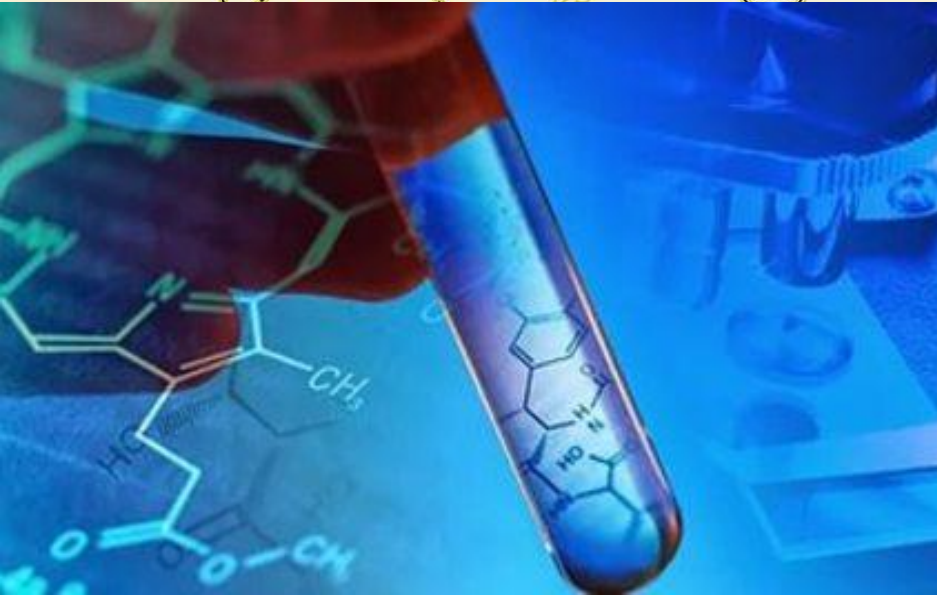


Лекция

Предмет биотехнологии. Цели и задачи биотехнологии. История развития биотехнологии. Слагаемые биотехнологического процесса. Объекты биотехнологии и их биотехнологические функции



**Лектор: к.б.н. Караева Альбина
Маирбековна**

План лекции:

1. Роль биотехнологии в современной фармации. Определение понятия биотехнологии.
2. Краткая историческая справка по развитию биотехнологии в мире.
3. Новые технологии в биофармацевтике.
4. Биотехнология и лекарственные средства.
5. Биообъекты и их биотехнологические функции.
6. Биосинтез БАВ в условиях биопроизводства.
7. Мутагенез и методы выделения мутантов.
8. Экономическое обоснование биотехнологического производства лекарственных средств.

БИОТЕХНОЛОГИЯ

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

Основная задача современной биотехнологии

СОЗДАВАТЬ новые лекарственные средства, **сорта** растений, **породы** животных и **штаммы** микроорганизмов, имеющие **ценные признаки**, стабильно передающиеся по наследству.

2. Краткая историческая справка по развитию биотехнологии в мире.

В развитии биотехнологии можно выявить несколько этапов:

Допастеровский период начинается с глубокой древности и продолжается до 1865 г. В этот период люди использовали эмпирический опыт в приготовлении различных продуктов питания.

С помощью микроорганизмов изготавливали пищевые продукты:

- Хлебобулочные изделия;
- Кисломолочные продукты (сыры, йогурт);
- Другие продукты, получаемые на основе брожения (уксус);
- Спиртные напитки (пиво, вино);

Пастеровский период включает вторую половину 19 века и первую половину 20 века (1865—1940 гг.).

1917г – Карл Эрике вводит термин «биотехнология»

В этот период времени освоено:

- Промышленное культивирование микроорганизмов (для получения продуктов брожения этанола, бутанола, ацетона, глицерола);
- Производство органических кислот (уксусной, лимонной, молочной).

Именно Л.Пастер ввел понятие биообъекта, не прибегая, впрочем, к такому термину, доказал «живую природу» брожений: каждое осуществлявшееся в производственных условиях брожение (спиртовое, уксусно-, молочнокислое и т.д.) вызывается своим микроорганизмом, а срыв производственного процесса обусловлен несоблюдением чистоты культуры микроорганизма, являющегося в данном случае биообъектом.

Практическое значение этих исследований Л. Пастера сводится к требованию поддержания чистоты культуры, т.е. к проведению производственного процесса с индивидуальным, имеющим точные характеристики биообъектом.

Третий период связан с биотехнологическим получением антибиотиков и гормональных препаратов. Он занимает период с 1940—1960 гг. В это время было налажено:

- Промышленное производство антибиотиков (пенициллина, стрептомицина, хлортетрациклина и др.);
- Микробное превращение стероидов (получение кортизона, тестостерона, эстрогена).

Четвертый период характеризуется расширением круга промышленно производственных микробных продуктов (1960—1975 гг.). В это время микроорганизмы используются для:

- Микробиологического производства аминокислот (L-глутамата, L-лизина);
- Разработки методик производства микробного белка;
- Производства ферментов (протеаз, амилаз, глюкозоизомераз);
- Промышленного применения иммобилизованных ферментов (глюкозоизомеразы);
- Производства бактериальных полисахаридов (ксантана).

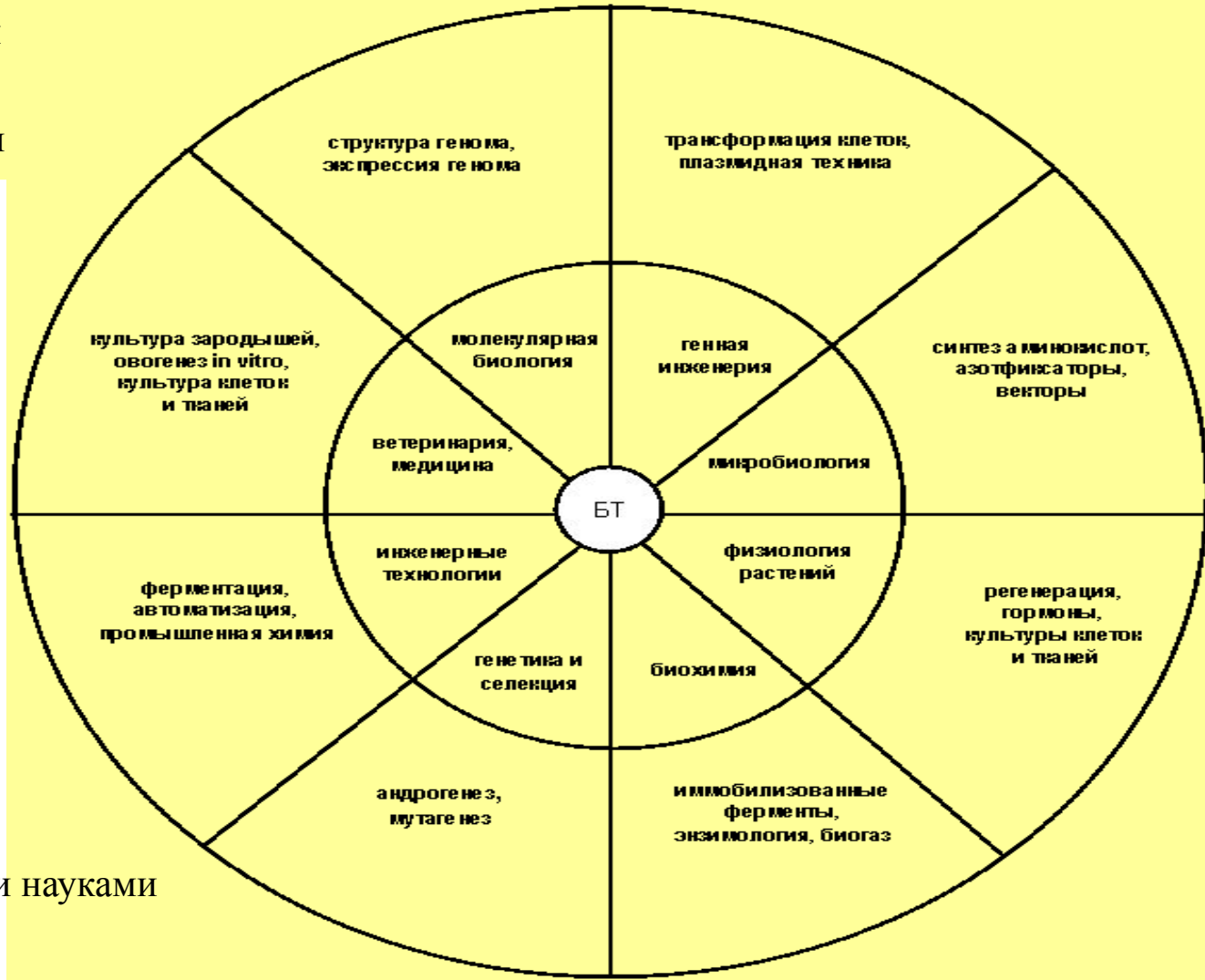
С 1975 года начался **пятый период** в биотехнологии с использованием методов молекулярной биотехнологии, который называют периодом синтетической биотехнологии. В настоящем периоде используют не только традиционные приемы биотехнологии, но и генетические подходы, в частности, разработку технологии рекомбинантной ДНК (1973 г.). Начиная с 1982 г. на рынок поступают первые продукты, полученные такими методами: (вакцины против диареи животных, инсулина человека и другие фармакологические препараты).

Апрель 2003 года ознаменовался сенсацией в биологии и медицине: Международный консорциум по составлению генетической карты человека (Центр геномного секвенирования: Вашингтонский университет и Сенгеровский центр в Кембридже) опубликовал заявление, что удалось полностью расшифровать геном человека. Титанический труд сотен исследователей из США, Великобритании, Германии, Франции, Японии и Китая занял более 10 лет и обошелся почти в 3 млрд. долларов.

Первое место в мире по выпуску биотехнологической продукции занимает США, которая ежегодно выделяет 3 млрд. долларов на поддержку фундаментальных исследований в области медицины, из которых 2,5 млрд. долларов относится к области биотехнологии. Второй страной по выпуску биотехнологической продукции является Япония, третье место за Израилем.

Современная биотехнология – это наука, которая на практике использует достижения современных фундаментальных наук, таких как:

1. молекулярная биология
2. молекулярная генетика
3. биоорганическая химия



Связь биотехнологии с другими науками
(по В.И.Кефели, 1989).

Биокаталитические технологии. Направленная модификация с помощью методов генной инженерии открывает возможности трансформации структуры ферментов таким образом, что они приобретают качественно новые свойства. Так, особый интерес в мире сейчас представляет возможность перехода от пенициллинов к цефалоспорином с помощью генно-инженерного фермента экспандазы, благодаря чему унифицируется биотехнологическая часть получения антибиотиков. Далее с помощью других биокаталитических процессов и совмещения их с химическими можно производить класс новых антибиотиков для борьбы с инфекциями.

Биокаталитические подходы открывают большое поле для различных вариантов построения новых фармацевтических процессов. В частности, использование генно-инженерных ферментов позволяет получить оптически активные изомеры соединений, которые составляют более 70% всех лекарств. При этом период окупаемости биокаталитических процессов значительно короче по сравнению с химическим синтезом, а по энергозатратам и капиталовложениям они тоже имеют большие перспективы. Техноинженерные ферменты широко используются для создания диагностических тест-систем в биохимическом, иммуноферментном и ДНК-анализах.

Биотехнология и лекарственные средства

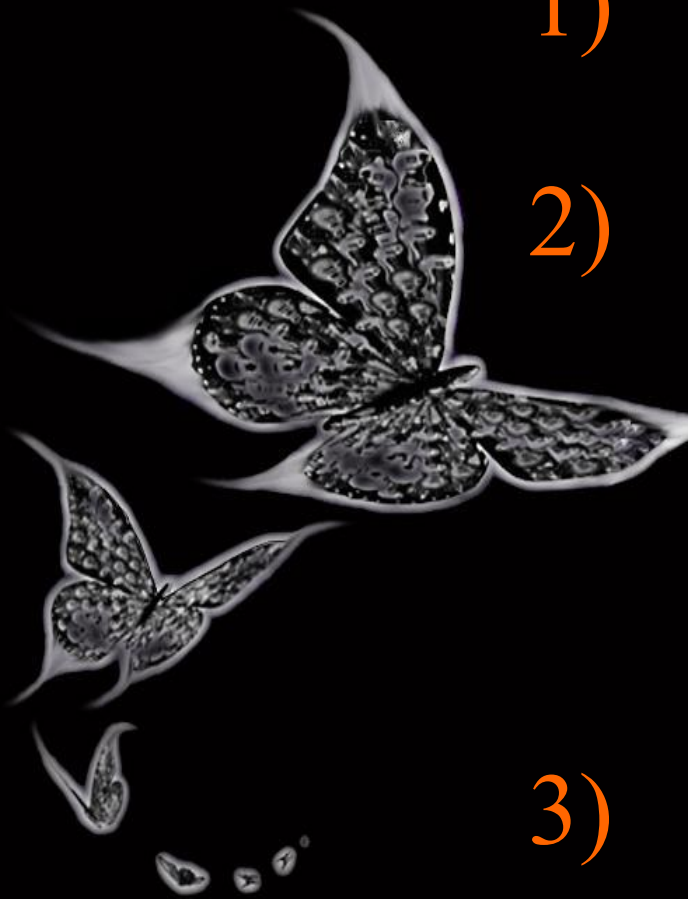
Биотехнологические лекарственные средства – это лекарственные препараты, предназначенные для профилактики, лечения или диагностики *in vivo*, которые развивают не фармакологическую, а биологическую активность. Они обладают рядом существенных отличий от химико-синтетических лекарственных средств. Действующее вещество биотехнологических препаратов имеет биологическое происхождение и является производным от живых клеток, обладает сложной гетерогенной молекулярной структурой. Исходным субстратом служат клетки животного происхождения или микроорганизмы (бактерии типа *E.coli*, дрожжи и пр.), используются их клеточные и субклеточные структуры. Существенным отличием биотехнологических лекарственных средств является то, что в них используется естественная способность к метаболизму. Для их получения производится изоляция и изменение геномной ДНК исходного продукта таким образом, что он получает новую, неспецифическую для данного вида способность к биосинтезу, которая и используется в лекарственных средствах. В первую очередь здесь следует назвать создание генномодифицированных организмов для получения рекомбинантных терапевтических протеинов.

На сегодняшний день половина инновационных лекарственных средств в мире основана на протеинах или олигонуклеотидах. На фарм рынок также выходит новая категория лекарственных средств – биосимиляров – аналогов оригинальных биотехнологических лекарственных средств со сходной, но неидентичной активной молекулой, которые, в отличие от дженериков, имеют полный пакет документов: характеристику состава и свойств, технологии производства, характеристику ФК и ФД, данные доклинических и клинических исследований эффективности и безопасности терапии (с обязательной оценкой иммуногенности), долгосрочный план управления рисками (фармаконадзор).

В США зарегистрировано 4 биосимиляра В ЕС зарегистрировано 13 биосимиляров (эритропоэтин и др.). Ожидается, что введение в медицинскую практику биосимиляров резко снизит затраты здравоохранения на биотехнологические лекарственные средства, сделает их доступными для широких слоев населения. В руках у врачей окажутся еще более эффективные препараты для борьбы с серьезными заболеваниями, многие из которых раньше считались неизлечимыми. Согласно отчету, подготовленному IMS Institute for Healthcare Informatics, к 2020 г. экономия за счет применения биосимиляров в США и пяти крупнейших европейских странах (Германия, Франция, Италия, Великобритания, Испания) может оставить до 98 млрд евро (110 млрд долл.), сообщает Reuters. Интерес к биосимилярам значительно вырос за последние два года благодаря одобрению аналогов препаратов на основе моноклональных антител, которые являются одними из самых продаваемых рецептурных препаратов в мире.

Основные ПРЕИМУЩЕСТВА современной биотехнологии над селекцией:

- 1) Можно скрещивать неродственные виды;
- 2) Можно извне управлять процессом рекомбинации в организме (постоянство своего генетического состава организм очень надежно охраняет);
- 3) Можно предугадать, какое получится потомство.



Методы биотехнологии

Методы
генной
инженерии

Методы
клеточной
инженерии

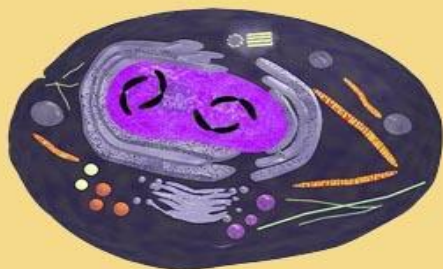
Клонирование

ЧЕМ? пользуется биотехнология

Генная инженерия-

это совокупность методов, позволяющих посредством операций *in vitro* (в пробирке, вне организма), переносить генетическую информацию из одного организма в другой.

Допустим, что...



A

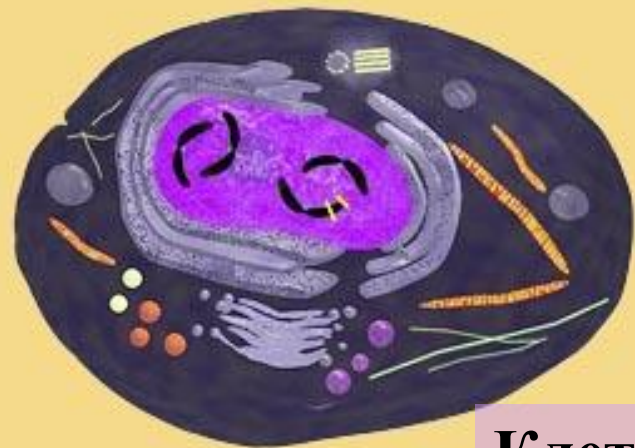


B

Клетка А имеет какой-то признак,
который мы хотим
получить в клетке В

**Для этого надо осуществить 4 стадии трансгеноза
(переноса генов) ...**

Стадия 1

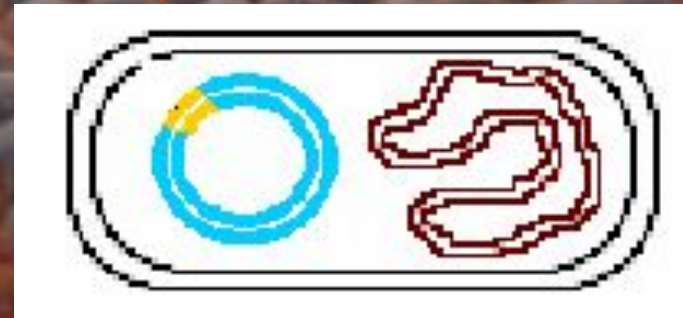


Клетка А

рестриктазы



Участок ДНК

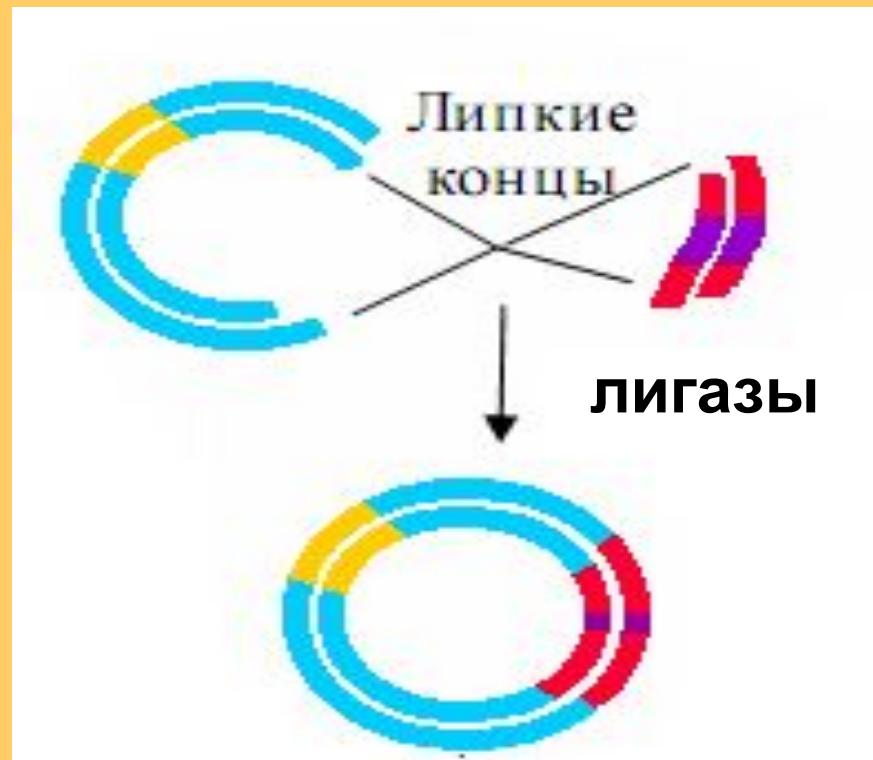


Бактериальная клетка

Идентификация и выделение интересующих исследователей генов из клетки А

Выделение плазмид из клеток бактерий

Стадия 2 Соединение отдельных фрагментов ДНК в единую молекулу в составе плазмиды



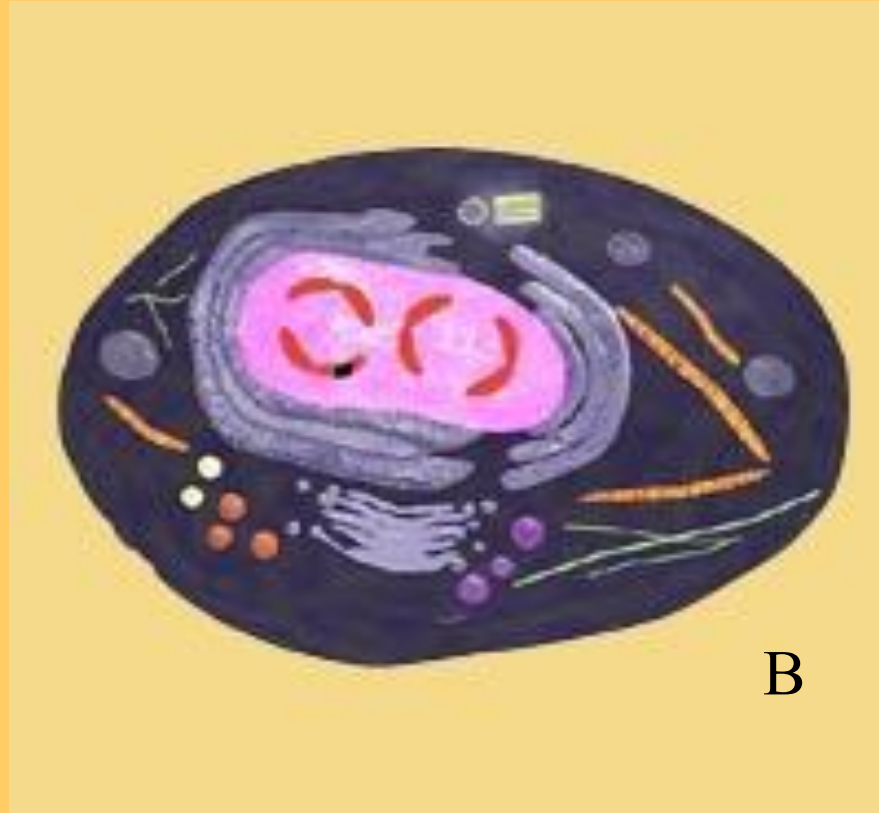
Гибридная плазмидная ДНК

Стадия 3 Введение гибридной плазмидной ДНК в клетку В



Клетка В

Стадия 4 Копирование нужного гена в новой клетке с обеспечением его работы



Клетка В получила новый ген, а вместе с ним и новый признак

Результаты генной инженерии

С помощью этих методов
получают трансгенные
организмы, витамины,
антибиотики,
аминокислоты, гормоны.





Соя — самое „трангенное“ растение в мире. В США около 75% её посевных площадей засеяны генетически модифицированными сортами, а, например, в Аргентине они составляют 99%!



Рапс масличный в диком виде не встречается. В настоящее время рапс — основная масличная культура во многих странах мира, а также частый объект генетической модификации.



Бабочка-монарх — символ движения противников генетически модифицированных растений...

Методы клеточной инженерии

1. Клеточная селекция

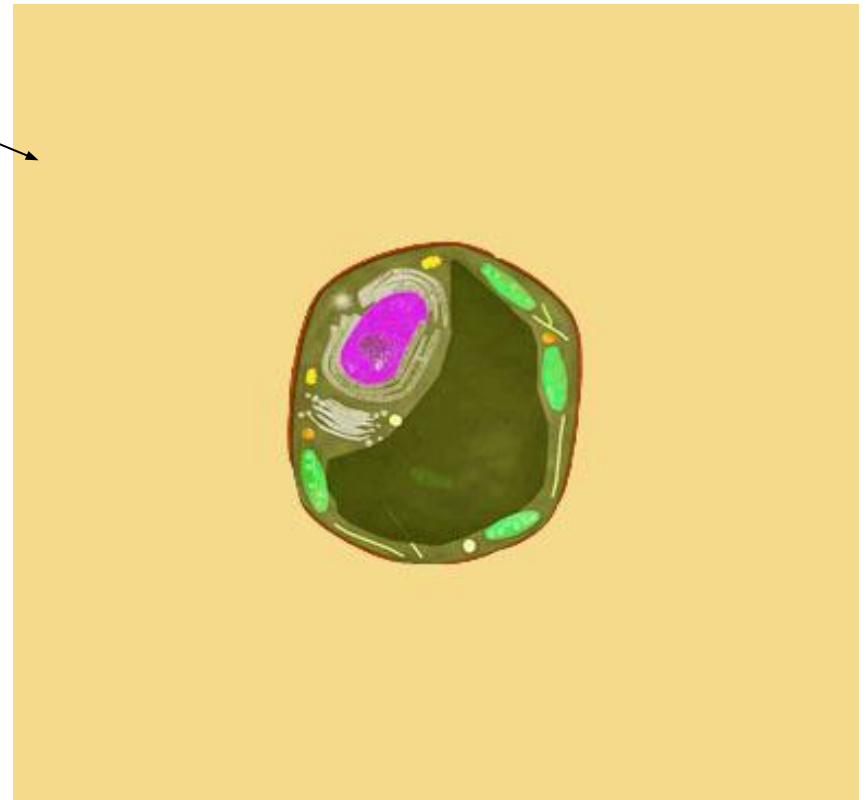
2. Соматическая гибридизация

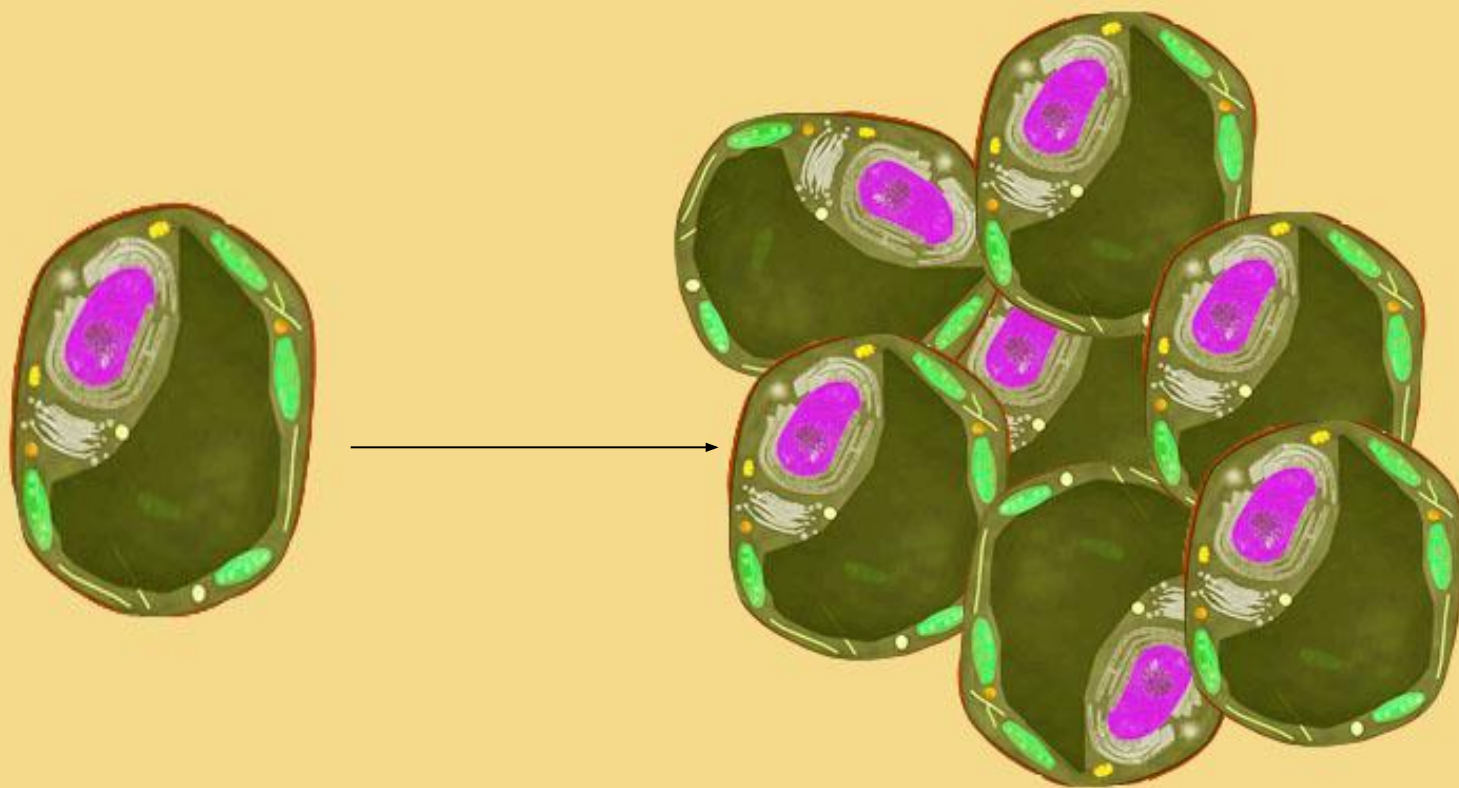


Клеточная селекция



Чтобы получить
большое количество
растений, можно
выделить одну
клетку

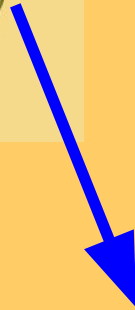
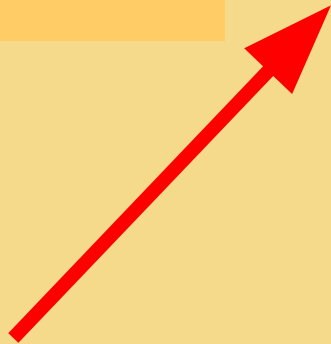
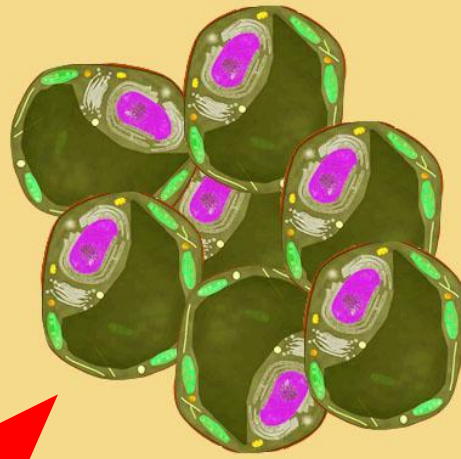




Размножить клетки и прорастить в питательной среде

И получить большое количество таких же растений

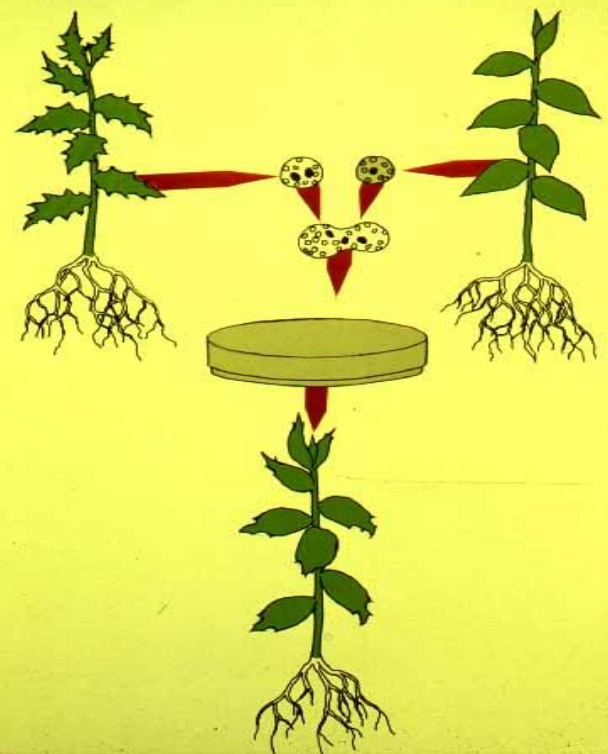






Соматическая гибридизация

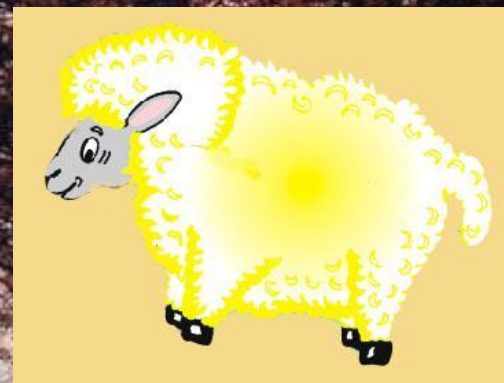
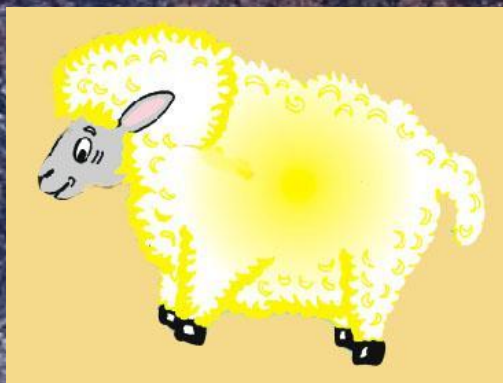
- это слияние двух различных клеток в культуре тканей



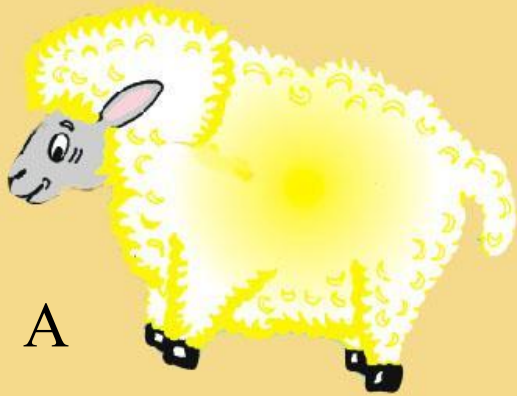
История овечки Долли

Самый новый метод, открывающий много перспектив и создающий много споров - клонирование.

Клонирование человека: «за» или «против»



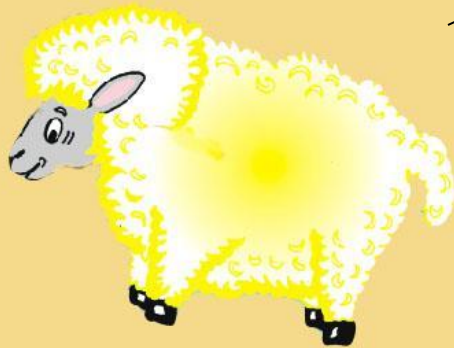
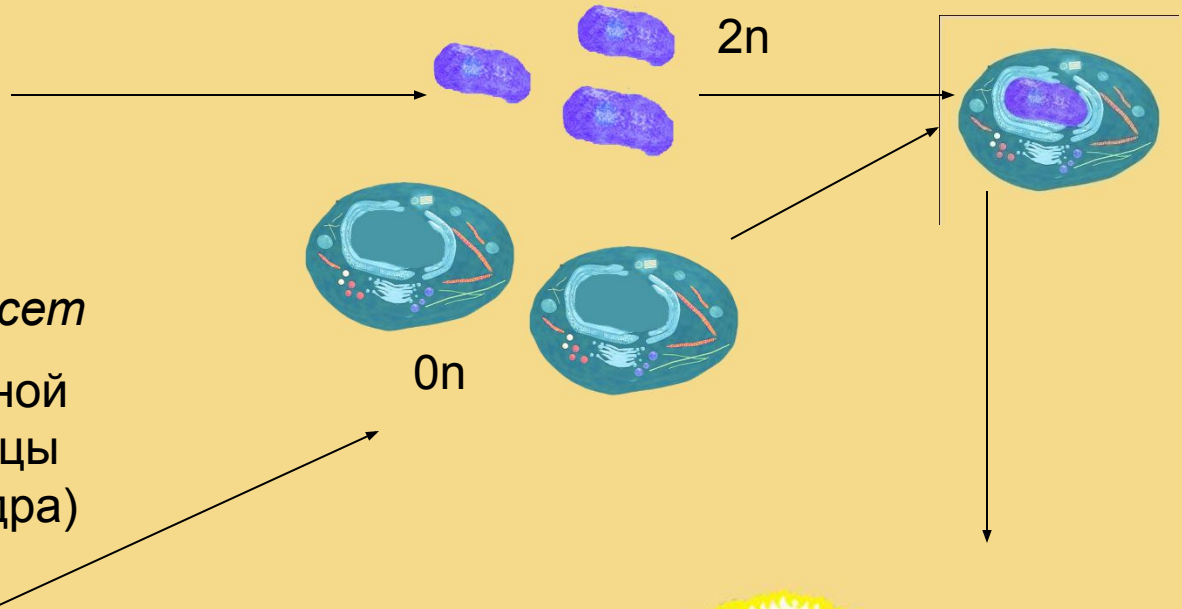
А вот как это было...



А

овца породы финский дорсет

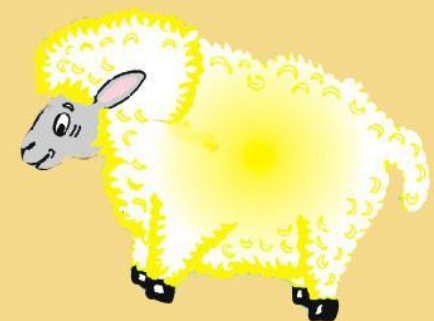
(из клеток тканей молочной железы этой взрослой овцы извлекли соматические ядра)



Б

овца породы шотландская черномордая

(от которой взяли яйцеклетку, удалив из неё гаплоидное ядро)



В

овца породы шотландская черномордая

(ей трансплантировали образовавшуюся диплоидную зиготу, которую предварительно стимулировали к делению электростимуляцией)

КАК оценивать современную биотехнологию?

ПРОТИВНИКИ

- НЕ все методы достаточно отработаны и проверены для внедрения их в жизнь
- НЕгативное влияние модифицированных продуктов может проявляться через длительное время или отражаться на потомстве
- НЕизвестно, как “новые растения, животные, микроорганизмы” повлияют на экологический баланс в мире

СТОРОННИКИ

- Внедрение нужных генов вскоре позволит избавиться от наследственных заболеваний
- Можно заставлять клетки синтезировать необходимые лекарства, вещества употребляемые в пищу
- Возможность клонировать любые живые объекты
- Можно спасти планету от голода

Биообъекты и их функции в биотехнологическом производстве

Биообъект – это продуцент, биосинтезирующий нужный продукт, либо катализатор, фермент, который катализирует присущую ему реакцию.

Функции биообъекта – полный биосинтез целевого продукта, включающий ряд последовательных ферментативных реакций или катализ лишь одной ферментативной реакции, которая имеет ключевое значение для получения целевого продукта.

Биосинтез БАВ в условиях производства.

Необходимые условия для биосинтеза

Создание стерильных условий для биосинтеза.

Параметры биотехнологического процесса, влияющие на биосинтез

Параметры, влияющие на биосинтез:

- физические,
- химические,
- биологические.

Виды процессов биосинтеза. Процесс биосинтеза подразделяют на:

- периодический,
- полупериодический,
- непрерывный,
- многоциклический.

Мутагенез и методы выделения мутантов

Мутации различают цитоплазматические (внехромосомные) и ядерные (хромосомные).

Наследственные изменения называются мутациями в геноме, но есть и внехромосомные изменения.

Таким образом, мутации проявляются на субклеточном и молекулярном уровне.

Хромосомные мутации включают три основных типа:

1. изменение числа хромосом
2. изменение числа и порядка расположения генов (перестройка хромосом ведет к структурным изменениям)
3. изменения индивидуальных генов (внутригенные изменения)

В селекции микроорганизмов основное значение имеют два последних типа мутаций.

Важной характеристикой мутантов является их способность к реверсии, то есть возвращения к исходному фенотипу (обратное мутирование). Мутанты, которые появляются в результате реверсии называются **ревертантами**

Современная селекция основана на выделении клоновых культур. Клон – это генетически однородное потомство одной клетки (это колония, выросшая из одной клетки). Клоновая культура, имеющая наследственную однородность, называется штаммом.

Типы мутаций:

1. Делеция (стирание) – выпадение участков хромосомы или нескольких генов.
2. Дупликация – удвоение генов.
3. Амплификация – умножение отдельных генов или группы генов.
4. Транспозиция - вставка участка хромосомы в новые места на хромосоме.
5. Инверсия – изменение порядка расположения генов на хромосоме, при этом может быть утрата одних функций и приобретение новых.
6. Летальные мутации – это мутации, захватывающие слишком большие участки генома, в результате чего организм погибает.
7. Внутригенные мутации:
 - точечные – изменение последовательности нуклеотидов в пределах одного гена.
 - транзиция или трансверсия – выпадение или вставка одного или нескольких оснований, например, транзиция – пурин замещается на пурин или пиримидин на пиримидин, трансверсия – пурин замещается на пиримидин.

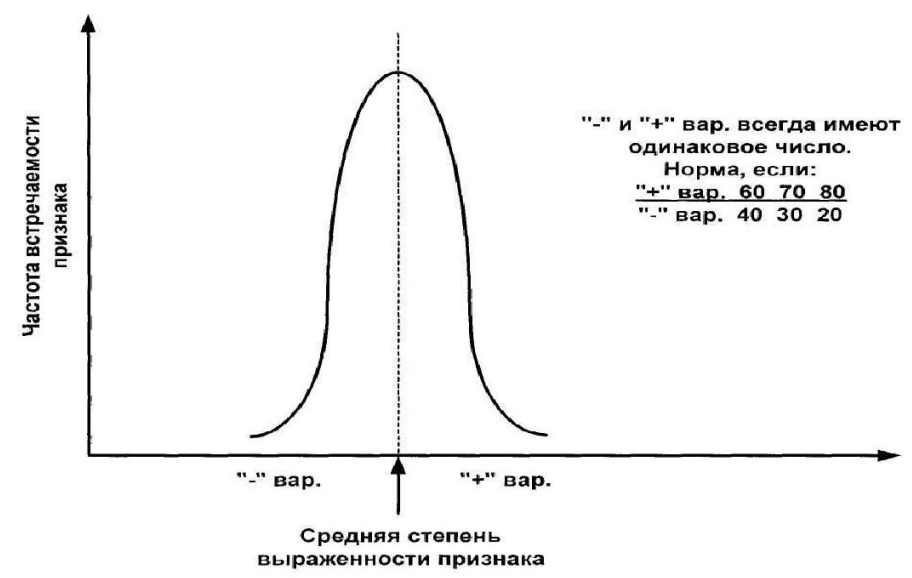
Точечные мутации приводят к замене одной аминокислоты в белке на другую или к изменению конформации белковой молекулы, что может привести к потере активности фермента. Если белок регулятор или репрессор, то это может привести к повышению выработки целевого продукта продуцентом.

Вывод: совершенствование биообъекта – это получение биообъектов – продуцентов с мутациями в геноме, которые отличаются от исходного биообъекта в сторону улучшения биотехнологических свойств, в частности, в сторону увеличения образования целевого продукта.

Существуют традиционные методы совершенствования:

Естественный отбор – селекция. Нормальная популяция м/о гетерогенна: «+» вариант несет желательный признак», « -» - вариант не несет нужного признака.

Естественный отбор (селекция)
Вариационный ряд



Индукцируемый мутагенез - путь совершенствования биообъектов радикальными методами. К таким методам относятся:

- обработка биообъекта химическими мутагенами, нацеленными на ДНК или ДНК-тропными агентами.
- После этой обработки число мутантов резко возрастает, как «положительных» так и «отрицательных».

При этом у части мутантов резко изменяются признаки, причем, чем больше доза мутагена, тем больше и летальных, не нужных мутантов, но одновременно и больше процент выживших мутантов. Необходимо, чтобы сохранялся баланс между летальными мутациями и количеством выживших мутантов.

Цели, которые необходимо достигать биотехнологу при совершенствовании продуцента:

1. Увеличение продуктивности в достижении большого выхода лекарственных веществ на единицу биомассы.
2. Придать продуценту способность использовать менее дефицитные и более дешевые среды.
3. Продуцент не должен ретроингибировать биосинтез конечного продукта.
4. Устойчивость продуцента к вирусным инфекциям (бактериофагам).
5. Нетребовательность к оборудованию, т.е. биосинтез не должен снижаться при несовременной технологии оборудования (например, достижение меньшей вспениваемости культуральной жидкости)
6. Оптимизация свойств продуцента в аспекте медицинской промышленности (продуцент не должен иметь неприятного запаха и т.д.)

Главный тезис биотехнолога: увеличение выхода продукта на единицу биомассы продуцента.

Экономическое обоснование биотехнологического производства лекарственных средств

Биотехнология — чрезвычайно привлекательная с экономической точки зрения область. По инвестиционной привлекательности она стоит на втором месте после информационных технологий.

Научная разработка и проведение испытаний какого-либо медицинского препарата требуют больших вложений, но затем при высокой рыночной цене его себестоимость будет достаточно низкой.

В настоящее время компании, связанные с биотехнологией и медициной, начинают выдвигаться на ведущие позиции в рейтингах по различным приоритетам. Так, журнал Fortune опубликовал ежегодный рейтинг 100 лучших компаний-работодателей. Лучшим местом работы в США признана компания Google. На втором месте - биотехнологическая компания Genetech. В рейтинге, проводимом компанией «Делойт», по показателям наиболее быстрого роста названы фирмы Anistoma и Biotage, занимающиеся разработкой биотехнологических препаратов для лечения онкологических заболеваний, генетическим анализом и медико-техническими исследованиями, заняли среди стран Европы 3-е и 4-е места, показав рост за 2005 г. на 20 и 13 % соответственно. В США, являющихся лидером в области современной биотехнологии, для проведения фундаментальных и прикладных исследований было образовано много специализированных биотехнологических фирм, которые, привлекая частный и государственный капитал и лучшие научные кадры, в считанные годы разработали и запатентовали способы получения многих белковых продуктов медицинского назначения. К таким фирмам относятся в первую очередь Genentech, Biogen, Amgen, Genetic Institute, Cetus, Immunex и ряд других.

Примерно в это же время к финансированию в области современной биотехнологии подключились и крупные транснациональные компании, приобретая акции или лицензии на готовые продукты, а впоследствии создавая собственные исследовательские подразделения. Эти фирмы сыграли решающую роль в промышленном внедрении первых генно-инженерных медицинских препаратов, таких как инсулин, гормон роста человека, интерферон, эритропоэтин, тканевой активатор плазминогена, вакцина против гепатита В и др.

Например, фирма Genentech имеет различные лицензионные соглашения и соглашения о сотрудничестве с Ely Lilly (США), Hoffmann-La Roche (Швейцария), Takeda, Daiichy Seiyaku, Toray и Fujisawa (Япония), Boeringer Ingelheim, Gruenthal (Германия), Kabi Vitrum (Швеция).

По данным исследовательской компании Abercade, основными сегментами рынка биотехнологических продуктов в РФ являются фармацевтика (66 %), препараты для сельского хозяйства (18 %), дрожжи (9 %) при весьма низких (порядка 1 %) уровнях остальных продуктов.



Рис. 1.1. Долевой анализ рынка биотехнологии РФ (по данным исследовательской компании Abercade, источник - <http://www.abercade.ru/>)

Основную долю самого развитого рынка фармацевтических препаратов в РФ (порядка 450 млн дол. США) в настоящее время занимает импортная продукция - это преимущественно инсулины, вакцины, сыворотки. Доля отечественной фармацевтической продукции в совокупном объеме составляет только 60,6 млн дол. США.

Более перспективным выглядит рынок отечественной промышленной биотехнологии, в основном это производство ферментов и средств защиты растений. Объемы продаж ферментных препаратов отечественного производства составляет порядка 12,3 млн дол. США, это 38 % от общего объема этого сегмента рынка. На рынке биотехнологических препаратов для защиты окружающей среды доминирует отечественное производство продукции в размере 8 млн дол. США, а доля импортной продукции (бактериальные препараты для ликвидации нефтяных загрязнений, биосорбенты для очистки воды и донных отложений от нефтепродуктов) составляет только 800 тыс. дол. США. Объемы отечественного производства дрожжей составляют 58 млн дол. США, импорт этого вида биотехнологического продукта - в 3,5 раза меньше.

Направления более наукоемких новейших биотехнологий, базирующихся на достижениях генетической инженерии, в России, к сожалению, только вступают в фазу своего развития. Так, на рынке генетически модифицированных культур, которые занимают в мире площадь 8,1 млн га и их продажи ежегодно растут на 20 %, Россия пока не представлена.

Примерно в это же время к финансированию в области современной биотехнологии подключились и крупные транснациональные компании, приобретая акции или лицензии на готовые продукты, а впоследствии создавая собственные исследовательские подразделения. Эти фирмы сыграли решающую роль в промышленном внедрении первых генно-инженерных медицинских препаратов, таких как инсулин, гормон роста человека, интерферон, эритропоэтин, тканевой активатор плазминогена, вакцина против гепатита В и др.

Например, фирма Genentech имеет различные лицензионные соглашения и соглашения о сотрудничестве с Ely Lilly (США), Hoffmann-La Roche (Швейцария), Takeda, Daiichy Seiyaku, Toray и Fujisawa (Япония), Boeringer Ingelheim, Gruenthal (Германия), Kabi Vitrum (Швеция).

Примерно в это же время к финансированию в области современной биотехнологии подключились и крупные транснациональные компании, приобретая акции или лицензии на готовые продукты, а впоследствии создавая собственные исследовательские подразделения. Эти фирмы сыграли решающую роль в промышленном внедрении первых генно-инженерных медицинских препаратов, таких как инсулин, гормон роста человека, интерферон, эритропоэтин, тканевой активатор плазминогена, вакцина против гепатита В и др.

Например, фирма Genentech имеет различные лицензионные соглашения и соглашения о сотрудничестве с Ely Lilly (США), Hoffmann-La Roche (Швейцария), Takeda, Daiichy Seiyaku, Toray и Fujisawa (Япония), Boeringer Ingelheim, Gruenthal (Германия), Kabi Vitrum (Швеция).

Благодарю за внимание!



AN