельних генів, у той час як інтерферон-бета й інтерферон-гама кодуються одним геном кожний. Підтипи інтерферону альфа проявляють різну специфічність. Наприклад, при перевірці ефективності інтерферона-альфа-1 і інтерферона-альфа-2 на обробленій вірусом лінії клітин бика ці інтерферони проявляють подібну противірусну активність, у випадку ж оброблених вірусом клітин людини інтерферональфа-2 виявляється в сім раз активніше, ніж інтерферон-альфа-1. Якщо противірусна активність перевіряється на клітинах миші, то інтерферональфа-2 виявляється в 30 раз менш ефективним, ніж інтерферон-альфа-1. Було почато кілька спроб створити інтерферони з комбінованими властивостями, використовуючи той факт, що члени сімейства інтерферону-108 альфа різняться за ступенем й специфічності своєї противірусної активності. Теоретично цього можна досягти, з'єднавши частини послідовності генів різних інтерферон-альфа. Це приведе до утворення гібридного білка з іншими властивостями, ніж в кожного з вихідних білків. Порівняння послідовностей кДНК інтерферона-альфа-1 і інтерферональфа-2 показало, що вони містять однакові сайти рестрикції в позиціях 60, 92 і 150. Після розщеплення обох кДНК у цих сайтах і наступного лігування фрагментів було отримано кілька гібридних генів. Ці гени

експресували в *E. coli*, синтезовані білки очистили й досліджували їх біологічні функції. Перевірка захисних властивостей гібридних інтерферонів на культурі клітин ссавців показала, що деякі з них проявляють більшу активність, ніж батьківські молекули. Крім того, багато гібридних інтерферонів індуціювали утворення 2'-5'-олігоізо-аденілат-синтетази в контрольних клітинах. Цей фермент бере участь у синтезі 2'-5'-зв'язаних олігонуклеотидів, які в свою чергу активують латентну клітинну ендорибонуклеазу, що розщеплює вірусну мРНК. Інші гібридні інтерферони проявляли більшу, ніж батьківські молекули, антипроліферативну активність у культурах різних ракових клітин людини. Крім рекомбінантних інтерферонів-альфа, які відносяться до конкретного різновиду цього типу інтерферонів, початий також випуск так названих "консенсусних" інтерферонів. До них відносяться, зокрема, інтерферон "Альфакон-1" або "Інферген" ("Амген").

Інтерферони з такими послідовностями взагалі не існують у природі, а представляють собою нові задані комбінації амінокислотних послідовностей відомих субтипів. Такі комбіновані інтерферони є більш ефективними, ніж рекомбінантні інтерферони на основі природних субтипів. Генно-інженерні інтерферони представлені білками тільки однієї певної форми, яка не зазнає посттрансляційної модифікації й не ідентична природним інтерферонам, що може обмежити біологічну активність відповідної композиції. Intron (альфа-2b) ScheringPlough; Roferon A 109 (альфа-2a) - HoffmanLaRoche; Лаферон (альфа-2b) - Україна являють собою винятково форму альфаінтерферона-2.

Інтерферони, отримані за допомогою природних джерел, таких як лімфобластоїдна клітинна лінія людини або лейкоцити периферичної крові людини представлено багатьма формами. За наявним даними препарати, отримані із природних джерел, можуть містити більш 15 білків з молекулярною масою від 18 до 25 кДа, що володіють антивірусною, антиростовою імунорегуляторною активністю.



Схема одержання лейкоцитарного інтерферону



Схема одержання рекомбінантного інтерферону

Нові технології у виготовленні імунобіологічних препаратів

Нові технології створення вакцин розширили галузь застосування — від профілактики інфекційних хвороб до профілактики їх наслідків (наприклад, вакцинація проти гепатиту В запобігає розвитку гепатоцелюлярної карциноми як наслідку перебігу хронічного гепатиту В; або ж вакцинація проти ВПЛ-асоційованої патології запобігає розвитку раку шийки матки). Ряд вакцин зараз перебувають на стадіях доліцензійних досліджень, метою їх створення є профілактика та лікування неінфекційних захворювань, таких як автоімунні захворювання, рак, алергія, наркоманія.

Наприклад, вчені зі Стенфордського (США) й Лейденського (Нідерланди) університетів розробили ДНК-вакцину ВНТ-3021. Вакцина створена на основі плазмиди, вона кодує попередник інсуліну — проінсулін. Це вакцина зворотної дії: якщо звичайні вакцини повинні активувати імунні реакції, то ВНТ-3021, навпаки, нейтралізує цитотоксичну дію Т-кілерів, направлену проти острівців Лангерганса. У першій фазі клінічних випробувань ВНТ-3021 показала свою ефективність у дослідженні, у яке було включено 80 осіб.

Половина з них кожних сім днів протягом 12 тижнів отримувала внутрішньом'язові ін'єкції ВНТ-3021, а друга половина — плацебо. Після закінчення цього терміну група, яка отримувала вакцину, продемонструвала підвищення рівня С-пептидів в крові, що свідчить про відновлення функції бета-клітин. Ніяких серйозних побічних ефектів у жодного з учасників зафіксовано не було.

Рослини у фармацевтичній біотехнології

Сьогодні у світі відбувається так звана зелена революція, і рослинні біотехнології відіграють у ній ключову роль. В Інституті клітинної біології і генетичної інженерії НАН України розроблено низку рослинних біотехнологій фармацевтичного призначення. Цей напрям біотехнології рослин називають ще «молекулярним фермерством», оскільки його сенс полягає в тому, що рослини виробляють фармацевтичні білки.

Інший напрям рослинних біотехнологій фармацевтичного призначення - це створення біотехнологічних рослин з противірусною активністю. Але існують проблеми використання традиційної лікарської рослинної сировини:

1. Заготівля рослинної сировини призводить до скорочення цінних природних рослинних ресурсів і навіть зникнення цілих видів рослин. Лише для медико-біологічних випробувань нового протипухлинного препарату таксолу було знищено 12 000 дорослих дерев тису; практично повністю зникли в дикорослому стані женьшень, кірказон манчжурський, солодка, золотий та маралій корінь та ін.

2. Рослини, що виростили в природних умовах або на плантаціях, зазвичай містять значну кількість токсичних домішок та ін.

Біотехнологія рослин – це наука про використання рослинних організмів, клітин, тканин та органів рослин, субклітинних, молекулярних структур та метаболітів рослинної клітини для створення біотехнологічних

продуктів. Біотехнологія рослин як окрема галузь біотехнології виникла за поєднання результатів розробок фізіології, генетики та цитоембріології рослин. Основою біотехнології рослин є метод культивування ізольованих клітин, тканин та органів *in vitro*. Він дозволяє використовуючи ізольований стан об'єктів культивування в умовах *in vitro* керувати диференціацією та морфогенезом рослини, спрямовувати їх на досягнення визначених цілей, проводити генетичну трансформацію.

Світова тенденція розвитку фармацевтичної промисловості свідчить, що використання біотехнології для одержання рослинної сировини із запрограмованим хімічним складом є перспективним і у деяких випадках економічно вигідним. Культуру клітин і тканин доцільно використовувати для одержання метаболітів ЛРС, що має обмежену сировинну базу.

Перевагою методу є проведення технологічного процесу за обмежений відрізок часу, що економить кошти на культивування лікарських рослин і зберігає земельні ресурси. Стандартизовану (однорідну) рослинну субстанцію одержують у стандартних умовах керованого процесу, що обмежує вплив на вихід БАР екологічних та стресогенних факторів. Одержана біомаса екологічно чиста, оскільки не використовуються гербіциди, пестициди і регулюється склад поживного середовища.

Культура рослинних клітин — це стимулювання поділу клітин ізольованих сегментів рослин. Перші відомості про можливість вирощувати шматочки рослинних тканин відноситься до 1893 р. Вперше культуру тканин лікарської рослини катарантуса рожевого одержав Ф. Уайт у 1945 р. Його та Р. Готре вважають засновниками культури рослинних тканин та органів як нової галузі у біологічній науці. Можливість вирощування клітин і тканин рослин у промислових масштабах з'явилася у кінці 50-х рр. після створення спеціальних апаратів — ферментаторів, що дозволяють подавати середовище для вирощування, воду, повітря, зберігати стабільну температуру, регулювати рН. вести необхідне перемішування. На цей же час припадає початок освоєння методу у країнах СНД. З ім'ям Р. Г. Бутенко та О. Г. Волосовича пов'язане створення аймалінових штамів з культури тканин стебла раувольфії зміїної та резерпінових — із тканин коренів. Були досягнуті певні успіхи у культивуванні барвінка рожевого, стефанії гладенької, дурману індійського, женьшеню звичайного та інших рослин.

Фітобіотехнологія (грец. *phyton* — рослина, *bios* — життя, *techne* — мистецтво, *logos* — слово, вчення) — сукупність технологій, в яких використовуються біологічні процеси рослинних клітин для одержання біомаси, цілих організмів чи продуктів їх життєдіяльності. У Ф. виділяють такі напрями, як клітинна та генна інженерія.

Клітинна інженерія пов'язана зі стерилізацією рослинних тканин та органів, їх ізолюванням і вирощуванням в умовах *in vitro* на спеціальних поживних середовищах. У таких умовах рослинні клітини втрачають спеціалізацію (дедиференціюються) та починають активно ділитися, утворюючи калюс (аморфна тканина, клітини якої діляться). Обов'язковою умовою дедиференціювання рослинної клітини та перетворення її на калюс є присутність у поживному середовищі представників двох груп фітогормонів: ауксинів, що зумовлюють дедиференціювання спеціалізованих клітин, та цитокінінів, що приводять до поділу дедиференційованих клітин. При перенесенні пухкого калюсу з твердого до рідкого поживного середовища за умов автоматичного струшування чи перемішування та аерації отримують суспензійну культуру. Клітинні суспензії у Ф. широко застосовуються для отримання вторинних метаболітів, які мають практичне значення для фармацевтичної промисловості (антибіотики, алкалоїди, глікозиди та багато інших), для промислового вирощування клітинної біомаси, з якої отримують білкові, вітамінні, ферментні препарати, що додають до корму сільськогосподарських тварин, для клітинної селекції з подальшою регенерацією цілої рослини з метою отримання нових форм і сортів рослин. У Ф. при використанні суспензійних культур як продуцентів вторинних речовин застосовують закриті або відкриті системи біореакторів у періодичному або безперервному режимах вирощування клітин. Так, у фармацевтичній промисловості з метою отримання лікарських і парфумерних речовин широко використовуються суспензійні культури клітин таких видів рослин, як тютюн, женьшень, наперстянка шерстиста, раувольфія зміїна, беладона та багато інших.

Генна інженерія пов'язана з отриманням генетично модифікованих рослин з цінними для людини властивостями. Вона базується на технологіях утворення рекомбінантних молекул ДНК. Під рекомбінантними розуміють ДНК, що утворюються поєднанням *in vitro* двох чи більше фрагментів ДНК, призначених для введення в рослинну клітину. При цьому рекомбінантні ДНК стають складовою частиною генетичного апарата реципієнтного рослинного організму і надають йому нових унікальних властивостей. За допомогою спеціальних ферментів (рестрикційних ендонуклеаз) молекули ДНК, виділені з будь-яких організмів, можна розрізати у певних місцях. Унаслідок цього утворюються фрагменти ДНК, що містять окремі гени чи групи генів. За допомогою інших ферментів (ДНК-лігаз) ці фрагменти можна зібрати,

або «зшити», у певній послідовності, вони є новими рекомбінантними ДНК. Щоб одержати велику кількість ідентичних копій таких рекомбінантних молекул ДНК, зазвичай використовують бактеріальні плазмиди або віруси, які називають клонуємими векторами. Напр., за допомогою агробактеріальної трансформації, тобто з використанням *Agrobacterium tumefaciens*, отримано трансгенні рослини, що несуть ген білка оболонки вірусу гепатиту В. У мишей, яких годували цими трансгенними рослинними продуктами, був ідентифікований синтез специфічних антитіл. Трансгенні рослини також синтезують альбумін і соматотропін людини, моноклональні антитіла, вакцини та інші фармацевтично цінні продукти, але поки що їх промислове отримання ускладнюється в більшості випадків методичними та технічними труднощами.

Нове покоління низькомолекулярних гепаринів

У 1916 р. студент-медик Джей Мак Лін (Jay Mac Lean), працюючи під керівництвом проф. Хоувелла (Howel) в університеті Джона Гопкінса, виділив з печінки субстанцію, що перешкоджає згортанню крові і отримала в 1922 назва гепарин (від грецького «гепар»-печінка). Довгий час гепарин використовували як реактив, що запобігає згортанню крові при лабораторних дослідженнях. Перші спроби терапевтичного застосування гепарину для лікування післяопераційних венозних тромбозів пов'язані з роботами американського лікаря Masson (1924), канадського хірурга Murray та його шведського колеги Crafoord (1935). Лікарським препаратом, призначеним для профілактики венозних тромбозів, гепарин стає напередодні Другої світової війни, тобто. більш ніж через 20 років після свого відкриття. Промисловий випуск гепарину був розпочатий у розпал війни (1944), що пов'язано з колосальним зростанням частоти венозних тромбоемболічних ускладнень (ВТЕО), викликаних мінно-вибуховою травмою та наслідками краш-синдрому. Надалі гепарин міцно займає свої позиції як засіб профілактики та лікування венозного тромбозу.

У 1971 р. англійський хірург V. Kakkar довів ефективність використання малих доз (три підшкірні ін'єкції на добу) кальцієвої солі гепарину для профілактики післяопераційних ВТЕО. Аж до кінця 80-х років ХХ століття метод «low-dose» (малих доз), розроблений V. Kakkar, служив основним способом профілактики ВТЕО в усьому світі. До середини 70-х років, в результаті серії досліджень, проведених шведськими та англійськими фармакологами, стало очевидно, що зменшення довжини полісахаридних ланцюгів гепарину автоматично знижує їхню молекулярну масу, не

впливаючи на здатність інгібувати один з ключових факторів системи згортання крові - Ха. Разом з тим, при цьому значно знижується можливість придушення активності тромбіну (IIa) – основної причини виникнення геморагічних ефектів при проведенні гепаринотерапії. Вже в 1978 р. була запатентована фракція гепарину СУ-216 із середньою молекулярною масою 4500 Д замість звичайних 15 000 Д. У 1985 р. після серії вдалих клінічних експериментів, проведених групою, очолюваної V. Kakkar, і підтвердили ефективність молекулярною масою перший комерційний препарат надропарин кальцію (фраксипарин) був допущений до клінічного застосування. З кінця 80-х – початку 90-х років минулого століття низькомолекулярний гепарин (НМГ) активно впроваджується у клінічну практику.

Незважаючи на майже вікову історію та появу нової генерації антикоагулянтів, гепарин, як і раніше, залишається препаратом першого вибору при профілактиці та лікуванні ВТЕО.

Сучасний низькомолекулярний гепарин, а точніше гепарини, виробляють за допомогою різних процесів хімічної або ферментативної деполімеризації з нефракціонованого гепарину (НФГ), джерелом якого є біологічна сировина - різні тканини свійських тварин, головним чином слизова оболонка кишечника свині. НМГ широко застосовують як альтернативу стандартному гепарину в різних галузях сучасної клінічної медицини [3-7]. Зростаюча популярність НМГ пояснюється їхньою високою ефективністю, безпекою, зручністю застосування, а також відсутністю необхідності регулярного контролю лабораторних показників. Водночас фармакологічні властивості та безпека НМГ багато в чому визначаються якістю вихідної сировини. Так, у 2007-2008 роках. зміна складу активного інгредієнта НФГ, що поставляється з Китаю, спричинила низку серйозних реакцій, схожих на алергію, включаючи виражену артеріальну гіпотонію та смерть, при введенні високих доз препарату. У подальшому виявлення небажаних домішок або припущення про можливу наявність таких спричинило відкликання деяких партій гепарину рядом виробників. Водночас від офіційної констатації проблеми до виявлення характеру небажаних домішок (висока концентрація надмірно сульфатованого хондроїтинсульфату) пройшло близько 2 місяців, а можливий причинно-наслідковий зв'язок між цією особливістю складу діючої речовини та виникненням ускладнень було встановлено ще пізніше. Гарантією безпеки може бути лише добре налагоджений процес виробництва з належним багатоступеневим контролем якості.

Склад НМГ складніший, ніж склад НФГ, оскільки навіть при порівнянні довжині молекули особливості процесу деполімеризації неповторно змінюють структуру полісахаридних ланцюгів. Ось чому різні НМГ відрізняються не тільки від НФГ, а й між собою за складом полісахаридів, особливостями фармакокінетики та фармакодинаміки. Унікальність хімічного складу та фармакологічних властивостей кожного препарату НМГ призвела до того, що їх вважають окремими, що клінічно не взаємозамінні лікарськими засобами. Відповідно, показання, особливості застосування та дози, що рекомендуються для одного НМГ, не можна механічно переносити на інших представників цієї групи.

Механізм дії НФГ та НМГ

Гепарин каталізує зв'язування природним антикоагулянтом – антитромбіном (АТ) кількох ферментів, що беруть участь у процесах згортання крові. З'єднуючись з молекулою АТ, молекула гепарину викликає конформаційні зміни останньої, у результаті щонайменше 1000 разів збільшується здатність активного центру АТ взаємодіяти з низкою активованих чинників згортання крові. Утворюючи комплекс з АТ, ці ферменти перестають брати участь у процесі згортання крові, що зрештою призводить до зменшення кількості молекул тромбіну. Крім цього, молекула гепарину виступає як каталітична поверхня, на якій взаємодіють АТ та деякі активовані фактори зсідання крові: тромбін (IIa), Xa, IXa та XIa.

На відміну від НФГ, НМГ має короткі полісахаридні ланцюги (менше 18 моносахаридів), що значно збільшує біодоступність препарату при підшкірному введенні та забезпечує більш повільний кліренс, який здійснюється переважно нирками. Крім цього, НМГ у порівнянні з НФГ втрачає частину антитромбінової активності, натомість набуваючи здатності селективно пригнічувати фактор Xa, завдяки чому ризик геморагічних ускладнень значно знижується. Крім стандартної антикоагулянтної дії, НМГ дає ряд позитивних плейотропних ефектів щодо тканинного активатора плазміногену та його інгібітора, фактора фон Віллебранда, системи активованого протеїну С, ендотеліальних факторів росту, а також забезпечує протизапальну, антипроліферативну та імунологічну дію.

Очевидно, що подальше підвищення безпеки та ефективності НМГ безпосередньо пов'язане зі зменшенням їхньої молекулярної маси та забезпеченням однорідності полісахаридних ланцюгів. Роботи у цьому напрямі і призвели до створення нової (другої) генерації НМГ, представником якої є беміпарин .

Відмінні риси беміпарину

Беміпарин натрієва сіль (беміпарин) являє собою НМГ нового покоління, що отримується шляхом лужної деполімеризації (β -комерційного НФГ, що екстрагується зі слизової оболонки кишечника свиней. Середня молекулярна маса беміпарину 3600 Д. При цьому 85% полісахаридних ланцюгів важать менше 6000 Д. Період напіввиведення беміпарину 5,3 год. Основний показник активності НМГ - співвідношення анти-Ха/анти-Па-факторних активностей - для беміпарину.

Сучасні НМГ демонструють високі показники клінічної ефективності та профілю безпеки, завдяки чому стають основою специфічної профілактики ВТЕО у стаціонарних та амбулаторних пацієнтів. Подальша модифікація НМГ, спрямована на зменшення молекулярної маси, забезпечення однорідності полісахаридних ланцюгів та збільшення тривалості дії, призвела до створення нового (другого) покоління препаратів, представником якого є беміпарин (цибор). До додаткових переваг цибору можна віднести простоту вибору оптимальної профілактичної дози. Зазначені відмінності дозволяють розраховувати на те, що НМГ нового покоління – беміпарин (цибор) займе гідне місце у сучасній клінічній практиці.

Біотехнологічне отримання низькомолекулярних гепаринів

Спосіб отримання включає такі стадії: (а) формування захисту сульфогруп взаємодією високомолекулярного гепарину з видаленням бензилового ефіру гепарину з видаленням у спирті, б) етерифікації отриманої солі бензилюванням в апротонному розчиннику, в) виділення неповного складного бензилового ефіру гепарину з видаленням бензетонієвого захисту сульфогруп насиченим розчином ацетату натрію в спирті, г) розщеплення макромолекули гепарину лужною деполімеризацією та д) формування кінцевих 1,6-ангідрогруп β -елімінуванням при взаємодії з сильним відновником, і відрізняється тим, що на стадії (а) відмивання гепаринату бензетонію від надлишку бензетонію хлориду, що не прореагував, виробляють багаторазовою дробовою промиванням водою очищеною із застосуванням ультразвуку робочої частоти 30-40 кГц, потужністю випромінювання 200-400 Вт, бензилового ефіру гепарину проводять у дві послідовні операції: виділення бензилового ефіру гепаринату бензетонію з розчину осадженням метанольним розчином ацетату натрію з подальшим

зняттям бензетонієвого захисту сульфогруп насиченим метанольним розчином ацетату натрію.

ПЕРЕЛІК ПИТАНЬ ДО ЕКЗАМЕНУ

1. Складові біотехнологічного процесу виробництва лікарських засобів
2. Біотехнологія отримання антибіотиків
3. Біотехнологія отримання гормональних препаратів
4. Отримання інтерферонів, інтерлейкінів, факторів крові
5. Моноклональні антитіла і ДНК-або РНК-проби
6. Рекомбінантні вакцини та вакцини-антигени
7. Ферменти медичного призначення
8. Нові технології у виготовленні імунобіологічних препаратів
9. Рослини у фармацевтичній біотехнології
10. Джерела отримання лікарських речовин
11. Біотехнологічне отримання вітамінів
12. Нові технології у виготовленні імунобіологічних препаратів
13. Біотехнологія амінокислот
14. Біотехнологія фармацевтичних препаратів з дріжджів
15. Фосфоліпіди в біотехнології
16. Генно-інженерна фармакологія
17. Біонанотехнологія в фармації та медицині
18. Шляхи біотехнологічного отримання антибіотиків
19. Етапи розвитку виробництва антибіотиків
20. Класифікація і структура антибіотиків
21. Отримання антибіотиків з використанням біосинтезу
22. Отримання антибіотиків з використанням генної інженерії
23. Отримання антибіотиків з використанням іммобілізованих ферментів
24. Умови культивування продуцентів антибіотиків
25. Біотехнологічне отримання низькомолекулярних гепаринів
26. Виробництво препаратів інсуліну
27. Виробництво гормонів росту людини
28. Живі вакцини
29. ДНК вакцини. Вірусна і бактеріальна доставка
30. Біотехнологія цитокінінів
31. Біотехнологія препаратів фагів
32. Отримання нуклеїнових кислот з дріжджів
33. Біотехнологія отримання фармацевтичних препаратів на основі дріжджів
34. Ферменти, що виділяються з дріжджів
35. Вторинні метаболіти рослин - фармакологічно активні речовини
36. Рослинні вакцини
37. Рослини-продуценти імуноглобулінів
38. Біотехнологічне отримання фосфоліпідів
39. Умови культивування продуцентів антибіотиків
40. Основні технологічні етапи отримання антибіотиків і методи їх очистки
41. Історія відкриття антибіотиків
42. Класифікація гепаринів за спектром дії та хімічною структурою
43. Класифікація вітамінів і методи їх одержання
44. Методи очистки і концентрації вітамінів

45. Основні методи ідентифікації і контролю препаратів, що містять вітаміни
46. Історія створення і виробництва природного та рекомбінантного інсуліну
47. Система класифікації імунобіологічних препаратів
48. Методи ідентифікації та контролю препаратів, що містять інтерферони. Визначення антивірусної активності інтерферонів
49. Структура фагів і перевага їх використання в порівнянні з антибактеріальними препаратами
50. Класифікація амінокислот і їх основні властивості. Основні штами-продуценти амінокислот
51. Вимоги до виробництва і контролю якості біотехнологічних препаратів
52. Рекомбінантні вакцини і вакцини-антигени
53. Одержання β -каротину

Перелік літератури

1. Bogachev V.Yu. A new generation of low-molecular weight heparins with special reference to bemiparin. *Flebologiya*. 2011;5(2):64-69.
2. Герасименко В.Г. Біотехнологічний словник — К., 1991; Імунобіологічні препарати: Довідник / В.В. Смирнов, О.П. Сельнікова, В.Д. Думанський та ін. — К., 2001;
3. Державна фармакопея України. Первое издание. — Харьков, 2001.—530 с.
4. Державна фармакопея України. Первое издание. Дополнение 2. — Харьков, 2008.— 617 с.
5. Краснопольский Ю.М. Биотехнология иммунобиологических препаратов / Ю.М. Краснопольский, М.И. Борщевская. — Харьков, Издательство «Фармитэк», 2008. —312 с.
6. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов: Учебное пособие / Ю.М. Краснопольский, М.И. Борщевская. — Харьков, НТУ «ХПИ», 2009. —351 с.
7. Біотехнологія в агросфері: навч. посіб. / Мельничук М. Д., Кляченко О. Л. ; Кабінет Міністрів України, Нац. ун-т біоресурсів і природокористування України. Вінниця: Нілан, 2014. 265 с.
8. Біотехнологія: Підручник / В.Г. Герасименко, М.О. Герасименко, М.І. Цвіліховський та ін.; Під общ. ред. В.Г. Герасименка. Київ : Фірма «ІНКОС», 2006. 647 с.
9. Буценко, Л.М., Пенчук Ю. М., Пирог Т. П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: навч. посібник. Київ : НУХТ, 2010. 323 с.
10. Екологічна біотехнологія. У 2 кн. : навч. посіб. Кн. 1 / [О. В. Швед, Р. О. Петріна, О. З. Комаровська-Порохнявець, В. П. Новіков]. - Львів: Львівська політехніка, 2018. 424 с.
11. Карпов О.В., Демидов С. В., Кир'яченко С. С. Клітинна та генна інженерія : Підручник. Київ : Фітосоціоцентр, 2010. 208 с.
12. Попов Н.Н., Савченко В.Н., Моджекву Ч.Ч., Куринная Е.Г. Виды и средства иммунотерапии. Фармакотерапевтический справочник. — Х., 2002.
13. Мельничук М. Д., Кляченко О. Л., Бородай В. В., Коломієць Ю. В. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник. Київ : ФОП Корзун, 2014. 252 с.
14. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин : Підручник для студ. вищ. навч. Закладів. Київ : Поліграфконсалтинг, 2003. 520 с.
15. Основи біотехнології: монографія / І. В. Бондар, В. М. Гуляєв ; М-во освіти і науки України, Дніпродзержин. держ. техн. ун-т. Дніпродзержинськ, 2009. 211 с.