

Комплект ситуационных задач

Занятие 1. Тема «Совершенствование биообъектов методами клеточной и генетической инженерии. Имобилизованные биообъекты».

Задача 1.

Существуют вполне определенные требования и условия для создания и развития биотехнологического производства ЛС (лекарственные средства). В частности, это касается проблемы выбора биообъектов для масштабирования производства. Имеются существенные различия между диким штаммом и промышленным штаммом. Штамм обладает вполне конкретными свойствами природного характера, а производственный процесс имеет свои требования к этому штамму. Существуют способы воздействия на дикий штамм с целью удовлетворения требований производства ЛС.

Проанализируйте данную ситуацию с точки зрения:

- представления о биообъекте и его функциях;
- соответствия свойств продуцента требованиям производства ЛС и проблем безопасности при работе с продуцентами;
- применения конкретных методов преобразования биообъекта для дальнейшего использования его в создании новых продуцентов ЛС.

Задача 2.

Как известно, при использовании клеточной инженерии при создании новых продуцентов широко применяют методику протопластирования (получения протопластов) как процесс конструкции гибридных структур.

В плане решения задачи получения новых продуцентов как источников новых ЛС предложите:

- схему получения протопластов и гибридных структур;
- условия сохранения протопластов;
- конечные цели, достигаемые с помощью продуктов гибридной природы.

Задача 3.

В современной биотехнологии при создании ЛС особое место отводится генной инженерии, суть технологии которой заключается

в искусственном соединении отдельных фрагментов ДНК *in vitro* с последующим введением изолированной ДНК в живую клетку с целью получения рекомбинантных белков. Для осуществления этого необходимы определенные условия, наличие транспортного устройства для внесения ДНК в клетку продуцента, использование ферментов для включения нового гена. Генная инженерия оперирует такими понятиями, как вектор, рестриктазы, липкие концы, сайт узнавания, лигазы, ген-маркер, компетентность клетки, экзон, интрон.

С представленных общих позиций по генной инженерии сформулируйте конкретные условия:

- расшифруйте понятие «вектор» и пути его введения в клетку; предложите ферменты, работающие в этой ситуации;

- предложите технику генно-инженерного эксперимента (стадии):
- сравните процесс образования мРНК у эукариот и прокариот.

Задача 4.

Возникновение таких новых дисциплин, как геномика и протеомика, является настоящим прорывом в биологии и имеет большое значение при создании новых, более эффективных ЛС. Если геномика обозначает совокупность всех генов организма, то протеомика подразумевает совокупность всех каталитических и структурных белков в клетке эукариота или прокариота. Задача геномики - полная генетическая характеристика именно всей клетки. Геномика позволяет выразить сущность организма, его видовые и индивидуальные отличия, предвидеть реакцию на внешние воздействия. Геномика имеет свою классификацию, открывает новые возможности для генотерапии, создания нетрадиционных ЛС, таких, как антисмысловые олигонуклеотиды.

В свете представленной краткой информации приведите:

- классификацию геномики с обозначением соответствующих задач;
- возможности генотерапии;
- ситуации возможного применения антисмысловых олигонуклеотидов.

Задача 5.

Современный скрининг ЛС предполагает получение новых ЛС, более эффективных и безопасных. Скрининг как метод предполагает поиск и отбор продуцентов, с помощью которых можно получать новые ЛС с достаточной степенью функциональной активности, определяемой по биологическим тестам с дальнейшей расшифровкой химической структуры и механизма действия. Скрининг можно проводить в классическом варианте или на генном уровне.

Проанализируйте последние достижения геномики и протеомики, помогающие в решении проблем поиска новых эффективных и безопасных ЛС. В ответе используйте:

- современные данные о последних достижениях геномики и протеомики;
- понятие таргетного скрининга;
- международные программы поиска ш-генов.

Эталоны ответов:

Задача 1.

Из определения биотехнологии следует, что основным инструментом получения или модификации ЛС является биообъект. Именно поэтому - это продуцент, биосинтезирующий нужный продукт, либо фермент, катализирующий присущую ему реакцию. Для использования активно функционирующего биообъекта необходимо знать его свойства с целью его совершенствования. Все биообъекты можно подразделить на:

- макрообъекты (человек, млекопитающие, рептилии, рыбы, насекомые, растения);
- микрообъекты (эукариоты - низшие грибы, водоросли, кроме нитчатых; прокариоты- актиномицеты, бактерии, сине-зеленые водоросли);
- микробиосистемы (ферменты, протопласты).

Выбор биообъекта зависит от его конкретных свойств, таких, как безвредность, устойчивость к фагам и вирусам, активность биосинтеза, скорость роста и накопление биомассы, стабильность по производительности, чувствительность к условиям культивирования (аэрация, pH, температура), потребность в источниках углеводов и азота, использование дешевых и доступных питательных сред, соответствие условиям промышленного производства (отсутствие неприятного запаха, невысокая вязкость среды).

Повышение биосинтетической активности биообъекта возможно прежде всего благодаря использованию методов мутагенеза и селекции. Методы современной селекции сочетаются с применением генной инженерии, которая манипулирует ДНК, изменяя либо число и порядок расположения генов, либо проводя внутригенные изменения. Важной характеристикой мутантов является их способность к реверсии (обратное мутирование). Типы мутаций: делеция, дупликация, амплификация и др.

Проблема безопасности в работе с продуцентами на физическом уровне предполагает понижение давления внутри ферментера для предотвращения возможного выброса культуральной жидкости во внешнюю среду. На биологическом уровне это прежде всего неукоснительное соблюдение правил GMP, одновременно можно, например, сделать биообъект «капризным» в отношении компонентов питательной среды, тогда во внешней среде без них он существовать не сможет.

Задача 2.

Одним из способов модификации биообъекта с целью усиления его функциональной активности является метод клеточной инженерии.

Клеточная инженерия - это техника обмена фрагментами ДНК, участками хромосом у прокариот и участками и целыми хромосомами у эукариот независимо от степени эволюции.

Для получения гибридных клеток применяют технику протопластирования, которая включает следующие этапы:

- выбор биообъектов (прокариот, эукариот);
- обработку клеточных стенок ферментами;
- стабилизацию протопластов (10% гипертонический раствор аннита, сахарозы, хлорида натрия);
- слияние протопластов в среде ПЭГ; для облегчения фузии клетки обрабатывают солями металлов, ферментами или быстро меняют температуру; т.е. делают их компетентными; при слиянии (фузии) получается протопласт с двумя наборами хромосом
- диплоидный набор (рекомбинация ДНК);
- регенерацию (восстановление стенки протопласта).

Полученный гибрид засевают на плотную питательную среду. Чтобы отличить гибридную клетку от негибридной, необходимо на 4-й стадии включить еще один протопласт, несущий маркер. Маркер - это участок гена, кодирующий образование какого-либо фермента, который «заявляет» о себе при высеве на питательную среду, например маркер бета-лактамаза. Если в питательной среде находится бензилпенициллин, то вырастут только клетки, содержащие бета-лактамазу, а это могут быть только клетки-гибриды. При протопластировании и слиянии протопластов может происходить явление амплификации (увеличения) количества генов. Например, если амплифицируется ген, ответственный за синтез целевого продукта, то выход последнего (витамины, гормоны,

антибиотики) соответственно увеличивается.

Задача 3.

Цели генной инженерии - создание новых продуцентов целевых продуктов (новые ЛС, диагностические и профилактические препараты).

Суть технологии - соединение фрагментов ДНК *in vitro* с последующим введением изолированной ДНК в живую клетку посредством ферментов эндонуклеаз, в частности рестриктаз.

Техника генно-инженерного эксперимента

- Получение чужеродного фрагмента ДНК для последующей вставки его в клетку хозяина.
- Выделение плазмиды из клетки-донора (например, *E. coli*).
- Конструирование рекомбинантной плазмиды (вектора). Вектор-рекомбинант (плазида в виде фага или изолированной ДНК, или вируса) получают с помощью фермента рестриктазы, разрезающей фосфодиэфирные связи в строго определенном месте последовательности оснований нуклеотидной цепи (сайт узнавания). При этом образуется два липких конца. Далее следует стадия отжига - процесс смещения двух фрагментов ДНК, при котором восстанавливаются только водородные связи. Для восстановления фосфодиэфирных связей используют ферменты ДНК-лигазы, которые «сшивают, склеивают» молекулы ДНК.
- Включение вектора в клетку хозяина. Вектор включается в клетку хозяина при условии, если цитоплазматическая мембрана близко подходит к клеточной стенке, тогда вектор проникает внутрь клетки через так называемые окошечки, которые образуются при обработке ее ферментами, в результате чего эта клетка становится компетентной.
- Отбор гибридных клонов. Проводят посев на питательную среду, содержащую, например, антибиотик бензилпенициллин. При этом вырастают только клоны, имеющие в своем геноме ген-маркер, кодирующий синтез, например, фермента бета-лактамазы.

Ген-маркер заранее внедряется в геном гибридной плазмиды.

В процессе образования молекулы мРНК имеет место процесс сплайсинга (сращивания). У эукариот, в отличие от прокариот, ген представляет собой мозаичную структуру, содержащую наряду с экзонами (последовательности оснований, несущие информацию) интроны (последовательности оснований, не несущие информацию). Однако фермент РНК-полимераза катализирует транскрипцию как экзонов, так и интронов. В процессе сплайсинга у эукариот интроны с помощью ферментов вырезаются, а экзоны после удаления интронов сращиваются. При этом образуется функционирующая (зрелая) мРНК. У прокариот нет такого процесса (так как их гены не содержат интроны), и образующаяся в результате транскрипции молекула мРНК сразу же способна к функционированию.

Задача 4.

Согласно целям и задачам, различают структурную, сравнительную и функциональную геномику. Структурная геномика занимается идентификацией геномов клеток и отдельных структурных генов по определенным характеристикам: общее количество генов в геноме и их последовательность, молекулярная масса, нуклеотидная последовательность в каждом гене. Эти характеристики относятся к геному-хромосоме у прокариот и к каждой из хромосом у эукариот. Сравнительная геномика получает

сведения о степени гомологии родственных генов, что позволяет ответить на вопрос об эволюционной близости одного организма другому. Она также позволяет вести поиск ингибиторов какого-либо гена (вернее, кодируемого им белкового продукта) у патогенного микроорганизма с целью создания на их основе ЛС, однако при этом необходимо знать, есть ли ген с такой или близкой последовательностью нуклеотидов в организме хозяина. Таким путем можно определять также степень безопасности ЛС. Функциональная или метаболическая геномика устанавливает связь между геномом и метаболизмом, кластерами генов и многоступенчатыми метаболическими процессами, отдельными генами и конкретными метаболическими реакциями (в этом случае имеются свои специализированные базы данных).

Практическим применением достижений геномики является генотерапия. Для реализации возможностей генотерапии требуется предварительное создание рекомбинантной генетической конструкции с нормальной копией дефектного гена, а также создания для этой конструкции вектора, переносящего ее в клетки организма пациента. Векторы строятся на основе ретровирусов или аденовирусов и их генетических модификаций с тем условием, чтобы при сохранении способности проникать в клетку они теряли бы способность к автономной репликации. Современная генотерапия направлена только на соматические клетки. Генотерапия *ex vivo* предполагает введение путем трансфузии или трансплантации исправленных копий дефектного гена, предварительно извлеченных из клеток организма пациента. В этом случае снимается проблема отторжения клеток и необходимость проведения терапии иммуносупрессорами. При генотерапии *in vivo* осуществляется доставка в ткани пациента нормального, но выделенного из клеток другого организма гена (чужеродного).

Антисмысловые олигонуклеотиды - ЛС XXI века, представляющие собой комплементарную для определенного участка гена последовательность нуклеотидов (длиной 15-20 нуклеотидов), которая за счет водородных связей будет реагировать или с ДНК гена, или с его иРНК, матрицей для которой служит вышеуказанная ДНК. Такие ЛС могут использоваться в случае гиперпродукции нормального функционально активного белка, что является причиной некоторых как наследственных, так и ненаследственных заболеваний.

Подавление образования избыточного белка в случае применения антисмысловых олигонуклеотидов будет происходить либо на стадии транскрипции (реакция с ДНК), либо на стадии трансляции (реакция с иРНК). В качестве защиты от эндонуклеаз клетки предлагают «упаковку» таких нуклеотидов в липосомы.

Задача 5.

Успехи молекулярной биологии в развитии таких направлений, как геномика и протеомика, позволяют исследователю при использовании соответствующих международных баз данных получать сведения о каждом гене, входящем в геном тест-объекта, получить любой ген в изолированном состоянии, копировать его с помощью ПЦР и на полученной таким образом матрице нарабатывать сначала информационную РНК (иРНК), а затем уже в бесклеточной рибосомной системе и специфический для этого гена белок. Данный белок рассматривают как таргет, т.е. мишень для оценки на молекулярном уровне потенциальных биологически активных агентов как природных, так и синтетических соединений. Используя такой метод скрининга, можно целенаправленно вести поиск ингибиторов функций продукта конкретного гена. Таким образом, таргетный

скрининг ЛС начинается не с клетки, а с конкретного гена в качестве тест-объекта. Предпочтение тому или иному гену отдают исходя из задачи (какого рода ЛС мы хотели бы получить) и с учетом данных структурной, сравнительной и метаболической геномики. В дальнейшем отобранные таким образом БАВ должны быть испытаны на предмет клеточной проницаемости, достижения мишени, токсичности и т.д. В качестве частного случая можно указать на перспективность использования таргетного скрининга при поиске «молчащих» или скрытых генов вирулентности (*v'*-генов). С учетом проблемы обнаружения этих генов *in vitro* используют метод так называемого захвата чужого промотора (IVET). Суть метода представлена ниже.

Геном патогенной бактерии «режется» рестриктазами на сотни фрагментов.

Каждый фрагмент соединяется с лишенным промотора геном хлорамфеникол-ацетилтрансферазы:

Далее к этой генно-инженерной конструкции присоединяется лишенный промотора лактозный оперон:

- Представленная комбинация включается в плазмиду. Получается набор плазмид, различающихся только по фрагменту «х» генома сальмонеллы.

- Наборы плазмид вводят в клетку *E. coli* и получается ряд различных штаммов *E. coli* с разными частями генома сальмонеллы.

- Производят внедрение *E. coli* в организм лабораторного животного (мыши) с одновременным введением ей хлорамфеникола.

- Через сутки из ткани животного на твердую индикаторную среду с лактозой высевают бактериальную культуру.

- Анализ колоний. Красные колонии (90%) и бесцветные колонии (10%). Если на индикаторной среде с лактозой выросла бесцветная колония, значит, на искусственной питательной среде данный промотор (промотор лактозного оперона) не работал, и ген во фрагментах х, дс2, х3... хп не экспрессировался. Именно здесь и нужно искать *i*-гены, т.е. гены вирулентности.

Занятие 2. Тема «Получение аминокислот, витаминов и коферментов биотехнологическими методами и с помощью иммобилизованных клеток и ферментов. Конструирование штаммов-продуцентов и оптимизация условий ферментации».

Задача 1.

В процессе промышленного производства аскорбиновой кислоты используют многостадийный химический синтез, в который наряду с тонкими химическими реакциями встроена и технологически необходимая биосинтетическая реакция, что является одним из примеров успешного сочетания органического синтеза с биосинтезом.

При проведении технологического этапа биосинтеза на производстве применяют определенные микроорганизмы, осуществляющие биосинтетические реакции. Не менее важными являются оптимизация условий ферментации и контроль за количеством биомассы микроорганизмов в ферментационном аппарате.

Проанализируйте ситуацию с точки зрения:

- химической реакции биотрансформации, определяющей проведение биосинтеза и получение ожидаемого результата при осуществлении биотрансформации;
- выбора микроорганизмов для биоконверсии и оптимального подбора компонентов питательной среды (источников углерода, азота и фосфора);
- возможности увеличения выхода целевого продукта.

Задача 2.

При получении штаммов суперпродуцентов аминокислот, таких, как треонина или лизина, используют микроорганизмы *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Bacillus subtilis*. В одном случае биосинтез аминокислоты идет одновременно с ростом биомассы (путь получения аминокислоты одностадийный), в другом случае сначала идет рост биомассы и только потом синтез аминокислоты (путь двухстадийный).

В данной ситуации получения аминокислот обоснуйте:

- преимущества биосинтеза перед органическим синтезом и подбор соответствующих микроорганизмов для получения штаммов-продуцентов, способных к сверхсинтезу нужной аминокислоты, если конечным продуктом будет лизин или треонин;
- выбор пути биосинтеза для лизина или треонина и особенности питательных сред;
- условия ферментации (подготовительная стадия и биосинтез).

Задача 3.

Как известно, производство витамина В₁₂ (кобаламин*) является чисто биотехнологическим способом его получения, когда в качестве продуцента данного витамина используют пропионовые бактерии из рода *Propionibacterium*, выращиваемые на богатой среде в определенных условиях ферментации с обязательным добавлением предшественника витамина В₁₂ - 5, 6-диметилбензимидазола.

В этой ситуации:

- сделайте оптимальный выбор метода ферментации и условий ее проведения;
- докажите необходимость добавления 5,6-диметилбензимидазо-ла в определенное время после начала ферментации и предупредите образование коферментной формы витамина В₁₂;
- предложите методы выделения и очистки данного витамина, учитывая место его накопления.

Задача 4.

Применение иммобилизованных ферментов и белков в медицине открывает новые возможности создания эффективных ЛС.

Продемонстрируйте возможности и достоинства гидролаз при модификации таких широко применяемых антибиотиков, как пенициллины и цефалоспорины на основании:

- уникальных свойств гидролитических ферментов и определенных изменений в структуре данных антибиотиков, связанных с получением более эффективных аналогов;
- сравнения химического пути трансформации с биокаталитической технологией;
- производственных результатов получения этих антибиотиков
- как целевых продуктов.

Задача 5.

Несмотря на то что в основе современной инженерной энзимологии лежит применение ферментов и ферментных систем, технологическое использование ферментов имеет вполне конкретные ограничения: лабильность ферментов, дороговизна и большая трудоемкость при их очистке, однократность их использования, в ряде случаев наличие коферментов.

Проанализируйте ситуацию с обоснованием:

- путей преодоления этих ограничений;
- сопоставления функции биообъекта с технологической операцией;
- понятия «система, открытая для усложнения».

Задача 6.

Витамины как группа незаменимых органических соединений различной химической природы необходимы любому организму в небольших концентрациях с целью выполнения в нем каталитических и регуляторных функций. С помощью биотехнологии сегодня можно получать в необходимых количествах такие витамины, как В₂, В₁₂, бета-каротин*, витамин РР, эргостерин, аскорбиновую кислоту.

Проведите сравнительный анализ получения вышеуказанных витаминов с помощью биотехнологии, принимая во внимание:

- биообъекты, которые используют в каждом конкретном случае;
- получение суперпродуцентов рибофлавина и витамина В₁₂,
- преимущества биотехнологического производства витаминов.

Задача 7.

Аминокислоты известны как составные элементы белков. Биологически активными

являются только L-стереоизомеры аминокислот. Чистые L-аминокислоты находят свое применение в медицине в качестве или самостоятельных лечебных препаратов (L-метионин), или в составе смесей для парентерального питания, и в фармацевтической промышленности при синтезе различных ЛС. Используют их и как добавки при коррекции питания. Аминокислоты получают различными способами: биологическим, химическим, химико-энзиматическим, микробиологическим. В настоящее время аминокислоты как ЛС завоевали себе определенный и довольно значительный сегмент от общего объема фармацевтической продукции.

С учетом представленной информации проведите сравнительный анализ:

- предложенных методов получения аминокислот на конкретных производствах;
- выбора микроорганизмов-биообъектов для создания штаммов-суперпродуцентов;
- особенностей подбора питательных сред с учетом ферментативной регуляции биосинтеза на клеточном уровне.

Задача 8.

На рисунке представлена схема регуляции биосинтеза аминокислот лизина, треонина и изолейцина у бактерий *Brevibacterium flavum*:



АК - аспараткиназа; ДДПС - дигидродипиколонатсинтаза;

ГД - гомосериндегидрогеназа; ГК - гомосеринкиназа;

ТС - треонинсинтаза; ТД - треониндезаминаза

.....▶ ингибирование

- - - - - ▶ репрессия*

*- Ингибирование конечным продуктом (ретроингибирование) - взаимодействие фермента с конечным продуктом цепи биосинтеза, находящимся в среде в избытке. Это взаимодействие приводит к инактивации фермента и прекращению биосинтеза конечного

продукта.

** - Репрессия конечным продуктом - накопление конечного продукта в среде блокирует синтез новых молекул фермента, необходимых для функционирования пути биосинтеза.

Для получения штаммов, способных к сверхсинтезу аминокислот используют различные мутации:

- Получение аналогорезистентных мутантов. Токсические аналоги аминокислоты, способны взаимодействовать с ферментами биосинтетического пути и ингибировать синтез конечного продукта (целевой аминокислоты), однако они не могут заменить данную аминокислоту функционально. Поэтому на минимальной среде, содержащей аналог аминокислоты, выживают и растут лишь те мутанты, у которых нарушена негативная регуляция ее биосинтеза, что приводит к его сверхсинтезу.
- Получение регуляторных мутантов - мутантов с нарушением регуляции синтеза ферментов; их функцией является синтез конститутивных ферментов.
- Получение ауксотрофных мутаций. Нарушая путь синтеза какого-либо метаболита, ауксотрофная мутация может повысить выход целевого продукта за счёт перераспределения потока общих предшественников в разветвлённых путях биосинтеза.

Ниже приведен перечень возможных мутаций, которые блокируют или дерегулируют различные участки этого биосинтетического пути.

- 1) мутанты, ауксотрофные по гомосерину с отсутствием активности гомосериндегидрогеназы (ГД);
- 2) мутации, вызывающие снятие ретроингибирования гомосериндегидрогеназы (ГД);
- 3) мутанты, резистентные к аналогам треонина;
- 4) ауксотрофные мутанты, не синтезирующие лизин;
- 5) аналогорезистентные мутанты, у которых аспараткиназа (АК) не чувствительна к ретроингибированию;
- 6) ауксотрофные мутации, блокирующие треониндегидрогеназу (ТД);
- 7) мутанты резистентные к аналогам треонина и изолейцина;
- 8) мутанты с низкой активностью гомосериндегидрогеназы (ГД);
- 9) мутации, вызывающие снятие репрессии ГД.

Укажите номера мутаций, которые позволят получить продуцентов следующих аминокислот:

Лизина - _____

Треонина - _____

Изолейцина - _____

Эталоны ответов:

Задача 1.

Синтез аскорбиновой кислоты по А. Грюсснеру и М. Рейхшейну с 1934 г. представляет собой многостадийный и преимущественно химический процесс, в котором имеется лишь одна стадия биотрансформации D-сорбита в L-сорбозу с участием уксуснокислых бактерий как классический пример микробиологического производства. Для получения сорбозы культуру продуцента *Gluconobacter oxydans* выращивают в ферментерах периодического действия, оснащенных мешалками и барботерами для усиления аэрации в течение 20-40 ч. Выход сорбозы достигает 98% от исходного сорбита. Питательные среды содержат кукурузный или дрожжевой экстракт (20% от общего количества). По окончании производственного цикла сорбозу выделяют из культуральной жидкости.

Совершенствование этой стадии в части повышения выхода целевого продукта при переходе от периодического культивирования продуцента *Gluconobacter oxydans* к непрерывному в аппарате колонного типа позволило увеличить скорость образования сорбозы в 1,7 раза.

Также можно привести пример получения 2-кето-бета-гулоновой кислоты (промежуточный продукт синтеза витамина С), которая легко превращается в аскорбиновую кислоту. Это метод двух-стадийного микробиологического синтеза, включающий окисление D-глюкозы в 2, 5-дикето-О-глюконовую кислоту с дальнейшей биотрансформацией в 2-кето-бета-гулоновую кислоту. Наиболее продуктивными микроорганизмами, осуществляющими эту реакцию, являются представители родов *Acetobacter*, *Erwinia*, *Gluconobacter*, в частности мутантный штамм *Erwinia punctata*, который обеспечивает выход до 94,5% 2, 5-дикето-О-глюконовой кислоты от общего количества исходной глюкозы.

Задача 2.

Современными методами тонкого органического синтеза можно синтезировать D и L-формы аминокислот в любых количествах, но все существующие способы их производства приводят к образованию рацематов. Таким путем можно получать рацематы лизина, глутаминовой кислоты, триптофана и других аминокислот. Вместе с тем химический синтез невозможен без достаточно большого количества агрессивных и токсичных веществ, что требует проведения дополнительных организационных мероприятий и финансовых затрат для их утилизации. Кроме того, подобные соединения небезопасны для персонала. Получение 100% биологически активной L-формы аминокислот методом органического синтеза - процесс очень сложный и экономически оправдан лишь в редких случаях.

Альтернативой химическому синтезу служит микробиологический процесс, при котором специально подобранные селекционные или сконструированные методами генной инженерии штаммы-продуценты способны осуществлять сверхсинтез аминокислот, например L-лизина, L-глутаминовой кислоты, L-триптофана, L-треонина в значительных количествах, что является определяющим фактором при выборе технологии производства аминокислот в промышленном масштабе. Однако при биосинтетическом получении в фармацевтической промышленности товарных форм L-аминокислот для кормового, пищевого или медицинского применения необходимо также использование тонкого органического синтеза на стадиях выделения, концентрирования и очистки субстанций аминокислот.

Микробиологическое промышленное производство L-аминокислот можно

осуществлять по двум технологическим схемам.

Двухступенчатый способ предполагает образование и подготовку предшественника, а также биосинтез ферментного препарата микробного происхождения, который будет трансформировать предшественник в целевую аминокислоту. Это первая ступень. Вторая ступень - собственно процесс трансформации полученного на 1 стадии предшественника в аминокислоту с помощью ферментных систем микроорганизмов. Таким путем получают, в частности, L-лизин.

Одноступенчатый способ синтеза аминокислот с помощью микроорганизмов основан на культивировании строго определенного штамма-продуцента целевой аминокислоты на среде определенного состава при соответствующих параметрах ферментационного процесса.

Промышленный штамм должен обладать способностью к сверхсинтезу нужной аминокислоты. Для этой цели выбирают полиауксотрофные мутанты, т.е. те клетки микроорганизмов, которые, с одной стороны, утратили способность самостоятельно синтезировать необходимые для роста и развития клетки различные аминокислоты, а с другой - приобрели способность к сверхсинтезу целевой аминокислоты.

Микроорганизмы осуществляют контроль биосинтеза каждой аминокислоты по принципу обратной связи как на уровне генов, ответственных за синтез соответствующих ферментов (репрессия), так и на уровне самих ферментов, способных при избытке аминокислоты изменять свою активность (ретроингибирование), что совершенно исключает перепроизводство аминокислоты клеткой в природных условиях. Из этого следует, что целью биотехнолога является нарушение этих систем регуляции с дальнейшим отбором ауксотрофных мутантов на селективных средах с использованием мутагенов (УФ, рентгеновские лучи, нитрозосоединения и др.). Такие мутанты имеют в геноме дефектный ген, детерминирующий фермент, без которого не может осуществляться биосинтез определенной аминокислоты. Важно, что получение ауксотрофных мутантов-продуцентов аминокислоты возможно только для микроорганизмов с разветвленной цепью биосинтеза, т.е. по крайней мере две аминокислоты должны синтезироваться из одного предшественника. У таких ауксотрофных мутантов избыток одной аминокислоты при дефиците другой не приводит к подавлению активности первого фермента. Однако аминокислота, биосинтез которой нарушен, должна быть добавлена в ограниченном количестве (при синтезе лизина добавляется гомосерин или треонин на 1-й стадии). Продуцент лизина - *Corynebacterium glutamicum* (коринебактерии) - имеет единственную р-аспартакиназу (фермент), активность которой регулируется путем согласованного ингибирования по принципу обратной связи. Этот мутантный штамм-продуцент является ауксотрофом по гомосерину и треонину. Для длительной работы ауксотрофных штаммов-продуцентов лизина в питательную среду вносят белковые гидролизаты в режиме дробной подачи (комплекс аминокислот).

Для получения L-треонина используют промышленный мутантный штамм К соИ (энтеробактерии), где система регуляции биосинтеза аминокислоты основана на принципе дифференциальной регуляции изоферментами. Этот штамм - тройной ауксотроф. У него изменен 1 фермент цепи биосинтеза (нечувствительный к треонину), отсутствуют механизмы репрессии («хроническое голодание» по изолейцину), при помощи методов генной инженерии треониновые гены размножены на плазмидах, что значительно увеличило продуктивность штамма.

При получении аминокислоты методами прямого микробиологического синтеза применяют полупериодическую ферментацию (регулируемую) с хорошей аэрацией (барботер) и перемешиванием (мешалка).

Задача 3.

В настоящее время промышленное производство витамина В₁₂ осуществляют исключительно биотехнологическими методами. Продуцентом витамина В₁₂ являются пропионовые бактерии из рода *Propionibacterium*. Добавление в среду предшественника витамина В₁₂ - 5, 6-диметилбензимидазола - резко повышает продуктивность продуцента. Повышению продуктивности также способствует и добавка в питательные среды кукурузного и мясного экстракта, соевой муки, рыбной муки. Выращивание пропионовых бактерий производят периодическим методом в анаэробных условиях на среде с кукурузным экстрактом, глюкозой, солями кобальта и сульфатом аммония. Образующиеся в процессе жизнедеятельности бактерий кислоты нейтрализуются щелочью. Через 72 ч после начала ферментации вносят предшественник - 5,6-диметилбензи-мидазол.

Длительность ферментации составляет около 3 сут. Если не добавить 5,6-диметилбензимидазола, то вместо витамина В₁₂ синтезируется фактор В (кобинамид), и не обладающий терапевтическим действием псевдовитамин В₁₂, у которого азотистым основанием служит аденин.

Поскольку витамин В₁₂ сохраняется в клетках бактерий, биомассу отделяют сепарированием и извлекают из нее целевой продукт с помощью экстракции подкисленной водой (рН от 4,5 до 5,0) при температуре 85-90 °С в течение часа. Витамин В₁₂ является водорастворимым витамином. Именно поэтому водный раствор стабилизируют NaNO₂, получая коферментную форму витамина, которую очищают на ионообменной смоле. Затем следует кристаллизация витамина из водно-ацетонового раствора, химическая очистка и изготовление лекарственных форм из полученного продукта.

Задача 4.

В отличие от химической трансформации биокатализ обладает уникальной специфичностью и избирательностью действия ферментов, возможностью проведения процесса в «мягких» условиях, высокой скоростью, использованием малых количеств катализаторов, практически полным отсутствием побочных реакций, что является несомненным преимуществом при создании лекарственных препаратов (антибиотики, стероиды, простагландины и т.д.). Гидролитические ферменты (гидролазы) нашли наибольшее применение в практике по следующим причинам:

- гидролитические реакции в водной среде, как правило, полностью термодинамически сдвинуты в сторону образования продуктов;
- кинетика реакций ферментативного гидролиза легко поддается количественному описанию до глубоких степеней превращения;
- гидролазы - наиболее изученные и наиболее легко управляемые ферменты;
- существует возможность оптимизации процессов по двум параметрам - концентрации расщепляемого субстрата и активности фермента;
- гидролазы избирательны по типу катализируемой реакции, проявляют широкую субстратную специфичность;
- гидролазы доступны в необходимых количествах (микроорганизмы содержат

значительные количества различных гидролаз).

Возможности гидролаз можно представить при модификации пенициллинов и цефалоспоринов. Получение новых, более эффективных аналогов пенициллинов и цефалоспоринов связано с изменением боковой цепи при сохранении ядра антибиотика - 6-АПК или 7-АЦК как ключевых соединений для синтеза новых пенициллинов и цефалоспоринов. Например, после отщепления боковой цепи биосинтетического пенициллина и последующего ацилирования ее аминогруппы можно сравнительно легко получать его «полусинтетические» аналоги. Отщепление боковой цепи и превращение в 6-АПК с помощью фермента пенициллинамидазы можно провести в одну стадию при обычных условиях и температуре 10-40 °С в водной среде, избегая многостадийности, энергоемкости и больших объемов органических растворителей при химической трансформации, расщепив при этом более устойчивую амидную связь и сохранив более лабильную связь в бета-лактамом кольце пенициллина.

Таким образом, переход к биокаталитической технологии существенно упрощает процесс, увеличивает выход целевого продукта и объем производства, стабилизирует процесс, делает его экологичным и снижает себестоимость. При получении новых полусинтетических цефалоспоринов также используют пенициллинамидазу, которая сохраняет целостность лабильного бета-лактамого кольца.

Задача 5.

Сравнительно недавно (несколько десятков лет назад) четко определились пути преодоления вышеуказанных трудностей. Эти пути связаны с получением иммобилизованных ферментов из клеток микроорганизмов. Сама иммобилизация представляет собой физическое разделение биообъекта (клетка, фермент) и растворителя, т.е. биообъект закреплен на нерастворимом носителе, а субстрат и продукты метаболизма свободно обмениваются между биообъектом и растворителем. Биообъект в этом случае работает многократно (недели, месяцы). Иными словами, иммобилизация ферментов - это перевод их в нерастворимое состояние с частичным или полным сохранением каталитической активности.

При совершенствовании биотехнологического процесса обычно используют следующие методы иммобилизации ферментов:

- ковалентное присоединение молекул ферментов к водонерастворимому носителю (природные полимеры - целлюлоза, хитин, агароза; синтетические - поливинилхлорид, полиакриламид и др.);
- захват фермента в сетку геля или полимера;
- ковалентная сшивка молекул фермента друг с другом или с инертными белками;
- адсорбция фермента на водонерастворимом носителе (часто на ионитах);
- микрокапсулирование.

В результате иммобилизации ферменты получают преимущества гетерогенных катализаторов: их можно удалять из реакционной смеси и отделять от субстрата и продуктов ферментативной реакции простой фильтрацией. Кроме того, появляется возможность перевода многих периодических ферментативных процессов на непрерывный режим с использованием проточных аппаратов или колонн с иммобилизованными ферментами.

Что касается широко используемой иммобилизации целых клеток, то ее проводят аналогично, предотвращая размножение клеток, увеличивая их сохранность и срок работы

в качестве катализатора. Примеры носителей органической природы: желатин, фибрин, альгинат натрия, целлюлоза, ПААГ. Неорганические: термический песок, активированный уголь, окись алюминия, бентонит. Носитель не должен быть токсичным для биообъекта. Ограничения использования иммобилизации возможны в 2 случаях: если целевой продукт не выходит в среду и если у фермента есть прочно с ним связанный кофермент, без которого этот фермент не работает.

Каждый из методов иммобилизации имеет свои ограничения, связанные с недостаточной прочностью получаемых связей. Особенно это касается микрокапсулирования (инкапсулирования). Ячейки геля не должны быть слишком маленькими (иначе возникнут трудности контакта фермента субстрата и недостаточная аэрация). Однако и слишком большого размера ячейки геля быть не должны. В этом случае связь с гелем образуется слабая, и биообъект может вымываться.

Функции биообъекта связаны с технологической операцией определенным образом. Так, например, очищенный фермент, фермент в клетке с коферментом, фермент в пермеабелизированной клетке выполняют только отдельную реакцию: одноступенчатую трансформацию. Интактная клетка (клетка-продуцент) осуществляет полный биосинтез целевого продукта посредством цепочки реакций.

Система, открытая для усложнения, - это клетка-продуцент какого-либо предшественника целевого продукта + первый фермент + второй фермент + третий фермент и т.д., т.е. биосинтез предпродукта и его биотрансформация осуществляются в одном биореакторе. Таким путем можно, в частности, одновременно получать 6-АПК, ампициллин и т.д.

Задача 6.

С помощью биотехнологии производство витаминов стало не только высококорентабельным (не требует дорогостоящего оборудования), но и экологичным (без агрессивных сред) и безвредным

для работающего персонала. Известно, что высокой биологической активностью часто обладают не сами витамины, а их производные - коферменты. Например, для рибофлавина характерно функционирование в двух коэнзимных формах: флавиномононуклеотида и флавинадениндинуклеотида. Активным продуцентом рибофлавина является культура дрожжеподобного гриба *Emmenthodium ashbyii* и *Ashbya gossypii*. Сверхсинтеза рибофлавина достигают при использовании мутагенов для нарушения механизма ретроингибирования у продуцентов. Одновременно для активного биосинтеза целевого продукта в питательную среду вносят соевую муку или кукурузный экстракт, сахарозу, карбонат кальция, хлорид натрия, витамины. Кроме того, методами генной инженерии получен рекомбинантный штамм-продуцент (*Bacillus subtilis*) с повышенной устойчивостью к экзогенной контаминации.

Продуцентом витамина B_{12}^* являются пропионовые бактерии, продуктивность которых резко повышается при добавлении в среду предшественника витамина B_{12}^* - 5, 6-диметилбензинимидазола - и использовании мутантных штаммов. Если 5,6-диметилбензинимидазол не добавлять, то вместо витамина B_{12}^* синтезируется фактор В (кобинамид) и псевдовитамин B_{12} , которые не обладают терапевтическим эффектом.

Продуцентом кофермента НАД являются пекарские дрожжи. Выход НАД значительно увеличивается при добавлении в среду предшественников (аденина и никотинамида). Кроме того, можно повысить проницаемость мембран, обрабатывая

клетки микроорганизмов ПАВ (поверхностно-активными веществами), например цетилсульфатом натрия и др.

При производстве аскорбиновой кислоты используют биотрансформацию D-сорбита в L-сорбозу уксуснокислыми бактериями.

В качестве промышленного источника эргостерина*7 применяют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Получение (бета-каротина* возможно микробиологическими методами, однако при этом нужно использовать дорогие среды сложного состава, поэтому более рентабельным является химический синтез. Преимущества использования биотехнологических методов при производстве витаминов:

- возможность селекции высокоактивных штаммов с применением генной инженерии;
- высокий уровень ферментации;
- применение иммобилизации клеток;
- утилизация отходов, снижение себестоимости и экологичность.

Задача 7.

При получении аминокислот применяют различные методы.

- Биологический метод (гидролиз белоксодержащих субстратов) наиболее дешевый. Однако существуют ограничения по стандартизации и по источникам сырья. Также из-за проблемы чистоты препаратов необходима многоступенчатая химическая очистка с частичным разрушением целевых продуктов (триптофан, треонин, серин, цистеин и др.).

- Химический синтез: образуется смесь D и L-изомеров, тогда как биологически активными являются только L-изомеры аминокислот. Такое производство дорого, небезопасно и неэкологично.

- Тем не менее производство аминокислот (глицина) и метионина данным методом рентабельно (в первом случае из-за отсутствия изомеров, во втором - вследствие равной терапевтической активности изомеров).

- Химико-энзиматический метод проводят в 2 этапа. Сначала химически синтезируют предшественник аминокислоты, например карбоновую кислоту, а затем осуществляют биотрансформацию предшественника ферментами живых клеток. Таким путем можно получать, например, аспарагиновую кислоту на основе фумаровой или фенилаланин на основе коричной кислоты. Однако способ дорогой и сложный.

- Микробиологический метод. Обязательным условием возможности его использования является наличие штаммов-суперпродуцентов аминокислот. В качестве модельных микроорганизмов применяют некоторые штаммы *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*.

Критерии отбора биообъектов для создания промышленных штаммов. Прежде всего получение аутокотрофных мутантов, что предполагает использование только тех микроорганизмов, которые имеют разветвленный путь биосинтеза по крайней мере двух аминокислот, образующихся из одного предшественника.

Их биосинтез контролируется на уровне первого фермента общего участка согласованным ингибированием конечными продуктами (ретроингибирование). Кроме того, в селекции продуцентов аминокислот активно применяют методы генной инженерии. Например, при вставке генов треонина в плазмиды для их клонирования значительно повышается количество ферментов, ответственных за биосинтез соответствующей

аминокислоты. Особенностью питательных сред является добавление в ограниченном количестве той аминокислоты, биосинтез которой блокирован в результате мутагенного воздействия.

Таким методом получают, в частности, глутаминовую кислоту, лизин, треонин.

Задача 8.

Лизина - 1, 5, 8

Треонина - 2, 3, 4, 6, 9

Изолейцина - 4, 7

Занятие 3. Тема «Антибиотики как биотехнологические продукты. Продуценты антибиотиков. Методы скрининга продуцентов. Получение антибиотиков на основе плесневых грибов, актиномицетов, бактерий».

Задача 1.

В настоящее время существует международная программа системы поиска и отбора антимикробных агентов, подавляющих размножение патогена только в инфицированном организме, т.е. система, позволяющая клонировать гены, которые не экспрессируются в искусственных условиях (in vitro). Данная система подразумевает использование определенных методов, реактивов (наборы для клонирования, рестриктазы), тест-объектов и решает такие задачи, как:

- выделение и очистка ДНК (электрофорез);
- культивирование патогенов, например *Salmonella typhimurium*;
- создание вектора на основе плазмиды, несущей беспромоторные гены хлорамфеникол-ацетилцетиленотрансферазы и лактозного оперона;
- заражение лабораторных животных (мыши);
- высеивание патогенов из животных объектов.

Расположите последовательно этапы данной системы скрининга антимикробных агентов, учитывая применение:

- генно-инженерных методов при получении набора различных плазмид;
- набора различных штаммов *E. coli* с разными частями генома сальмонеллы;
- индикаторной среды для отбора нужных колоний.

Прокомментируйте результаты и возможности применения данной системы при поиске антимикробных агентов, используемых в качестве ЛС.

Задача 2.

Одна из инфекционных клиник закупила партии пенициллина и стрептомицина. Через некоторое время в аптеку пришли представители клиники с жалобой на отсутствие терапевтического эффекта почти у всех больных клиники. После проверки в лаборатории было установлено, что препараты не фальсифицированы и соответствуют качеству стандартной продукции.

Проанализируйте данную ситуацию с точки зрения:

- возможных механизмов антибиотикорезистентности у

микроорганизмов и генетических аспектов явления «инфекционной резистентности» или «госпитальной инфекции»;

- возможных механизмов индукции бета-лактамаз (PBPs-2 и PBPs-3) и их ингибирования;
- разрешения данной ситуации.

Задача 3.

Развитие резистентности сегодня является настолько серьезной проблемой лекарственной терапии, что грозит вернуть человечество к «доантибиотической эре». Особенно опасна в этом смысле плазмидная резистентность. Известно, что плазида как внехромосомный Фактор наследственности способна самостоятельно ассимилироваться в клетке независимо от процесса ее деления. Плазида - носитель генов информации (всего около 30 генов). Плазмиды могут содержать гены резистентности к различным антибиотикам, которые легко передаются из клетки в клетку при конъюгации. Гены бета-лактамаз, особенно цефалоспоринаяз, могут локализоваться также и в бактериальной хромосоме. Резистентность может существовать и за счет генов клетки, делающих мембрану непроницаемой для антибиотиков. В свете обозначенной проблемы представьте:

- схему развития плазмидной резистентности и первоисточник генов резистентности;
- способы преодоления резистентности;
- различие хромосомной и плазмидной локализации структурных генов бета-лактамаз;
- роль конъюгативных транспозонов в проявлении резистентности и возникновении госпитальной инфекции.

Задача 4.

Как известно, под названием «антибиотики» объединены вещества, образуемые одними микроорганизмами для подавления роста других микроорганизмов. Однако антибиотики можно рассматривать или классифицировать и по технологии их получения, и по терапевтическому эффекту в отношении конкретных заболеваний. Кроме того, антибиотики в какой-то мере сопоставимы с антисептиками.

Проанализируйте варианты подхода к определению и классификации антибиотиков, подтвердите конкретными примерами, представьте так

- варианты скрининга антибиотиков;
- методы определения антимикробной активности антибиотиков;
- сравнение с антисептиками (использование, достигаемые цели, механизм действия).

Задача 5.

Актиномицеты являются продуцентами огромного количества антибиотиков. Ряд представителей родов *Streptomyces* и *Micromonospora* образуют антибиотики аминокликозидной структуры. Кроме природных аминокликозидов, в медицинской практике используют также синтетические аминокликозидные антибиотики.

Проанализируйте аминокликозидные антибиотики, исходя из:

- их сравнительной характеристики в соответствии со структурой, биологической

активностью и практическим применением;

- отличия актиномицетов от бактерий и грибов;
- механизма действия, выделяя при этом наиболее токсичные структуры.

Задача 6.

Весьма существенную роль для продвижения антибиотика в первую очередь играет возможность проведения сравнительной идентификации антибиотика на начальных этапах исследования в части их функциональной активности как антибактериальных ЛС. В условиях поставленной задачи предложите:

- методы и варианты проведения сравнительной идентификации, оценку антимикробной активности антибиотика;

- способы выделения антибиотика из культуральной жидкости;
- проведение количественной оценки.

Задача 7.

У патогенных микроорганизмов открыты гены, существенные для инфекционного процесса, но не существенные при росте в искусственных условиях на искусственных питательных средах (*in vitro*). Эти гены (*w*-гены или гены вирулентности) не поддаются идентификации и, таким образом, не могут быть использованы как таргеты (мишени) при поиске новых антибактериальных ЛС.

Докажите существенность гена-мишени при поиске новых ЛС, используя понятия:

- «house keeping gens» («гены домашнего хозяйства», «гены, на которых держится дом»);
- «m-gens»;
- «система IVET» как часть международных геномных исследований.

Эталоны ответов:

Задача 1.

У патогенных микроорганизмов открыты гены, имеющие значение для инфекционного процесса, но несущественные при росте *in vitro*. В последнем случае эти гены не поддаются идентификации для их дальнейшего использования в качестве мишеней при поиске новых ЛС. Так называемые молчащие *in vitro* гены патогенных микроорганизмов получили название «*w*-генов» (генов вирулентности). Однако в случае дефицита каких-либо из жизненно необходимых клетке веществ возможно преобразование данных генов из молчащих («несущественных») в «существенные». Подавление их функций антимикробными агентами приводит к подавлению роста (размножения) патогена именно в условиях *in vivo*, т.е. в инфицированном организме. Именно поэтому поиск и идентификация генов вирулентности являются конечной целью исследователей, создающих новые антимикробные лекарственные препараты.

В качестве примера такой работы можно привести метод IVET (*in vivo expression technology*).

Суть метода. Геном патогенной бактерии (*Salmonella typhimurium*) с помощью рестриктаз делят на сотни фрагментов, кратных 1, 2, 3 и т.д.

Каждый отдельный фрагмент генно-инженерными методами соединяют с лишенным

промотора геном хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (cat). Такой ген без промотора не может реплицироваться при его введении в клетку. Однако он смог бы реплицироваться, если соединенный с ним ген (фрагмент ДНК сальмонеллы) имел бы промотор для своей собственной репликации. Тогда этот промотор вызвал бы репликацию не только своего гена, но и репликацию следующего за ним гена (без промотора). Таким образом, репликация гена хлорамфеникол-ацетилтрансферазы может происходить благодаря использованию или «захвату» чужого промотора. Полученный фрагмент является сдвоенным (x-cat, где x - фрагмент генома сальмонеллы, а cat - ген хлорамфеникол-ацетилтрансферазы).

- К этому сдвоенному фрагменту присоединяют лактозный оперон, также лишенный промотора (lac Z). Данный оперон необходим для системы окисления лактозы. На этом этапе генные инженеры получают фрагмент, состоящий уже из 3 частей: x-cat-lac Z.

- Полученный фрагмент (x-cat-lac Z) включают в плазмиду. в результате всех манипуляций у генного инженера имеется набор плазмид, отличающихся только по фрагменту x.

- Эти плазмиды с разными частями генома сальмонеллы вводят в клетку E. coli.

- Далее следует внедрение клеток E. coli в организм лабораторного животного (мышь) с одновременным введением ему (ей) хлорамфеникола.

- Через сутки из ткани животного на твердую индикаторную среду с лактозой высевают бактериальную культуру, из которой вырастают колонии красного и белого цвета: колонии красного цвета (окисляющие лактозу и меняющие pH) составляют 90%, а белого (бесцветные) 10%.

- Затем колонии анализируют.

Ход рассуждений следующий: если колония на индикаторной среде с лактозой выросла бесцветной, значит, на искусственной питательной среде данный промотор не работал, и ген во фрагментах «x» не экспрессировался. Вероятно, он нужен только при развитии инфекционного процесса и принадлежит к генам ш (генам вирулентности). В случае колоний красного цвета экспрессируется ген, кодирующий образование фермента, расщепляющего лактозу, в результате цвет индикатора изменяется, вызывая окрашивание колоний в красный цвет.

Таким путем из клеток *Salmonella typhimurium* было выделено около 100 ш-генов, из которых 50 были абсолютно новыми (не описанными ранее). Они представляли интерес как потенциальные мишени для отбора антимикробных агентов.

Задача 2.

Причины появления изоферментов с бета-лактамазной активностью в том, что микробная клетка защищает себя от антибиотика за счет мутаций в гене, кодирующем последовательность аминокислот в ферменте-мишени, т.е. в «структурном» гене. Происходит расщепление бета-лактамного кольца, и антибиотик теряет свою активность. Особенно опасны плазмидные (внехромосомные) мутации. Плазмиды - генетические элементы микробной клетки, представляющие собой кольцевые молекулы ДНК размером в сотни раз меньшим, чем размер хромосомы. Опасность плазмидной резистентности в генетическом плане выражается в том, что плазмиды передаются из клетки в клетку путем конъюгации (аналог полового процесса), т.е. без деления клетки, однако плаزمида при

этом реплицируется. Таким образом, одна клетка может очень быстро передать резистентность огромному количеству клеток. Этому активно способствует и то, что некоторые типы плазмид существуют в клетке в виде нескольких единиц, а иногда и десятков копий (многокопийны). Возник даже термин «инфекционная резистентность» - «заражение резистентностью» одних клеток от других. Особенно часто плазмидная локализация генов резистентности встречается при ферментативной инактивации антибиотиков. Иногда в одной плазмиде оказываются локализованы несколько генов, кодирующих ферменты, воздействующие на антибиотики разных групп. Отсюда возникло понятие полирезистентности микроорганизмов. Такие полирезистентные штаммы возбудителей инфекции представляют серьезную проблему в инфекционной клинике, вызывая так называемую госпитальную инфекцию, когда к тем антибиотикам, которые используют в инфекционной клинике на тот момент, возникает устойчивая резистентность возбудителей различных инфекционных заболеваний, и соответственно антибиотик теряет свою активность.

На лечебных (терапевтических) свойствах бета-лактамов отражается степень сродства различных р-лактамов к разным транспептидазам, получившим название «пенициллинсвязывающие белки» (Penicillin bounding proteins), РВР-1, РВР-2, РВР-3 и т.д. В этом неодинаковом (различном) средстве заложен сам антибиотический эффект, его продолжительность, переносимость определенными категориями больных.

Так, если в рекомендациях по применению присутствует информация о том, что новый антибиотик связывается с РВР-2, то это означает, что клетка микроорганизма будет активно лизироваться, и освобождающиеся полисахариды в большом количестве начнут поступать в кровь, вызывая у больного кратковременный пирогенный эффект. Такие антибиотики рекомендуют больным с невысоким уровнем иммунитета (например, больным СПИДом). Если есть информация о связывании с РВР-3, то это означает, что в результате действия такого антибиотика бактериальная клетка только перестает делиться, оставаясь живой, и при отмене антибиотика начинает свое деление с большей активностью и опасностью возникновения новой инфекции. Такие антибиотики можно рекомендовать только больным с сильным иммунитетом. Разрешение данной ситуации заключается в том, что информационные материалы по механизму действия антибиотика обязательно должны принимать во внимание лечащие врачи и фармацевты.

Задача 3.

Формирование в бактериальной клетке защитных механизмов и обусловило возникновение «генов резистентности» как в хромосоме, так и в плазмиде. Плазмиды с генами резистентности к антибиотикам получили название R-плазмид (старый термин - R-факторы). Конъюгация и репликация плазмид в большом количестве клеток с учетом их многокопийности делают возможным развитие «инфекционной резистентности», т.е. «заражения резистентностью» одних клеток другими. Причина появления изоферментов с бета-лактамазной активностью состоит в том, что микробная клетка защищает себя от антибиотика за счет мутаций в гене, кодирующем последовательность аминокислот в ферменте-мишени, другими словами, в структурном гене этого фермента. Происходит расщепление бета-лактамного кольца, и антибиотик теряет свою активность.

Мутировавшие хромосомные гены также могут оказаться в плаزمиде и быть переданы в другие клетки, но в этом случае переноса резистентности не будет, так как свои

хромосомные гены, преобладая над чужими (плазмидными), обеспечивают антибиотикочувствительность и не дают развиваться антибиотикорезистентности. Большую роль в процессе антибиотикорезистентности играют транспозоны как генетические элементы ДНК, способные к самостоятельному перемещению не только в пределах одного репликона, но и вне его. При этом они могут нести на себе детерминанты устойчивости к антибиотику, например к канамицину, хлорамфениколу, тетрациклину, эритромицину. Экспрессия генов такого транспозона приводит к лекарственной устойчивости. Иногда в одной плазмиде локализуются несколько генов, кодирующих ферменты, воздействующие на антибиотики разных групп. На основании этого факта возникло понятие полирезистентности микроорганизмов.

Полирезистентные штаммы возбудителей инфекций представляют серьезную проблему в инфекционной клинике, вызывая так называемую госпитальную инфекцию, когда возникает устойчивая резистентность со стороны возбудителей различных инфекционных заболеваний к используемым антибиотикам, и антибиотики теряют свою активность.

Задача 4.

Скрининг (поиск и отбор) продуцентов антибиотиков может быть ненаправленным (первичным), когда отбирают наиболее активные микроорганизмы-продуценты по способности продуцировать антибиотики или другие БАВ. Направленный скрининг - поиск и отбор продуцентов антибиотиков определенного химического строения или с определенным механизмом антагонистического действия.

Схема скрининга:

- приготовление стерильных питательных сред;
- приготовление почвенной суспензии;
- посев на агаризованную среду;
- выделение микроорганизмов-продуцентов антибиотиков в виде чистых культур;
- хранение микроорганизмов-продуцентов и оценка их способности продуцировать антибиотики.

Образцы почвы с большим разведением высевают на твердые питательные среды в чашках Петри, чтобы

получить фактически из одной клетки штамм почвенных микроорганизмов (штамм - это культура, выросшая из одной клетки). Далее определяют физиологические параметры штамма, его антибиотическую активность, которую оценивают по зоне отсутствия роста на твердых питательных средах тех или иных бактерий вокруг посеянного штриховым способом изучаемого штамма, или по зоне отсутствия роста вокруг лунки в агаре, или же вокруг впаянного в агар металлического цилиндра (без дна), заполненного культуральной жидкостью исследуемого штамма. Существует два варианта определения антибиотической активности на основе метода диффузии в агар с последующим сравнением размеров зон угнетения роста тест-организмов, образующихся при испытании растворов стандартного образца и испытуемого препарата:

- трехдозный, когда для проведения анализа готовят по три концентрации растворов стандартного и испытуемого образцов;
- однодозный с использованием стандартной кривой в полулогарифмической сетке. В чашках Петри с тест-организмом вырезают лунки диаметром 8 мм или ставят цилиндрики,

в которые вносят пипетками опытные растворы и стандартные образцы в объеме 0,05 мл; чашки термостатируют 18 ч при 37 °С. Расчет активности производят в соответствии с ГФ (издание XI, вып. 2, 1990 г., с. 210).

- При сравнении антибиотиков с антисептиками прежде всего необходимо отметить избирательность действия первых на метаболизм (из нескольких тысяч реакций они подавляют одну или несколько). Кроме того, антибиотики высокоактивны и угнетают рост микроорганизмов в концентрации порядка 1 мкг/мл или меньше.

Задача 5.

- Особенность актиномицетов заключается в том, что они в эволюционном отношении ближе к бактериям (прокариотам), чем к грибам, хотя являются многоклеточными организмами и имеют сложный цикл развития (5-6 сут). Однако их геном не заключен в ядро и представляет собой кольцевую хромосому, не отделенную от цитоплазмы ядерной мембраной; не содержат они и митохондрий. Клеточная стенка актиномицетов состоит из гетерополимера - пептидогликана.

- В молекуле аминогликозидов обязательно присутствуют остаток шестичленного аминоклиптола и остатки Сахаров или аминсахаров. Ряд видов, относящихся к родам *Streptomyces* и *Micromonospora*,

- образуют природные антибиотики: стрептомицин, гентамицин, неомицин, канамицин и др. с широким спектром антибактериального действия. Кроме природных, в клинической практике используют также и полисинтетические аминогликозидные антибиотики. Например, антибиотики тетрациклиновой структуры: хлор-, окси- и тетрациклин со структурой из 4 циклов различаются только по «верхней» части, нижняя часть структуры молекулы у них одинакова. Химическая модификация верхней части тетрациклиновой структуры позволила получить полисинтетические тетрациклины - доксициклин и миноциклин (первый с пролонгированным действием, второй - с более высокой антибактериальной активностью).

- Молекула антибиотиков макролидной структуры содержит макроциклическое лактонное кольцо, соединенное с сахарами и/или аминсахарами. Природные - это эритромицин (*Streptomyces erythraeus*) и олеандомицин (*Streptomyces antibioticus*). Они эффективны только против грамположительных бактерий (антибиотики узкого спектра действия). Антибиотики сложной анзамидиновой структуры (*Streptomyces mediterranei*) с нафталиновым ядром и длинной алифатической цепью, соединенной с ароматической частью эфирной и амидной связью, представлены полисинтетическим антибиотиком рифампицином (применяют при лечении туберкулеза). Представители рода *Streptomyces* (*Streptomyces pourasei*) образуют полиеновые антибиотики (полиеновые макролиды). У них макроциклическое лактонное кольцо содержит ряд сопряженных двойных связей. К этим антибиотикам относятся нистатин (тетраен-диен) и амфотерицин В (гептаен). В их молекуле присутствуют также аминсахара. Это антигрибковые препараты, которые являются достаточно токсичными, и поэтому их используют в основном для наружного применения. Актиномицеты образуют и противоопухолевые антибиотики: блеомицин - гликопептид (*Streptomyces verticillius*). Антрациклины (дауномицин, адриаамицин) имеют структуру, сходную с тетрациклинами, но ни по спектру антибиотического действия, ни по применению в клинической практике они не похожи. Механизм действия аминогликозидов - ингибирование синтеза белка у бактерий посредством связи с малой рибосомной субъединицей. При этом нарушается правильность считывания кодонов иРНК

антикодонами тРНК.

Задача 6.

Существуют два варианта определения антимикробной активности по методу диффузии в агар с последующим сравнением размеров зон угнетения роста тест-организмов при испытании растворов стандартного образца и испытуемого препарата.

Трехдозный, когда для проведения анализа готовят по три концентрации растворов стандартного и испытуемого образцов.

Однодозный с использованием стандартной кривой в полулогарифмической сетке. В чашках Петри с тест-организмом вырезают лунки диаметром 8 мм, в которые вносят пипетками опытные растворы и стандартные образцы в объеме 0,05 мл. Чашки термостатируют при температуре 37 °С в течение 18 ч. Расчет антимикробной активности при использовании этих вариантов осуществляют в соответствии с Государственной фармакопеей.

Способы выделения антибиотика зависят от его локализации. Это может быть и культуральная жидкость, и мицелий или и то, и другое вместе.

Если антибиотик находится в мицелии, его стремятся перевести в водную фазу, меняя, к примеру, рН культуральной жидкости (например, в случае тетрациклинов).

Кроме того, можно объединить растворенный антибиотик в общем осадке, из которого его затем экстрагировать. Экстракцию применяют при очистке таких антибиотиков, как пенициллин, эритромицин. Один из примеров при экстракционном методе выделения и очистки извлечение пенициллина из бутилацетата, где он находится в виде свободной кислоты. При добавлении ацетата калия образуется калиевая соль пенициллина, кристаллы которого промывают бутанолом и высушивают.

Обработка культуральной жидкости включает различные способы коагуляции, флокуляции, так как она содержит не только антибиотик, но и мицелий продуцента, продукты его лизиса, ряд компонентов питательной среды: высоко- и низкомолекулярные органические вещества и неорганические соли.

Отделение нативного раствора от мицелия и коллоидных частиц осуществляют методами фильтрации и центрифугирования с использованием барабанных вакуум-фильтров, пресс-фильтров, сепараторов. В очистке антибиотиков широко применяют ионообменные смолы (катиониты и аниониты). Особое место занимают сорбционные методы при получении аминогликозидов в высокоочищенном виде (в частности, стрептомицина).

Помимо традиционных методов очистки антибиотиков существует также мембранная технология для разделения сложных смесей. Для количественной оценки используют практически все традиционные физико-химические методы анализа. Это титриметрические, оптические, хроматографические (особенно ВЭЖХ) методы. При обезвоживании препаратов антибиотиков используют либо лиофильную сушку (замороженного стерильного раствора, разлитого во флаконы в вакууме), либо распылительную сушку. Все серии лекарственных форм контролируют в соответствии с Государственной фармакопеей или соответствующими производственными регламентами с учетом требований международных фармакопеей.

ОТВЕТ на задачу 7:

Большинство генов, продукты которых необходимы клетке всегда, получили название «house keeping gens», что можно перевести, как «гены, на которых держится дом». Они экспрессируются в любых условиях, так как клетка без них не может существовать. Продукты экспрессии именно этих генов обнаруживают на: питательных средах *in vitro*, поэтому практически все антибиотики, применяемые в клинической практике, являются ингибиторами функций именно этих генов.

Продукты некоторых генов не идентифицируют на питательных средах, и поэтому их дальнейшее использование в качестве таргетов при поиске новых ЛС невозможно. Эти так называемые молчащие *in vitro* гены патогенных микроорганизмов получили название ш-генов или генов вирулентности. Соотношение между house keeping и ш-генами в геноме у разных патогенных бактерий варьирует, но в среднем более 90% генов относится к 1-й группе (house keeping).

i*vi*-Гены, как правило, играют определяющую роль в развитии инфекционного процесса. Именно поэтому значительный интерес представляют пути выявления и выделения этих генов. Примером такой работы служит предложенный американскими генетиками метод «IVET» (In Vivo Expression Technology). Краткая суть метода описана ниже.

- Геном патогенной бактерии (например, *Salmonella typhimurium*) с помощью рестриктаз делят на сотни фрагментов.

- Каждый отдельный фрагмент генно-инженерными методами соединяют с лишенным промотора геном хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (cat). Такой ген (без промотора) не может реплицироваться при его введении в клетку. Однако этот ген сможет реплицироваться, если соединенный с ним ген (фрагмент ДНК сальмонеллы) будет иметь промотор для своей репликации. Тогда этот промотор будет вызывать репликацию не только своего гена, но и следующего за ним гена (без промотора). Таким образом, репликация гена хлорамфеникол-ацетилтрансферазы может происходить за счет использования или «захвата» чужого промотора.

- К этому sdвоенному фрагменту (x-cat, где x - фрагмент генома сальмонеллы, а cat - ген хлорамфеникол-ацетилтрансферазы) присоединяется лактозный оперон (lac Z) также без промотора.

- Этот оперон нужен системе для окисления лактозы.

- Полученный фрагмент (x-cat-lac Z) включается в плазмиду. При этом получается набор плазмид, отличающихся только по фрагменту x.

- Полученные плазмиды вводят в клетку *E. coli*.

- Далее в организм лабораторного животного (мыши) вводят клеточную суспензию *E. coli* и хлорамфеникол.

- Через сутки из слизистой оболочки желудка мыши на твердую индикаторную среду с лактозой высевают бактериальную культуру.

- Затем колонии анализируют. 90% полученных колоний имеет красный цвет (при окислении лактозы меняется pH и соответственно цвет среды); 10% - бесцветные или белого цвета.

- Если на индикаторной среде с лактозой выросла бесцветная колония, значит, на искусственной питательной среде данный промотор не работал, и ген во фрагментах «*» не экспрессировался. Вероятно, он нужен только при развитии инфекционного процесса и принадлежит к генам /V/ (генам вирулентности). В случае наличия колоний красного цвета

экспрессируется ген, кодирующий образование фермента, расщепляющего лактозу, в результате изменяется цвет индикатора, и колонии окрашиваются в красный цвет.

- Используя данный метод, авторы выделили из клеток *E. coli* около 100 ш-генов, из которых 50 были новыми (не описанными ранее) и представляли интерес как потенциальные таргеты для отбора антимикробных агентов.

Занятие 4. Тема «Интерактивное занятие. Рекомбинантные белки. Технология генно-инженерного инсулина, интерферонов, интерлейкинов и гормона роста человека (схемы получения)».

Задача 1.

При получении генно-инженерного инсулина, основанного на раздельном биосинтезе 2 цепей, в качестве продуцента используют определенные микроорганизмы и модифицированный чужеродный ген (точнее, оперон) с лидерной последовательностью аминокислот (метионином и бета-галактозидазой), отделяемой на последней стадии контакта секретируемого белка и клетки. Ферментацию проводят на среде с лактозой (или галактозой) для последующего объединения свободных инсулиновых цепей. Далее осуществляют выделение и очистку полученного инсулина.

На основе общей схемы получения инсулина и требований к его качеству проанализируйте и обоснуйте:

- условия выбора конкретного продуцента инсулина и конструкцию вектора, с помощью которого можно ввести в клетку чужеродный ген (ген инсулина);
- необходимость использования лидерной последовательности аминокислот с метионином и бета-галактозидазой в синтезе инсулина и роль лактозы (галактозы) в процессе ферментации и получении завершенных инсулиновых цепей и их объединении;
- возможность проявления токсичности генно-инженерного инсулина; с чем это может быть связано, учитывая видоспецифичность данного инсулина, его серийное качество и уровень культуры производства на предприятии?

Прокомментируйте правила безопасности работы с микроорганизмами на генетическом и физическом уровнях.

Эталоны ответов:

Задача 1.

Выбор конкретного продуцента рекомбинантных белков, в частности инсулина, предусматривает его промышленное применение в качестве суперпродуцента. В этом отношении можно предложить использовать *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* и др. микроорганизмы, которые могут секретировать целевой продукт в культуральную жидкость. Преимуществом *Escherichia coli* по сравнению с этими микроорганизмами

считают то, что синтезируемые кишечной палочкой чужеродные белки депонируются внутри клеток в виде белковых тел (так называемых Dense bodies) и недоступны для действия протеаз, от которых нет защиты у других вышеуказанных продуцентов. Применение *Escherichia coli* в качестве промышленного штамма также целесообразно благодаря наиболее низкому уровню опасности для персонала и окружающей среды, что достигается обеспечением фильтрами всех линий, через которые происходят газовые выбросы из ферментеров, и термической стерилизацией всех стоков, содержащих биоматериал.

Схема получения рекомбинантного инсулина по «Eli Lilly» (США)

- Химический синтез генов, кодирующих образование цепей А и В в определенной последовательности нуклеотидов.

- Конструирование вектора.

- Введение каждого синтетического гена в плазмиду: в одну - ген, синтезирующий цепь А, в другую - ген, синтезирующий цепь В.

- Для интенсивной репликации плазмид в каждую из них вводят также ген, кодирующий образование фермента бета-галактозидазы.

- Введение полученных плазмид в клетку *Escherichia coli* с последующим получением двух культур продуцента, одна из которых синтезирует цепь А, а другая - цепь В.

- Культуры помещают в ферментер, в культуральную среду добавляют галактозу, которая индуцирует образование фермента бета-галактозидазы. При этом плазмиды активно реплицируются и в результате получается большое количество генов, синтезирующих цепи А и В.

- Клетки лизируют, выделяют цепи А и В, которые обрабатывают бромцианом для отщепления от них бета-галактозидазы.

- Затем следует очистка и выделение А и В-цепей.

- Далее окисляют остатки цистеина и соединяют цепи А и В.

Полученный генно-инженерный человеческий инсулин не вызывает аллергических реакций, так как он видоспецифичен, и если в нем находят какие-либо недопустимые примеси в виде эндотоксинов и пирогенов, то это относится только к нарушениям в технологии его изготовления и культуры производства.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ