Основные стадии биотехнологического процесса

1. приготовление и стерилизация питательных сред
2. приготовление посевного материала
3. культивирование
4. обработка культуральной жидкости
5. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БИОПРЕПАРАТА
6. получение готовой продукции

5. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БИОПРЕПАРАТА

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ БИОСИНТЕЗА

В процессе разрушения клеток необходимо сохранить конечный продукт - исключить денатурацию белка.

Методы разрушения клеток

Химические;

Физические;

Биохимические;

Разрушение клеток

Химические методы

- обработка щелочью
- Обработка органическими растворителями
- Обработка детергентами

Физические методы

- Температурный , осмотический шок
- Обработка УЗ
- Механическое истирание
- баллистическая дезинтеграция (для клеточных суспензий высокой вязкости)
- экструзия

Разрушение клеток

Биохимические методы - лизис с помощью ферментов

- **Gr+** бактерии разрушают с помощью мурамидазы – лизоцима яичного белка. Фермент разрушает пептидные связи между N-ацетилглюкозамином и остатками N-ацетилмурамовой кислоты – осн. элементы клет. оболочки.
- **Gr-** бактерии клеточная стенка тоньше, но покрыта фосфо-липопротеидным комплексом. Лизоцим не справляется со слоем липидов, поэтому его используют в сочетании с ЭДТА.
- **Дрожжи.** клет. стенки образованы частично фосфорили-рованными маннатами и β-глюканами
- **Плесневые (низшие) грибы.** Клет. стенки из α- и β-глюканов, гликопротеидов и хитина.
  - используют комплексы ферментов, разрушающих эти конструкции: фосфоманназу, β-глюканазу-1,3

Обработка среды после разрушения клеток

Сепарация продуктов разрушения клеточных стенок и лизата:

низкоскоростное центрифугирование
микрофильтрация

Выделение белкового продукта из лизата:

высаливание нейтральными солями высокой концентрации: Li_2SO_4, Na_2SO_4, $(NH_4)_2SO_4$

Выделение веществ (ВМС) небелковой природы из лизата:

седиментация под воздействием органических дегидратантов: этанола, ДМСО, глицерина и т.д. Возможно осаждение в результате замены растворителя (ацетоном, хлороформом или другими органическими растворителями).

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ БИОСИНТЕЗА

Основные стадии биотехнологического процесса

1. приготовление и стерилизация питательных сред
2. приготовление посевного материала
3. культивирование
4. обработка культуральной жидкости
5. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БИОПРЕПАРАТА
6. ПОЛУЧЕНИЕ ГОТОВОЙ ПРОДУКЦИИ

6. ПОЛУЧЕНИЕ ГОТОВОЙ ПРОДУКЦИИ

- Очистка биопрепарата от орг. примесей (хроматография, электрофорез, диализ и т.д.)
- Высушивание. Используют щадящие методы сушки: ***сублимационная*** сушка на установках типа «Иней» (РФ), «Юзефруа» (Фр.), «Heto – Helton» (Дания). Используют **криопротекторы** (среды высушивания).
- **Розлив (рассыпка) и укупорка** продукта - в асептических условиях или в помещениях класса А (В) по GMP.
- **Этикетирование, упаковка** по общепринятой схеме.

Частная биотехнология лекарственных средств

Биотехнология антибиотиков

АНТИБИОТИКИ – специфические продукты жизнедеятельности различных групп микроорганизмов, растений, животных, избирательно задерживающие рост и развитие иных организмов или злокачественных опухолей

Егоров Н.С Основы учения об антибиотиках. Высшая школа, 1986. – 448с.

Характер взаимоотношения организмов в природе

- **Симбиотический:** аэробы и анаэробы
- **Паразитизм:** риккетсии, вирусы и макроорганизм
- **Хищничество:** миксобактерии. Колонии миксобактерий синтезируют многочисленные экзоферменты (лизоцим, протеазы и целлюлазы) → совместное разрушение органических субстратов, в т.ч. н/р полимеров - эффект «волчьей стаи»
- **Антагонизм:** бактерии и микроскопические грибки, актиномицеты

Образование антибиотиков имеет адаптационное значение

Преимущества антибиотиков перед цитотоксическими ядами:

- Избирательность действия: конкретный антибиотик проявляет свое действие лишь в отношении определенных организмов, не оказывая влияния на другие формы живых существ.

  В медицине могут быть использованы лишь те антибиотики, для которых мишени в микроорганизмах отличаются от подобных систем макроорганизма

  - Высокая биологическая активность в отношении только чувствительных к ним организмов (низкие концентрации и эфф. дозы).
  - Антисептики и дезинфектанты неспецифичны: активны в отношении ***всех*** м/о

Избирательность влияния антибиотиков на микробные клетки по сравнению с клетками макроорганизма определяется наличием структурных и метаболических различий между ними.

В отличие от животных клеток клетки бактерий

- **снабжены стенкой,**
- **имеют единичную хромосому,**
- **лишены митохондрий, а большинство митохондриальных ферментов расположены на плазматической мембране.**
- **Различно строение рибосом.**

КЛАССИФИКАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ ПО ТИПУ ДЕЙСТВИЯ (медицинская)

- бактерицидные (b-лактамные, аминогликозиды, полимиксины и др.): вызывают гибель микроорганизмов. Используются при лечении тяжелых инфекционных заболеваний
- бактериостатические (макролиды, тетрациклины, левомицетин): прекращают или приостанавливают размножение микроорганизмов. В этом случае организм окончательно избавляется от возбудителя с помощью факторов иммунитета.

Бактерицидные антибиотики более выгодны, особенно в условиях неполноценного функционирования системы иммунитета.

- Антибиотики широкого и узкого спектра действия. Действуют на м/о в зависимости от строения клеточной оболочки бактерий

Точки приложения действия антибиотиков

- Клеточная мембрана микроорганизмов
  - У Gr+ бактерий (слой ацетилглюкозамина и ацетилмурамовой кислоты, соединенные пептидными мостиками) - более уязвима;
  - У Gr- бактерий клеточная стенка покрыта слоем липидов, поэтому менее проницаема для антибиотиков. Более защищены. Подвержены действию антибиотиков, способных проникать через этот слой (липофильных);
- Внутренние структуры клеток

Классификация по механизму действия:

1. Ингибиторы биосинтеза клеточной стенки: пенициллин, цефалоспорины, гликопептиды, карбапены, карбапенемы, ванкомицин, ристомицин, циклосерин и т.д.
2. Разрушители клеточных мембран: полиеновые антибиотики, полимиксины
3. Ингибиторы синтеза белка в рибосомах: макролиды, линкомицины аминогликозиды, тетрациклины, левомицетин
4. Ингибиторы РНК-полимеразы: рифампицин – нарушает метаболизм фолиевой кислоты
5. Ингибиторы синтеза ДНК на уровне ДНК-матрицы: нитрофураны, налидиксовая кислота, фторхинолоны, митомицины, и др.
6. Ингибиторы синтеза РНК на уровне ДНК-матрицы (стрептомицины), и т.д.

Производство антибиотиков

1 стадия. Создание штаммов микроорганизмов

Современные штаммы все чаще получают используя технологию рекомбинации ДНК

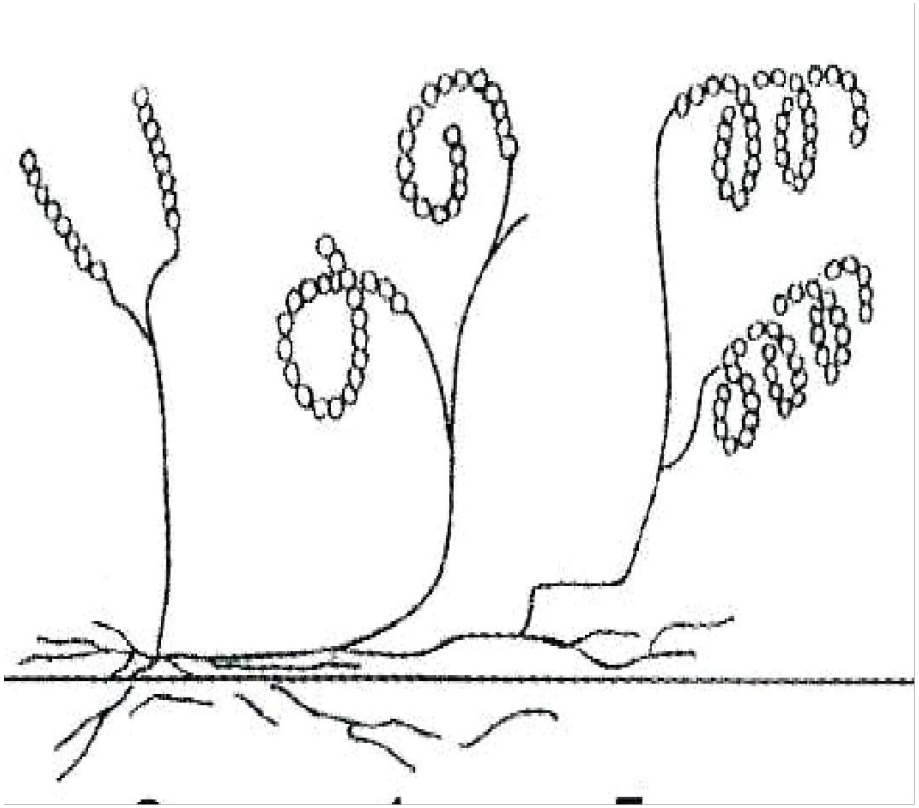
- Большая часть современных антибиотиков синтезируется рекомбинантными штаммами актиномицетов рода *Streptomyces* – прокариот сложного строения

Схема роста мицелия актиномицетов рода **Streptomyces**

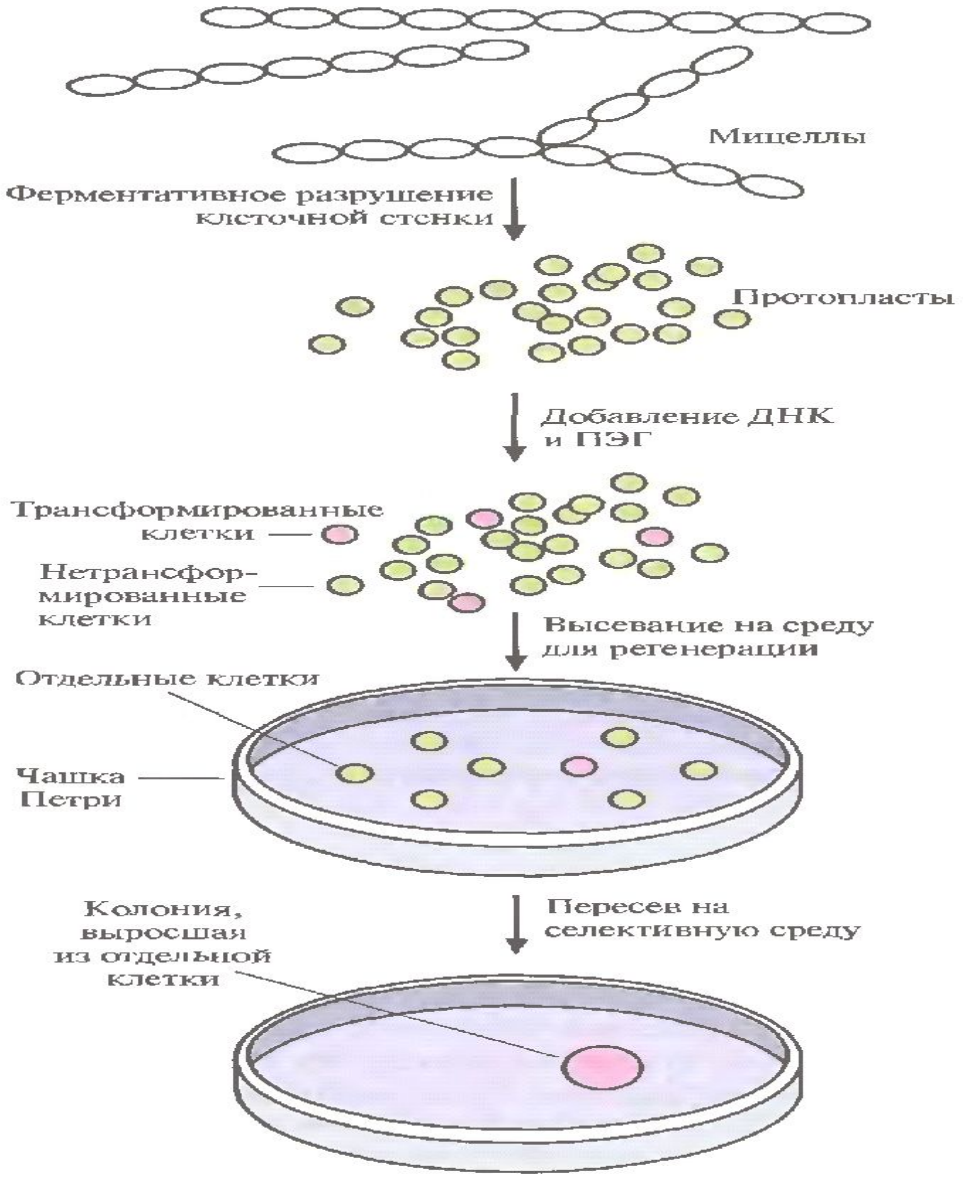
В отличие от E.Coli, Streptomyces существуют не в виде изолированных клеток, а в виде нитей – мицелл, образованных клетками.

Клеточные стенки ригидны и прочны, как у большинства прокариот.

Клетки отделяют др.от др. и переводят в протопласты путем разрушения клеточной стенки с помощью ферментов или химических веществ



Создание штаммов микроорганизмов-продуцентов



- Разрушение клеточной стенки и высвобождение протопластов
- Трансформация протопластов плазмидной ДНК в присутствии ПЭГ
- Посев протопластов на твердую ПС. Клеточные стенки восстанавливаются, клетки делятся и образуют колонии
- Посев ***каждой колонии*** **на *селективную* ПС** (обычно содержит Ant неомицин или Ant тиострептон – маркерный ген устойчивости к нему содержит вектор). На этих средах прорастают только трансформированные клетки
- Производят посев на ПС в ферментеры

2 стадия. Биосинтез антибиотика

Культуры актиномицетов вариабельны в связи с генетической нестабильностью (высокая приспособляемость к изменениям среды обитания). Для стабилизации штаммов – продуцентов в ПС вводят антимутагены – вещества регулирующие экспрессию генов и предотвращающие хромосомные перестройки:

- пуриновые нуклеотиды;
- пуриновые основания (кофеин, теобромин, теофиллин, пентоксифиллин)
- ионы марганца;
- метионин
- гистидин;

Для каждого штамма актиномицетов состав ПС подбирается индивидуально для исключения мутаций в генах, кодирующих биосинтез антибиотиков

Требуется интенсивная аэрация среды

Двухфазный характер биосинтеза антибиотиков

- **1 фаза – трофофаза.** Сбалансированный рост микроорганизмов и накопление биомассы продуцента. Быстрое потребление компонентов ПС, кислорода и биосинтез БАВ, необходимых для его собственного роста (белки, ферменты, нуклеиновые кислоты и др.). Снижение pH. Выработка ферментов, синтезирующих антибиотик отсутствует. ***Лаг-фаза, фазы ускорения и экспоненциальная***.

- **2 фаза – идиофаза**. Накопление биомассы **замедлено**. Культуральная среда обеднена питательными веществами. Преобладают протеолитические процессы. Повышение pH. Борьба за выживание: активируются и транскрибируются гены, кодирующие синтез веществ, подавляющих рост других микроорганизмов – антибиотиков. Антибиотики экскретируются за пределы клетки. ***Фазы замедления роста, стационарная, отмирания***

ФАЗЫ РОСТА КУЛЬТУРЫ:

1 – лаг-фаза.

2 – фаза ускорения.

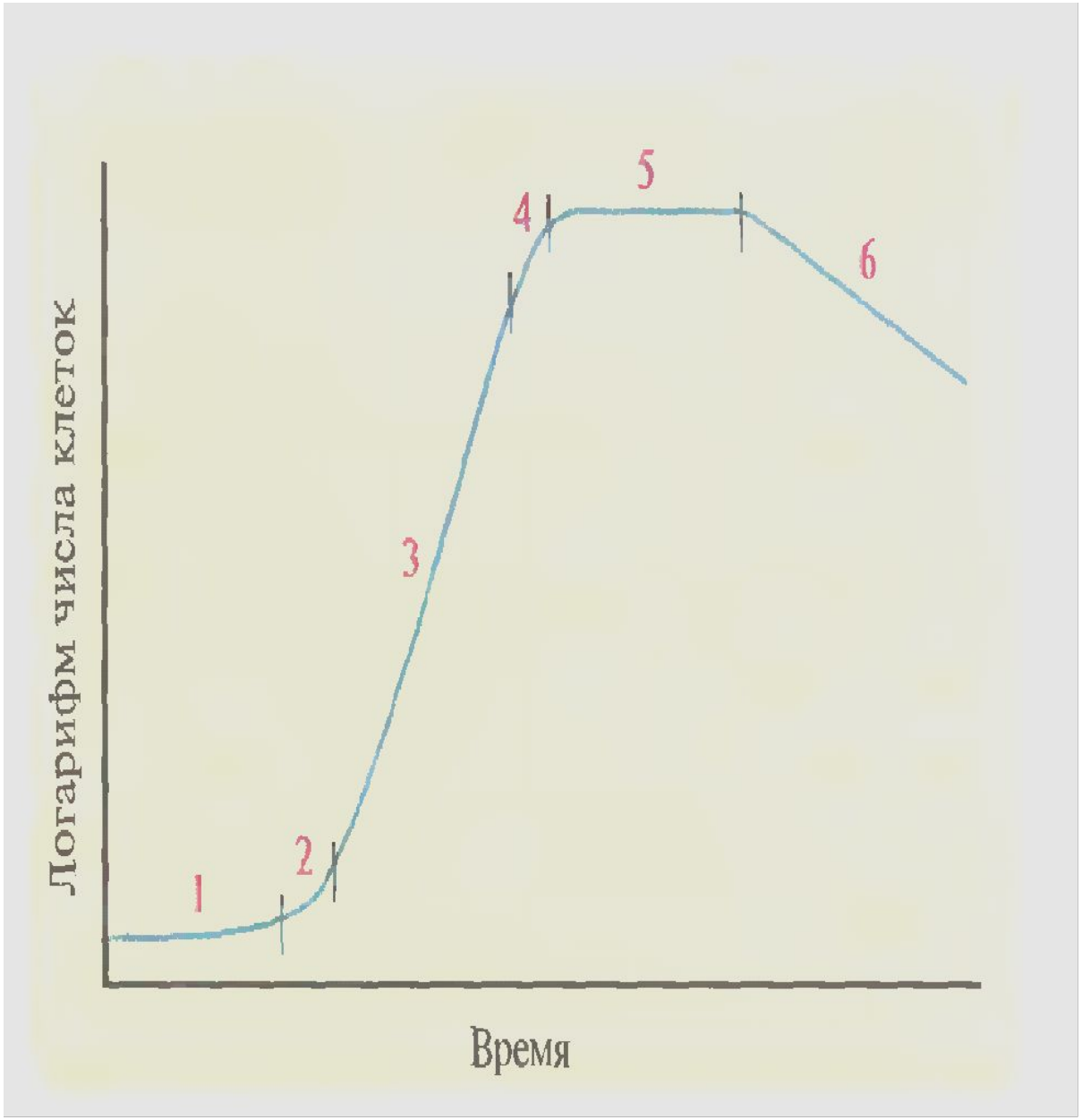
3 – экспоненциальная фаза.

4 – фаза замедления.

5 - стационарная фаза.

6 – фаза отмирания.

Биосинтез антибиотика достигает максимальной скорости в стационарную фазу, когда биомасса культуры максимальна



ИДИОФАЗА

Ферментативные процессы на этой стадии более интенсивны в присутствии антагонистических штаммов микроорганизмов (например иных бактерий). Наблюдается повышенный биосинтез антибиотика как результат проявления анатагонистических отношений.

РИСК: при совместном культивировании различных микроорганизмов могут возникнуть гибриды с иными свойствами → вырождение штамма-продуцента

3 стадия. Выделение антибиотика

Антибиотики в определенной концентрации губительны и для самого продуцента (Для *Streptomyces gryseus* - около 0,5%).

По достижении $C_{крит.}$ рост м-о прекращается.

Ферментацию прекращают.

Антибиотик выделяют из культуральной среды:

- экстракция органическими растворителями;
- осаждение;
- адсорбция

4 стадия. Очистка антибиотика

Степень очистки определяет стабильность антибиотика при хранении (антибиотики неустойчивы как в кислой, так и в щелочной среде, при избыточной влажности подвержены гидролизу и окислению)

Методы:

- Повторная замена растворителя;
- Адсорбционная хроматография;
- ВЭЖХ и т.д.

5 стадия. Стандартизация антибиотика

Оценивают:

- биологическую активность;
- антимикробный спектр;
- токсичность;
- пирогенность;
- действие на лейкоциты крови;
- стерильность лекарственных форм;
- и т.д.

Биологическая активность антибиотиков

- Измеряется в условных единицах – у.е.
  - У.Е. антибиотической активности – это минимальное количество антибиотика, способное подавить рост определенного количества клеток чувствительного тест-микроорганизма, в единице объема (массы) питательной среды.

Пример: **Для стрептомицина 650 у.е./мг способны подавить рост 1000 клеток микобактерий туберкулеза**

Изготовление лекарственных форм антибиотика

- Осуществляется в строго асептических условиях: в помещениях не ниже «В» класса чистоты;
- Лекарственные формы создают в соответствии с физико-химическими свойствами и устойчивостью антибиотика к воздействию различных фармацевтических факторов

Стрептомицин

Продуцент – актиномицеты
Streptomyces griseus
Выделен в 1943 г. амер. З.А.Ваксманом
Активен при туберкулезе, угнетает синтез белка

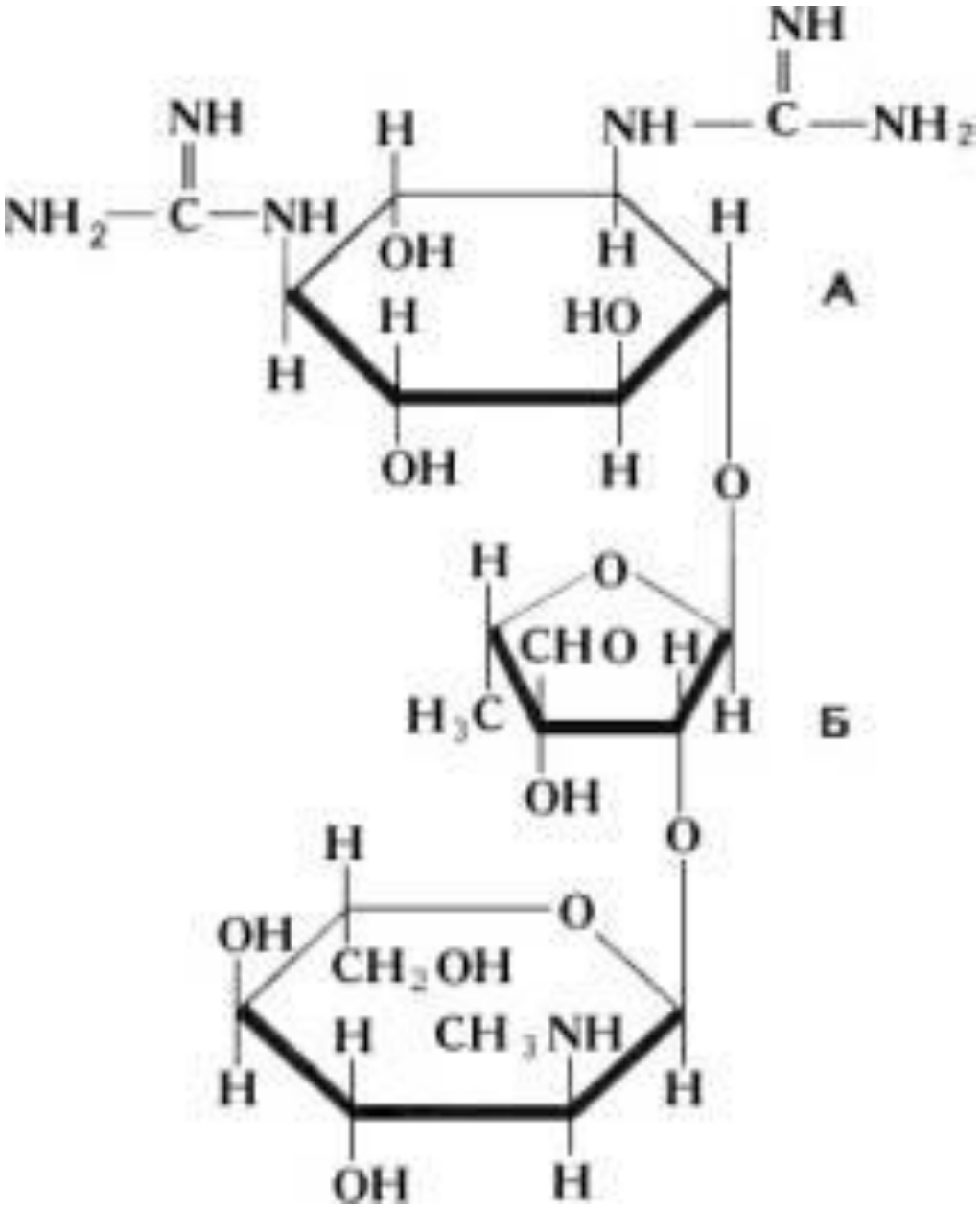
Стрептомицин повышает сродство рибосом м/о к антикодону аминоацил-тРНК, что ведет к связыванию ошибочных, не соответствующих кодону матрицы мРНК аминоацил-тРНК и обусловливает ошибки при считывании генетической информации. В результате в пептидную цепь включаются необычные аминокислоты и синтезируются неактивные молекулы белка.

Избирательность действия обеспечивается существенным различием рибосом у бактерий и млекопитающих. Частицы бактериальных рибосом отличаются большей активностью в образовании связей с антибиотиками, чем рибосомы млекопитающих.

Стрептомицин - Аминогликозидный антибиотик (ШСД)

А – агликон стрептидин (шестиатомный спирт инозит, имеющий в качестве заместителей две гуанидиновые группы)

Б - дисахарид стрептобиозамин (связанные между собой N-метил-глюкозамин и ***стрептоза***)

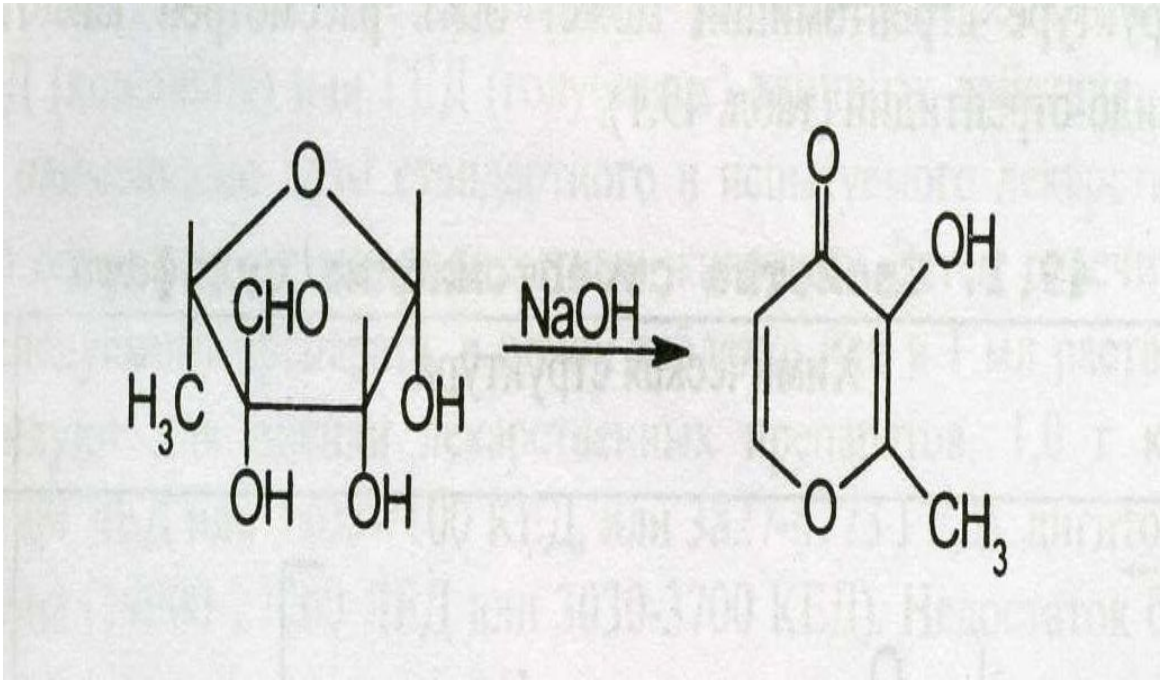


Мальтольная проба

L-стрептоза **в щелочной среде** подвергается дегидратации и изомеризации, превращаясь в **мальтол** (α-метил-β-окси-γ-пирон). При взаимодействии с ионами Fe^{3+} в кислой среде мальтол образует комплекс фиолетового цвета. Интенсивность окраски **пропорциональна концентрации** стрептомицина.

М.б. использована для количественного определения.

Мальтольная проба обусловлена наличием альдегидной группы в молекуле стрептомицина



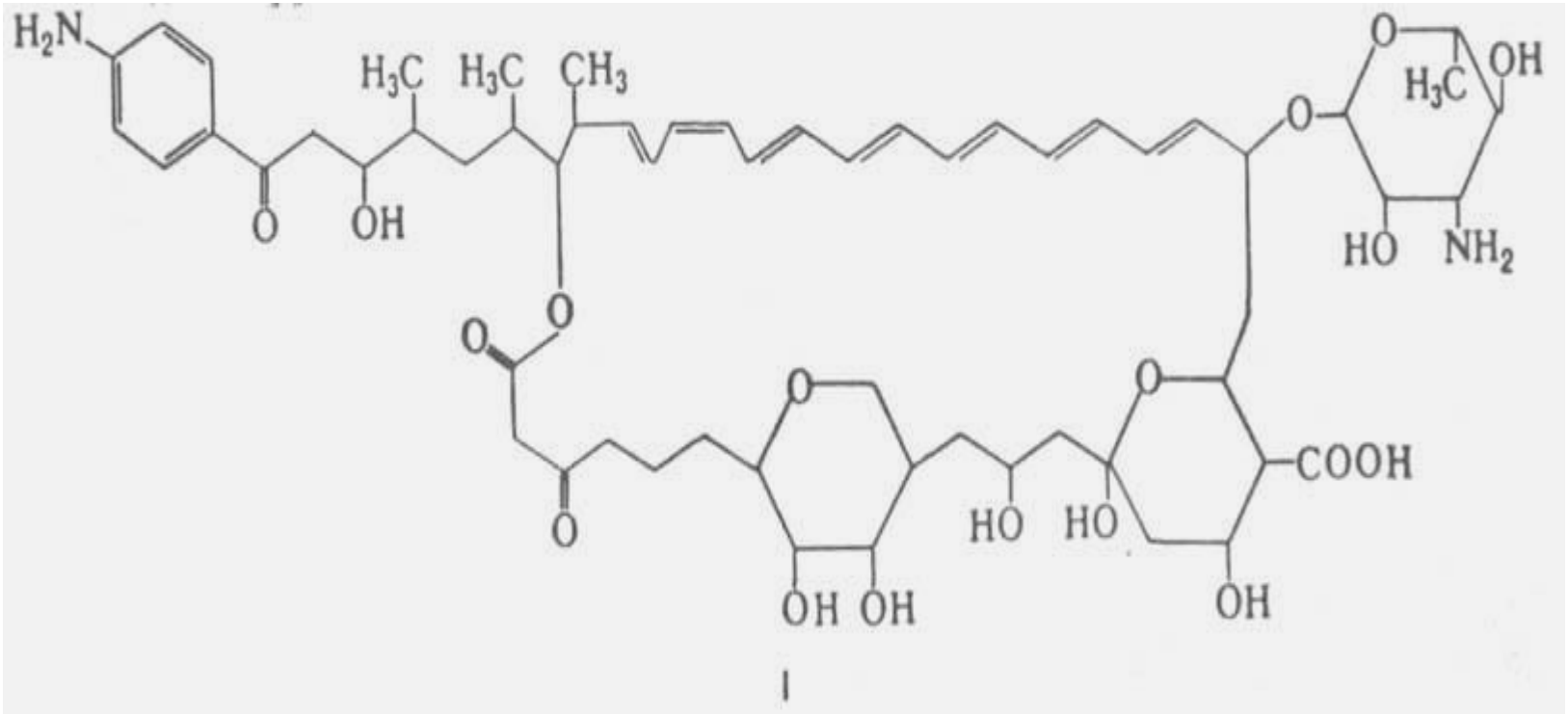
Особенности биосинтеза

- Культура генетически нестабильна. Перестройки ДНК происходят легко, т.к**. стрептомицин кодирует плазмидная ДНК**
- Для стабилизации штаммов при культивировании в ПС добавляют антимутагены
- ПС включает жирную соевую муку, белок ее не востребован
- Культивирование требует непрерывной и сильной аэрации
- Повышенное содержание в идиофазу хлоридов натрия, калия и цистеина тормозит биосинтез стрептомицина
- Стрептомицин выделяется в культуральную среду, среду отделяют от мицеллия центрифугированием
- Добавляют щавелевую кислоту для осаждения белков, ионов кальция, магния, железа
- Стрептомицин сильно полярен, х/р в воде (и основание и соли) и н/р в органических растворителях. Для очистки многократно осаждают из воды ораническими растворителями
- В чистом виде стрептомицин выделяют методом адсорбции при pH 2-4 на активированном угле и методом ионообменной хроматографии

ЛЕВОРИН

Противогрибковый антибиотик (фунгицидное). Оказывает действие на дерматофиты, дрожжи, дрожжеподобные и плесневые грибы.

Поражает цитоплазматические мембраны грибковых клеток, взаимодействует с эргостеролом, образуя в мембране поры, что приводит к утечке важных для жизнедеятельности гриба компонентов цитоплазмы – ионов К+ и ферментов. Активен в отношении практически всех грибков, патогенных для человека



Структура основного компонента леворина.

Продуцент - *Streptomyces levoris*

Леворин – суммарный полиеновый антибиотик. Смесь компонентов.

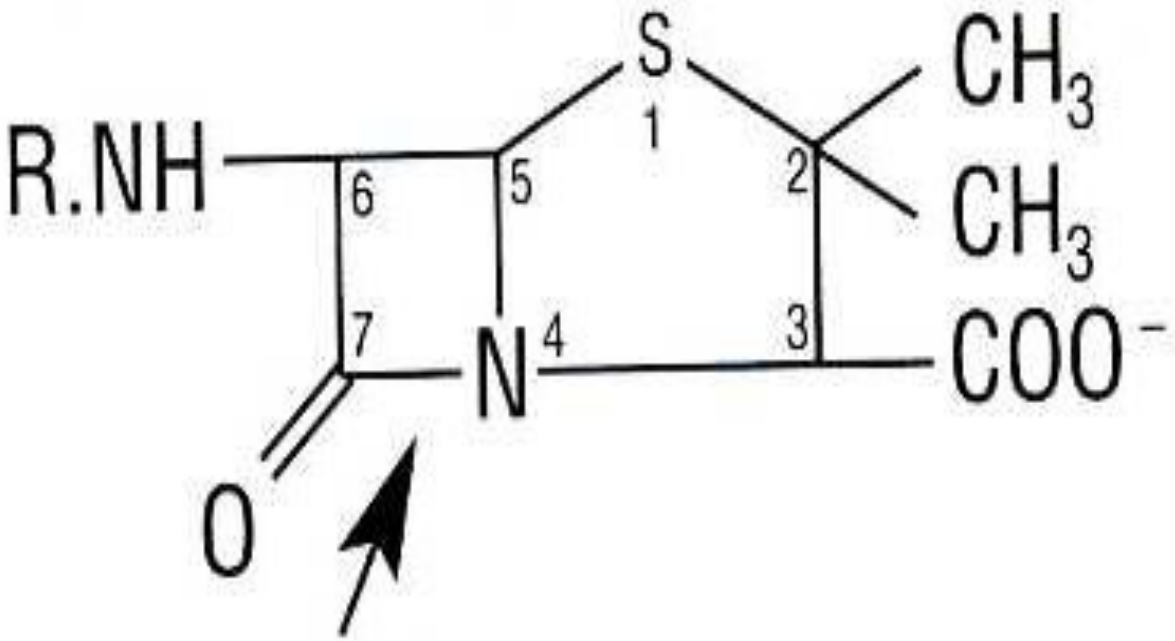
Не растворим в воде. Экстрагируют 65% водным ацетоном.

Особенности технологии β – лактамных антибиотиков

Выделены в чистом виде Флемингом, **Х.** Флори и Е.Чейном в **1940** г.

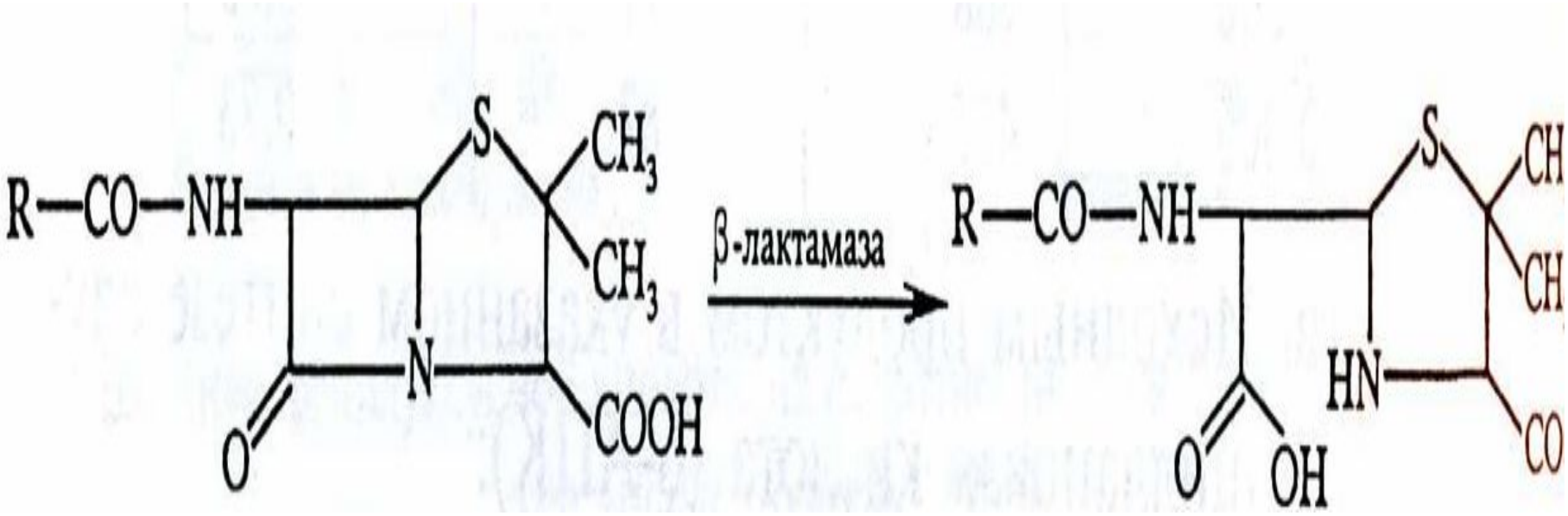
Пенициллины

В основе бициклическая структура, состоящая из β-лактамного кольца, соединенного с тиазолидиновым кольцом, образуют **6-аминопеницилановую кислоту (6-АПК**).

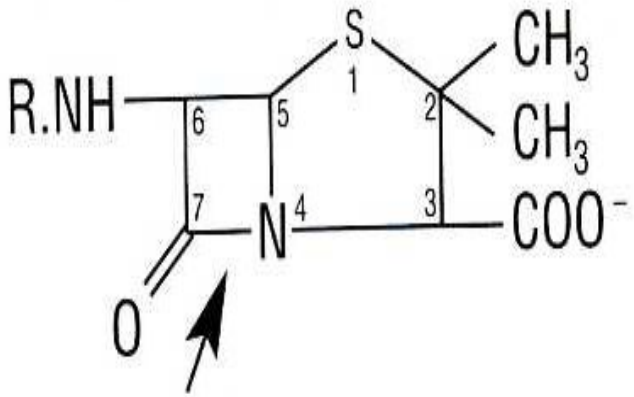


Целостность 6_АПК важна для проявления антибиотических свойств.

Гидролитическое расщепление пенициллинов ферментами пенициллиназообразующих микроорганизмов → неактивные производные пеници**ллоин**овой кислоты



Пенициллины.



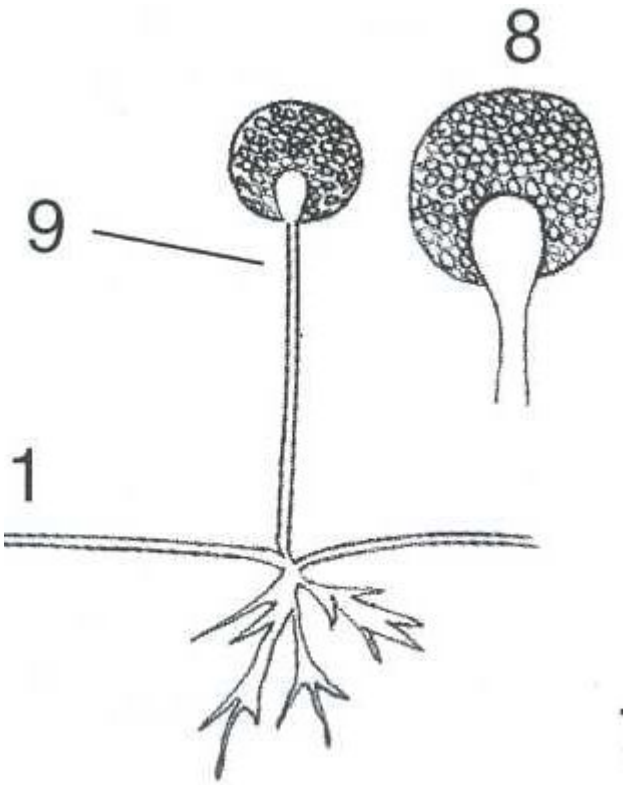
6-АПК не проявляет антибиотических свойств (0,002 активности бензилпенициллина), но обеспечивает антибактериальную активность ее производных.

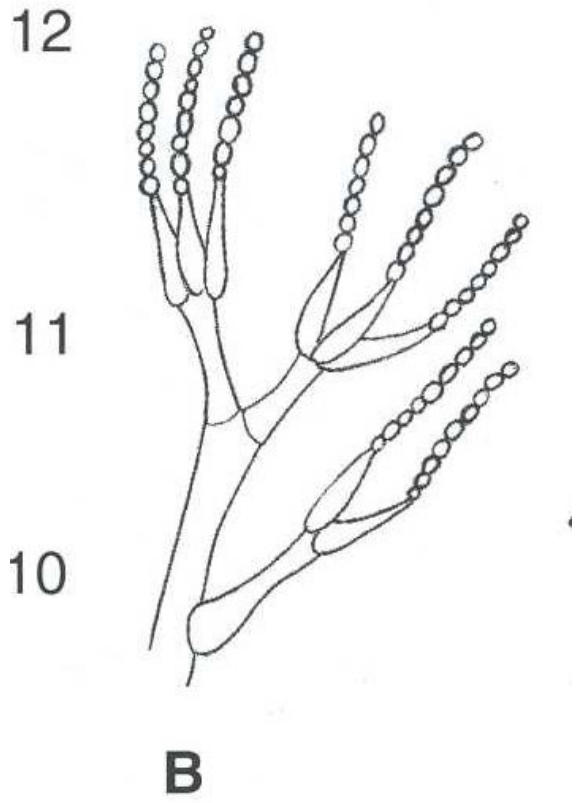
Различные типы пенициллинов близки по строению и отличаются лишь строением радикала R

Липосомирование пенициллинов позволяет:

1. Защитить антибиотик от воздействия β-лактамазы;
2. Увеличить проницаемость через мембрану Gr- бактерий;
3. Увеличить химическую стабильность антибиотика;
4. Увеличить доступность для жировых тканей макроорганизма

Пенициллины. Продуцент – *Penicillium chrysogenium.*





Несовершенный (митоспоровый) гриб.
Вегетативные структуры: столоны и ризоиды (1). Анаморфы: спорангии со спорами (8) спорангиеносец (9); конидиеносец (10); стеригмы (11); конидии (12)

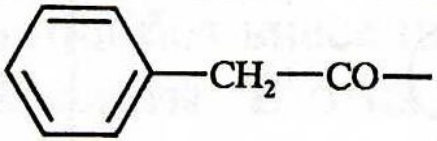
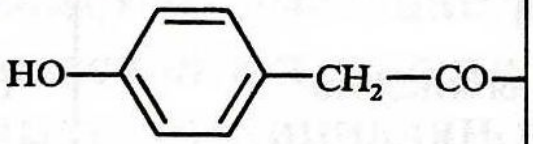
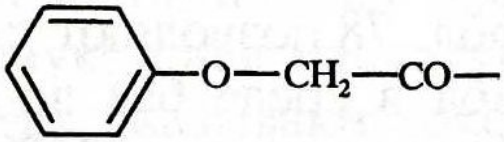
Пенициллины.
Особенности культивирования

- *Penicillium chrysogenium*
- Вырабатывает сильные протеолитические ферменты, поэтому способен расти на грубой ПС, содержащей:
  - Арахисовую муку
  - Муку хлопковых семян
  - Жмых (отходы)
  - Лактозу, сахарозу (глюкоза нежелательна)
  - Натрия сульфат, тиосульфат
  - Фосфаты, фитаты
- Трофофаза. Оптимальная температура: +30°;
- ИДИОФАЗА: +20°С

Предшественники биосинтеза пенициллина

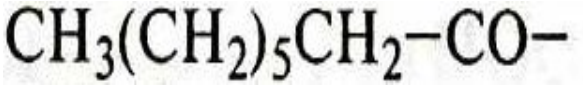
P. chrysogenium синтезирует различные антибиотики, отличающиеся строением радикала R, антибиотической активностью и спектром биологического действия. Вид вырабатываемого антибиотика определяется ***веществом предшественником***, содержащимся в ПС – веществом, которое гриб тем или иным путем включает в молекулу 6-АПК.

Различные типы природных пенициллинов и строение их радикалов

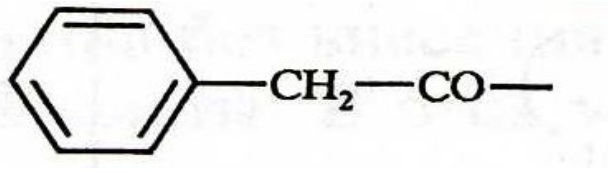
Название пенициллина		Строение радикала R	Активность натриевых солей в отношении *Micrococcus pyogenes*, ед./мг
общепринятое	условное		
Бензилпенициллин	G		1667
п-Оксибензилпенициллин	X		900
2-Пентенилпенициллин	F	$CH_3CH_2CH{=}CHCH_2{-}CO{-}$	1600
п-Гептилпенициллин	K	$CH_3(CH_2)_5CH_2{-}CO{-}$	2300
п-Амилпенициллин	Дигидро F	$CH_3(CH_2)_3CH_2{-}CO{-}$	1500
Феноксиметилпенициллин	V		1670
Аллилмеркаптометилпенициллин	O	$CH_2{=}CHCH_2SCH_2{-}CO{-}$	1630

Влияние предшественников на образование пенициллинов культурой *P. chrysogenium*

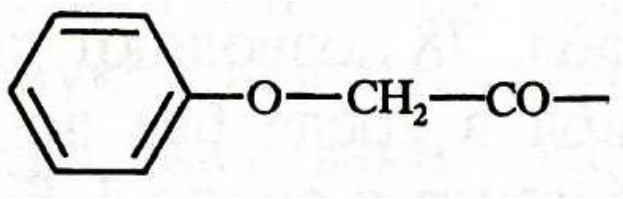
- 1. ***Без*** внесения ***предшественника*** образуется преимущественно гептилпенициллин (низкоактивный) – до 70%;



- 2. При добавлении к ПС производных ***фенилуксусной кислоты*** увеличивается общий выход пенициллинов, а концентрация гептилпенициллина уменьшается. Возрастает выход высокоактивного бензилпенициллина (до 99%)



- 3. При добавлении к ПС ***феноксиуксусной кислоты*** гриб образует феноксиметилпенициллин (пенициллин V) – пенициллин для перорального приема



Гипотеза

Большинство предшественников токсичны для гриба.

С биологической точки зрения использование грибом предшественников для синтеза пенициллинов рассматривается как «защитный синтез» = обезвреживание токсичного предшественника путем связывания с продуктами обмена гриба и экскреция за пределы клетки

Особенности биосинтеза пенициллина

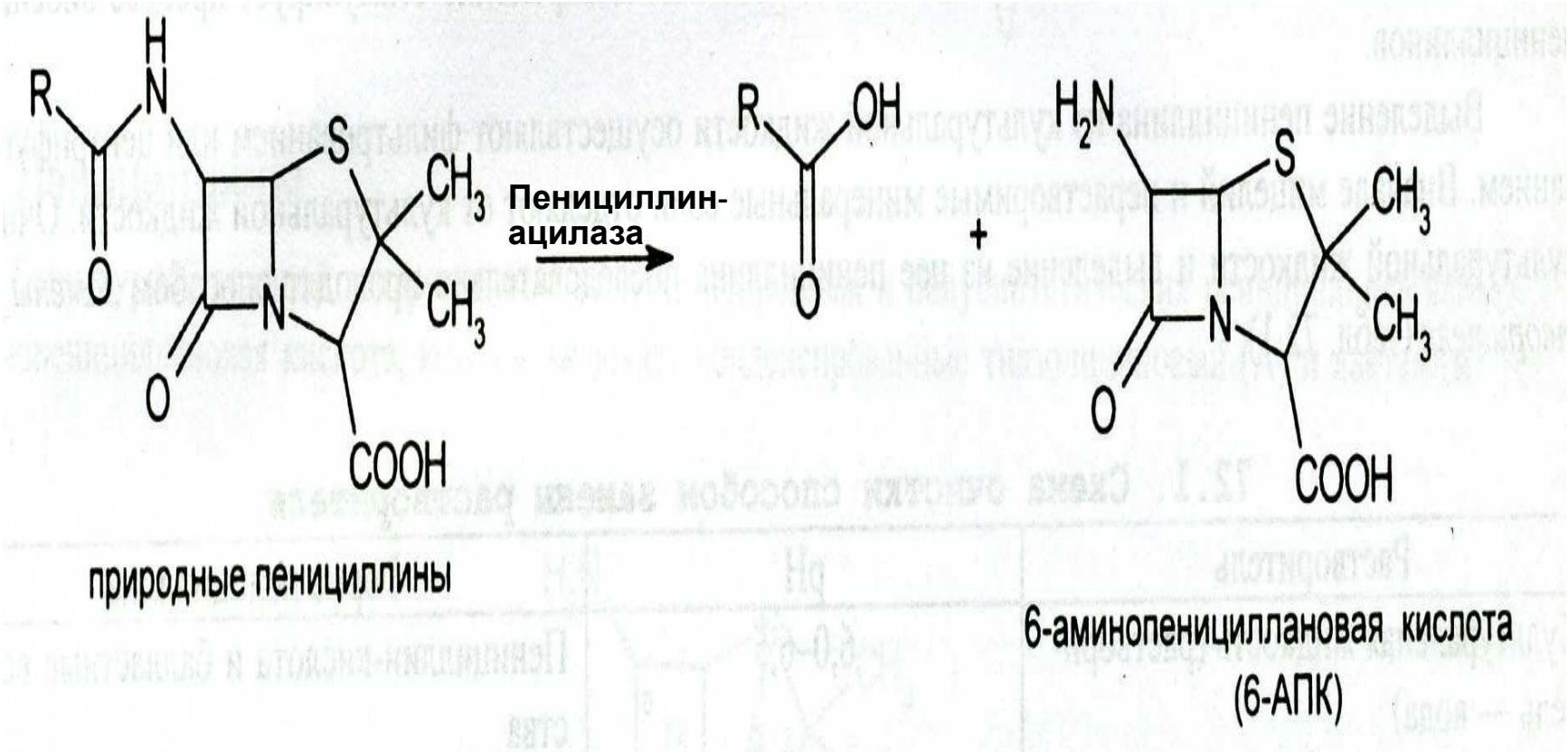
- Посторонние микроорганизмы **снижают** выход пенициллина, т.к. продуцируют пенициллиназу
- Все технологические операции ведут в условиях строгой стерильности
- Пенициллин выделяется грибом в культуральную среду.
- Из культуральной жидкости пенициллин экстрагируют в кислотной форме неполярным растворителем (хлороформ, бутанол, бутилацетат)
- Экстракт обрабатывают водным раствором щелочи для перевода кислотной формы пенициллина в соль
- Образовавшаяся соль растворяется в воде. Экстракт обрабатывают водой.

Процедуру повторяют многократно

Полусинтетический способ получения пенициллинов

1. В результате биосинтеза при развитии *P.chrysogenium* получают природный пенициллин
2. Далее продукт (чаще всего бензилпенициллин) извлекают из КЖ и гидролизуют иммобилизированной **пенициллинацилазой** бактериального происхождения с образованием 6АПК
3. **Ацилируют амин в молекуле 6-АПК соответствующей кислотой или ее хлорангидридом**

1 стадия производства полусинтетических пенициллинов

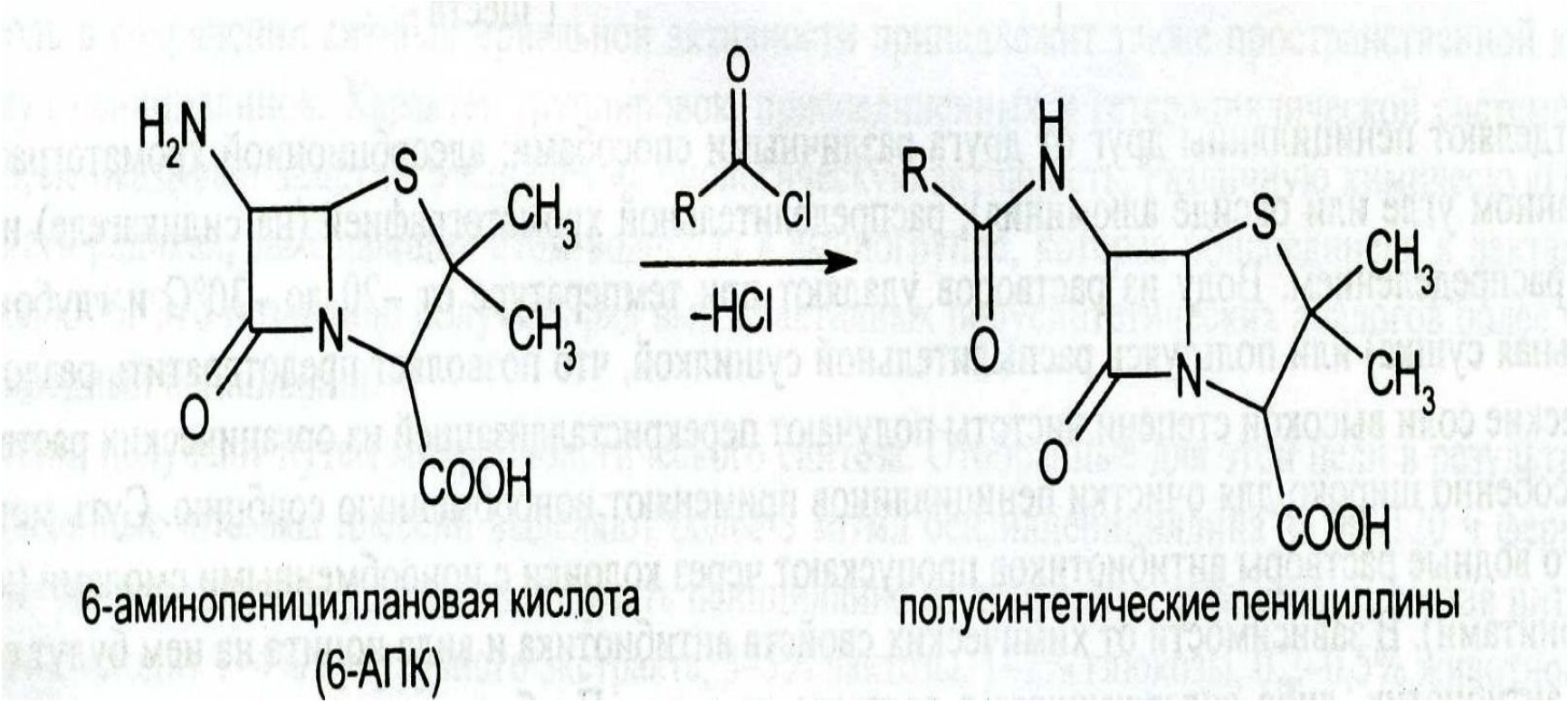


природные пенициллины

6-аминопенициллановая кислота (6-АПК)

Природный антибиотик извлекают из КЖ экстракцией или с помощью ионообменной хроматографии и с помощью фермента пенициллинацилазы отщепляют природный радикал

2 стадия



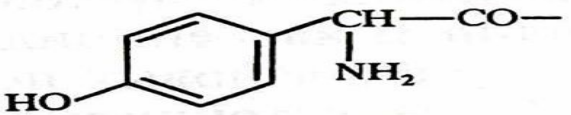
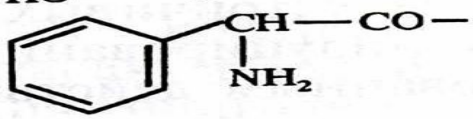
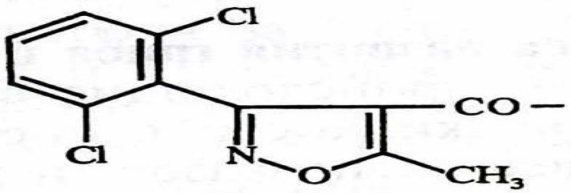
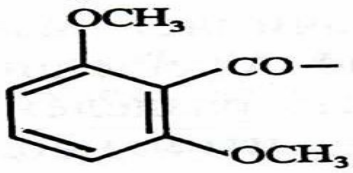
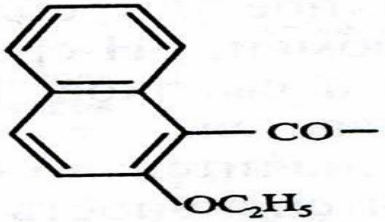
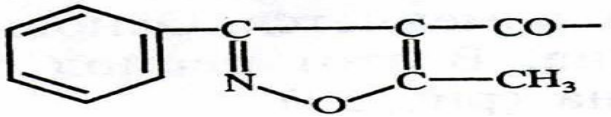
6-аминопенициллановая кислота (6-АПК)

полусинтетические пенициллины

Ацилирование амина в молекуле 6-АПК соответствующей кислотой или ее хлорангидридом

На основе **6-**АПК синтезировано более **20** тысяч полусинтетических пенициллинов

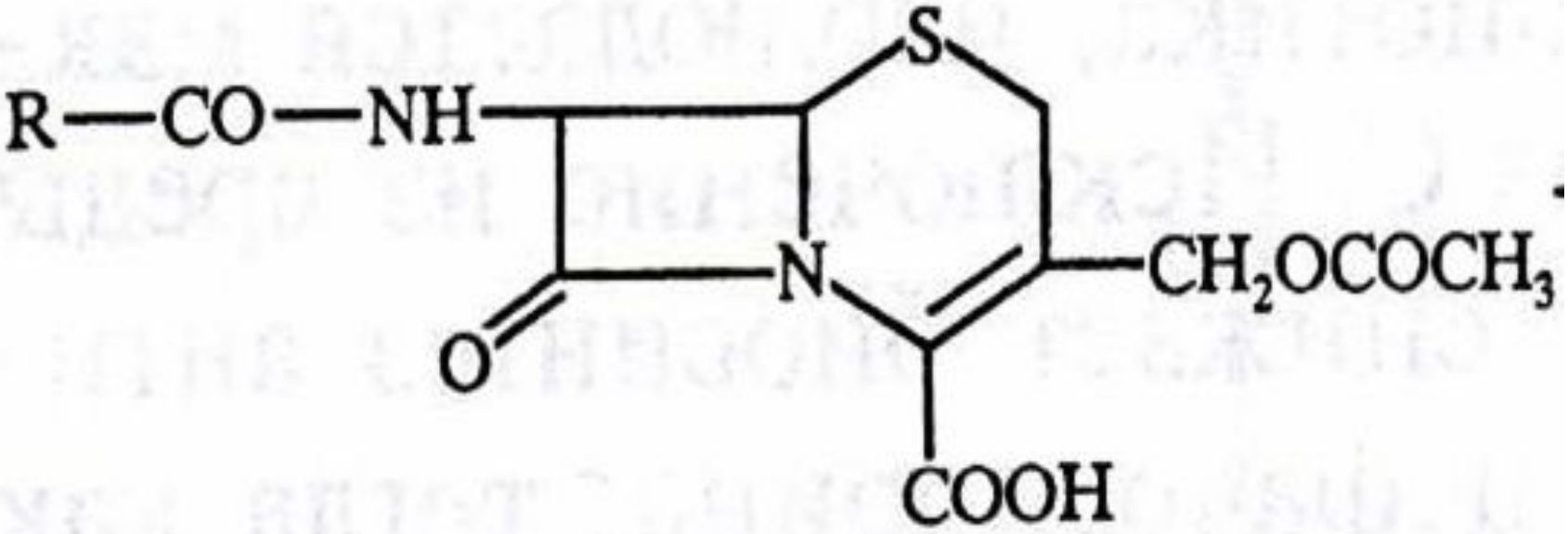
Наиболее ценные полусинтетические пенициллины

название пенициллина	строение радикала **R**
Амоксициллин	
Ампициллин	
Диклоксациллин	
Карбенициллин	
Метициллин	
Нафциллин	
Оксациллин	

ЦЕФАЛОСПОРИНЫ. ШСД

- Продуцент – гриб рода *Cephalosporium acremonium* (переименован в *Acremonium chrysogenium*), выделен в 1945 г.

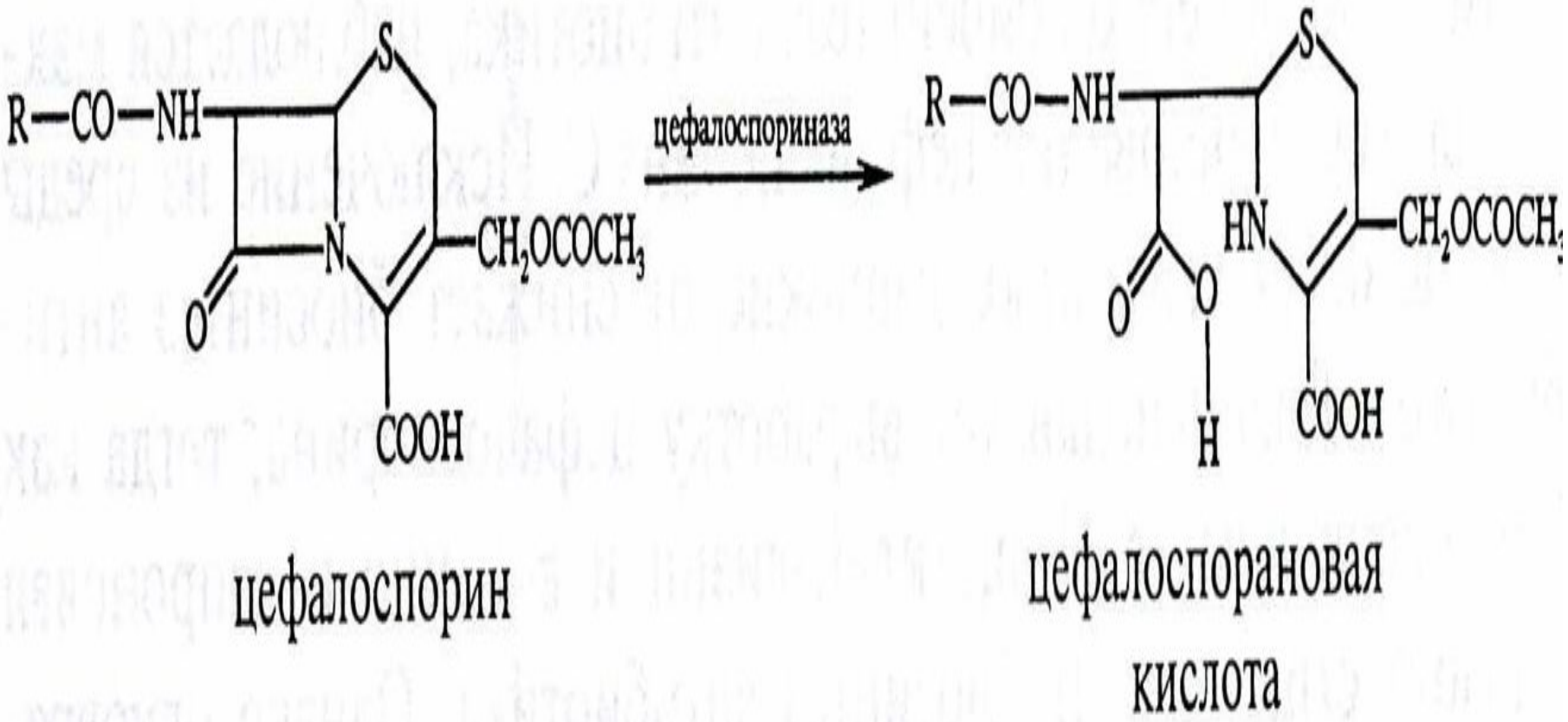
- Проникают через клеточную оболочку не только Gr+ но и Gr- микроорганизмов



цефалоспорин

β-лактамное кольцо сопряжено с дигидротиазиновым кольцом

Устойчив к β-лактамазе, но расщепляется ферментом – цефалоспориназой (вырабатывается лишь немногими м/о рода *Enterobacter)*



цефалоспорин

цефалоспорановая кислота

Механизм действия пенициллинов и цефалоспоринов

Ингибируют синтез клеточной стенки микроорганизмов. Связываются с пенициллинсвязывающими протеинами (ПСП) – клеточными рецепторами м/о. В результате возможны различные реакции:

- аномальное увеличение микробной клетки;
- нарушение строения поверхности клеточной мембраны;
- останавливается синтез гликопротеина;
- активируется литический фермент в клеточной стенке, что приводит к лизису клетки

ИНГИБИТОРЫ ЛАКТАМАЗ

клавулановая кислота

Клавамы - (3-лактамные антибиотики, отличающиеся от пенициллинов тем, что в тиазолидиновом кольце последних сера заменена на кислород *(клавемовое оксазолидиновое кольцо)* и в позиции 6 нет боковой цепи. В сочетании с ампициллином и амоксициллином является основой комбинированного препарата *аугментин.*

1-карбапенемовое кольцо

Карбапенемы - это новое семейство лактамных антибиотиков, представляющих собой аналоги пенициллинов или клавамов, в которых сера у первых и кислород у вторых замещены на углерод.

К этому семейству относятся *оливановые кислоты* и *тиенамицин*