

Биотехнологии лекарственных средств

Содержание

Введение

Актуальность

Цели и задачи

Биотехнология лекарственных средств

Биотехнология интерферонов

Биотехнология антибиотиков

Выводы

Список литературы

Актуальность

Конец XX и начало XXI века характеризуется значительными успехами в области биотехнологии, являющийся междисциплинарным научным направлением, базирующимся на достижениях микробиологии, биохимии, молекулярной биологии, биофизики, иммунологии, генетики, биоорганической химии, инженерных наук.

Биотехнология является одной из самых наукоемких, перспективных и экономическом плане высокорентабельных отраслей производства. Мировой рынок биотехнологической продукции составляет около 150 млрд. долларов в год и постоянно растет.

Интенсивное развитие биотехнологии определили прогресс в развитии мировой фармации и создании высокоэффективных иммунобиологических препаратов.

Биотехнология — это направленное использование биологических объектов, систем или процессов для производства различных типов ценных продуктов.

Биотехнология на сегодня одна из самых развиваемых наук в результате успехов и быстрого прогресса исследований в области молекулярной биологии, основополагающими из которых были:

А) расшифровка генетического кода, являющегося универсальным для всех организмов

Б) расшифровка структуры ДНК, изучение ее функций в сохранении и передаче наследственной информации, а также способности ДНК организовываться в гены

В) получение данных о ферментах рестрикции (разрушение цепочки чужеродной ДНК, осуществляемый специальным ферментом — эндонуклеазой рестрикции) осуществляющих расщепление углеводно-фосфатной цепи нуклеотидов в ДНК

Г) получение рекомбинантных плазмид — генетических элементов, измененных методами генной инженерии, содержащих сегменты ДНК других организмов и способных к длительному автономному существованию и репликации

Д) разработка технологий рекомбинантных ДНК, т.е. молекул ДНК полученных объединением *in vitro* разнородных, вместе нигде не существующих фрагментов ДНК

Е) получение трансгенных животных (мышь, овца) на основе включения методами генной инженерии чужеродного генетического материала в организм.

Связь биотехнологии с другими науками



Цели

Учитывая актуальность данного направления мной была поставлена цель изучить особенности получения лекарственных средств с помощью биотехнологий

Задачи

Для достижения поставленной цели поставлены следующие задачи:

1. Ознакомиться с историей развития биотехнологии;
2. Ознакомиться с задачами биотехнологии;
3. Рассмотреть объекты биотехнологии;
4. Изучить процесс получения лекарственных препаратов с помощью биотехнологий на примере получения интерферонов и антибиотиков.

История развития биотехнологии

Биотехнология появилась еще в древности. Она включает в себя процессы пивоварения, хлебопечения, виноделия, производства сыра. Фундамент биотехнологий заложил еще Луи Пастер, тогда начался научный период развития биотехнологии. Были разработаны стерильные процессы производства ацетона, глицерина путем ферментации. Заложены основы вакцинологии. После открытия Александром Флемингом пенициллина разрабатываются процессы и аппараты для глубинного культивирования продуцентов, что резко удешевило производство данного антибиотика, и он стал доступным для широкого использования в клинической практике во время второй войны. После войны быстрыми темпами развивались процессы ферментации для производства антибиотиков, стероидных гормонов. Следующий этап развития биотехнологии связан с развитием генетики. Так в 1973 г. Коэн и Бойер получили рекомбинантные плазмиды и произвели трансформации клеток кишечной палочки. В течении 4 лет после открытия рекомбинантных ДНК – технологий появились штаммы бактерий продуцирующих инсулин и человеческий гормон роста. Во многих странах мира приняты национальные программы по биотехнологии.

Задачи биотехнологии

Биотехнология имеет своей целью создание и практическое использование:

- 1) новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов, используемых в здравоохранении для диагностики, профилактики и лечения и заболеваний (интерферонов, инсулина, гормонов роста человека, антител, вакцин)
- 2) регуляторов роста растений, бактериальных удобрений, микробиологических средств защиты растений от болезней и вредителей, полученных методом генетической и клеточной инженерии
- 3) ценных кормовых добавок для повышения продуктивности с/х животных
- 4) новых технологий создания и получения ценных продуктов для использования их в пищевой, химической, микробиологической, фармацевтической и других отраслях промышленности
- 5) эффективных технологий переработки с/х промышленных и бытовых отходов для получения продуктов, которые могут использоваться в других отраслях хозяйственной деятельности человека, например, биогазов, топлива для автомобилей.

Объекты современной биотехнологии



Направления в биотехнологии

К основным разделам и направлениям биотехнологии относят:

- 1) медицинская биотехнология
- 2) иммунобиотехнология
- 3) инженерная энзимология
- 4) биоэнерготехнология
- 5) генетическая инженерия
- 6) экологическая биотехнология
- 7) сельскохозяйственная биотехнология
- 8) промышленная биотехнология

Обобщенные стадии биотехнологических производств

Биотехнология состоит из стадий, в каждой из которых сырье претерпевает определенные технологические воздействия и последовательно превращается во все более сложные полупродукты, и наконец, в конечный продукт.

- 1.) Подготовительные стадии
- 2.) Биотехнологические стадии
- 3.) Разделение жидкости и биомассы
- 4.) Выделение продуктов биосинтеза (внеклеточных и внутриклеточных)
- 5.) Очистка продукта
- 6.) Концентрирование продукта
- 7.) Изготовление готовой формы продукта

Препараты, получаемые биотехнологическим путем

Наиболее широко применяются в медицине следующие препараты, получаемые биотехнологическим путем:

- 1) вакцины
- 2) антибиотики
- 3) витамины
- 4) интерфероны
- 5) иммунодепрессанты
- 6) стероидные гормоны
- 7) кровезаменители
- 8) медицинские ферменты
- 9) медицинские аминотоксины
- 10) подсластители
- 11) биоразлагаемые полимеры
- 12) нейропептиды
- 13) косметические токсины

Преимущество биотехнологии над традиционным способом

- 1) Клетки являются своего рода биофабриками белков, жиров, углеводов, витаминов, аминокислот, нуклеиновых кислот, антибиотиков, гормонов, антител, ферментов, спиртов.
- 2) Клетки чрезвычайно быстро воспроизводятся (бактерии - за 20-60мин, дрожжи 1,5-2 часа, тогда как животная клетка - 24 часа.
- 3) Биосинтез сложных веществ, таких как белки, антибиотики, антигены, антитела и др., значительно экономичнее и технологически доступнее, чем химический синтез.
- 4) Для биосинтеза используются отходы с/х, рыбной продукции, пищевой промышленности.
- 5) Возможность проведения биотехнологического процесса в промышленных масштабах.

Характеристика интерферонов

Хотелось бы остановить внимание на производстве интерферонов.

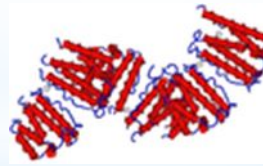
В 1957г. Айзекс и Линдеман обнаружили, что клетки животных, инфицированных вирусами, выделяют в сферу фактор, который способен вызывать у гентактных (не обработанных вирусом) клеток устойчивость у вирусной инфекции. Этот фактор был назван интерфероном.

Интерфероны — общее название, под которым в настоящее время объединяют ряд белков со сходными свойствами, выделяемых клетками организма в ответ на вторжение вируса. Благодаря интерферонам клетки становятся невосприимчивыми по отношению к вирусу.

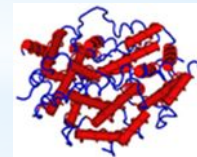
Наиболее изученным свойством интерферона является его способность препятствовать размножению вирусов. При заражении клетки вирус начинает размножаться. Клетка-хозяин одновременно с этим начинает продукцию интерферона, который выходит из клетки и вступает в контакт с соседними клетками. Хотя интерферон не обладает прямым противовирусным действием, он способен вызывать такие изменения в клетках, которые препятствуют размножению вируса, формированию вирусных частиц и дальнейшему его распространению.

Классификация человеческого интерферона:

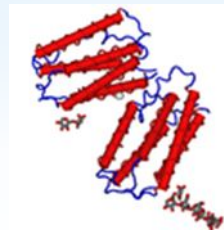
1) Человеческий интерферон- α



2) Человеческий интерферон- β



3) Человеческий интерферон- γ



Классы интерферонов

1) Лейкоцитарный или α -IFN-получают в культуре лейкоцитов выделенных из крови доноров. Различают 20 рекомбинантных вариантов, отличающихся последовательностью аминокислот в полепептидной цепи и биологической активностью.

2) Фибробластный или β -IFN-для получения используют культуру фибробластов.

3) Иммунный или γ -IFN - его синтезируют сенсебилизированные Т-лимфоциты при повторном контакте с митогенами, а также с бактериальными и вирусными антигенами.

Все три класса интерферонов обладают различными физико-химическими свойствами и отличаются друг от друга серологически.

Способы получения интерферона

В настоящее время более перспективным признан способ получения интерферона микробиологическим синтезом, который обеспечивает возможность получения целевого продукта со значительно более высоким выходом из сравнительно недорогого исходного сырья.

В качестве исходных микроорганизмов используют различные конструкции штаммов *Pichia pastoris*, *Pseudomonas putida* и *Escherichia coli*.

Наряду с особенностями используемых штаммов эффективность процесса во многом зависит от используемой технологии выделения и очистки интерферона.

Недостатком использования *P. pastoris* в качестве продуцента интерферона, является крайне сложные условия ферментации этого типа дрожжей, необходимость строго поддерживать концентрацию индуктора, в частности метанола, в процессе биосинтеза.

Недостатком использования штаммов *Ps. putida* является сложность процесса ферментации при низком уровне экспрессии (10 мг интерферона на 1 л культуральной среды).

Более продуктивным является использование штаммов *Escherichia coli*.

Для получения больших количеств интерферона используют культивированные лейкоциты крови человека, зараженные вирусом. Экзогенный человеческий интерферон получают, используя технологию рекомбинантных ДНК.

Процедура выделения кДНК интерферонов состоит в следующем: из лейкоцитов человека выделяют мРНК, фракционируют, проводят обратную транскрипцию и встраивают в сайт модифицированной плазмиды. Полученным продуктом трансформируют *Escherichia Coli*. Полученные клоны подразделяют на группы и идентифицируют, подвергают гибридизации. Из их образовавшихся гибридов, содержащих кДНК и кРНК, выделяют мНРНК, и проводят ее трансляцию в системе синтеза белка.

Основным недостатком этого способа получения интерферонов являются вероятность контаминации конечного продукта вирусами человека, такими как вирус гепатитов В и С, вируса иммунодефицита и др.

Биотехнология производства IFN

Этапы на примере получения α -IFN

1. Суспензию лейкоцитарных клеток, выделенных из крови доноров, обрабатывают вирусом, оказывающим индуцирующий эффект на биосинтез IFN (н-р, вирусом Сендай).
2. Из лейкоцитов получают и-РНК, которая программирует биосинтез интерферона, при этом концентрация и-РНК в индуцированных лейкоцитах не более 0,1%.
3. С помощью фермента обратной транскриптазы (ревертазы) на полипептидной основе и-РНК синтезируют комплементарную ей одноцепочечную копию ДНК.
4. Эукариотический ген в условии *in vitro* перестраивают, удаляя рестриктазой ту часть нуклеотидов, которая кодирует ненужную информацию.
5. Созданный ген переносят в плазмиду, где он совмещается с бактериальным промотором, а затем вводится в бактериальную клетку-хозяин.

Другие способы получения интерферонов

1. Возможен синтез химическим путем β и α - интерферона
2. Повышение биосинтеза интерферона возможно при введении в эукариотическую дрожжевую клетку вектора, на основе которого сконструирована рекомбинантная молекула ДНК с ионами β и α -интерферонов
3. Производство интерферонов с применением моноклональных антител к соответствующему интерферонов.

Классификация интерферонов

Разработка методов получения лейкоцитарного и рекомбинантного интерферона в препаративных количествах, а также высокоэффективных методов их очистки открыла возможность применения этих препаратов в лечении вирусных гепатитов. В настоящее время как в России, так и за рубежом выпускаются коммерческие препараты: человеческий лейкоцитарный, лимфобластный «Велферон» (Wellferon), фибробластный (Ферон); интерферон и интерфероны, полученные генно-инженерными методами: рекомбинантные альфа- (Лаферобион, Роферон, Реальдирон, Виферон, Гриппферон и другие), бета- и гамма-интерферон (Гаммаферон).

Характеристика антибиотиков

Антибиотики - самый большой класс фармацевтических препаратов, которые синтезируются микроорганизмами. Некоторые из антибиотиков используют в сельском хозяйстве против различных сельскохозяйственных вредителей (например, полиоксин, баридакицин, косгалицин), другие - в медицинских целях (пенициллины, тетрациклины, цефалоспорин С и др.).

Антибиотики - специфические продукты жизнедеятельности различных групп микроорганизмов, низших и высших растений и микроорганизмов, обладающие высокой биологической активностью в отношении определенных групп микроорганизмов или злокачественных опухолей и избирательно вызывающие их гибель или угнетающие рост.

История антибиотиков

Народной медицине давно были известны некоторые способы применения в качестве лечебных средств микроорганизмов или продуктов их обмена, однако причина их лечебного действия в то время оставалась неизвестной. Например, для лечения некоторых язв, кишечных расстройств и других заболеваний в народной медицине применялся заплесневевший хлеб.

Первые сведения об антагонизме бактерий были обнародованы основоположником микробиологии Луи Пастером в 1877 г. Он обратил внимание на подавление развития возбудителя сибирской язвы некоторыми сапрофитными бактериями и высказал мысль о возможности практического использования этого явления.

Русский врач Э. Гартье (1905) применил кисломолочные продукты, приготовленные на заквасках, содержащих ацидофильную палочку, для лечения кишечных расстройств.

В конце XIX — начале XX в. были открыты антагонистические свойства у спорообразующих бактерий. К этому же периоду относятся первые работы, в которых описываются антагонистические свойства у актиномицетов. Позднее из культуры почвенной спороносной палочки *Bacillus brevis* Р. Дюбо (1939) удалось выделить антибиотическое вещество, названное тиротрицином, которое представляло собой смесь двух антибиотиков — тироцидина и грамицидина

В 1939 г. Н. А. Красильников и А. И. Коренько из культуры фиолетового актиномицета *Actinomyces violaceus*, выделенного ими из почвы, получили первый антибиотик актиномицетного происхождения — мицетин — и изучили условия биосинтеза и применения мицетина в клинике.

А. Флеминг, изучая стрептококков, выращивал их на питательной среде в чашках Петри. На одной из чашек вместе со стафилококками выросла колония плесневого гриба, вокруг которой стафилококки не развивались. Заинтересовавшись этим явлением, Флеминг выделил культуру гриба, определенную затем как *Penicillium notatum*. Выделить вещество, подавляющее рост стафилококков, удалось только в 1940 г. оксфордской группе исследователей. Полученный антибиотик был назван пенициллином.

С открытия пенициллина началась новая эра в лечении инфекционных болезней — эра применения антибиотиков. В короткий срок возникла и развилась новая отрасль промышленности, производящая антибиотики в крупных масштабах. Теперь вопросы микробного антагонизма приобрели важное практическое значение и работы по выявлению новых микроорганизмов — продуцентов антибиотиков стали носить целенаправленный характер.

В настоящее время число известных антибиотиков приближается к 2000, однако в клинической практике используется всего около 50.

Классификация антибиотиков

Пенициллины – это группа антибиотиков, которая включает следующие лекарственные средства: Амоксициллин, Ампициллин, Оксациллин, Пенициллин, Аугментин, Карбенициллин, Азлоциллин и др.

Цефалоспорины - это большая группа антибиотиков, которая включает 5 поколений лекарственных средств:

- * Цефалоспорины 1 поколения: Цефазолин, Цефалексин (Лексин).
- * Цефалоспорины 2 поколения: Цефахлор, Цефуроксим (Зинацеф), Цефокситин и др
- * Цефалоспорины 3 поколения: Цефексим, Цефотаксим, Цефтриаксон, и др.
- * Цефалоспорины 4 поколения: Цефепим
- * Цефалоспорины 5 поколения: Цефтобипрол

Макролиды – это антибиотики , включающие следующие лекарственные средства: Азитромицин (Сумамед), Эритромицин, Кларитромицин (Клацид), Ровамицин и др.

Тетрациклины включают следующие лекарственные средства: Доксициклин, Тетрациклин, Юнидокс, Миноциклин и др.

К аминогликозидам относят: Гентамицин, Неомицин, Канамицин, Амикацин и др

Сульфаниламиды - это антибактериальные средства, к которым относят Стрептоцид, Бисептол, Триметоприм, Сульфален и др

Фторхинолоны – это группа антибактериальных средств, в которую входят: Ципрофлоксацин, Левофлоксацин, Моксифлоксацин, Норфлоксацин, Офлоксацин и др.

Действие антибиотиков

1) Механизмы биологического действия[править | править исходный текст]

2) Нарушение синтеза клеточной стенки посредством ингибирования синтеза пептидогликана (пенициллин, цефалоспорин, монобактамы), образования димеров и их переноса к растущим цепям пептидогликана (ванкомицин, флавомицин) или синтеза хитина (никкомицин, туникамицин). Антибиотики, действующие по подобному механизму обладают бактерицидным действием, не убивают покоящиеся клетки и клетки, лишенные клеточной стенки (L-формы бактерий).

3) Нарушение функционирования мембран: нарушение целостности мембраны, образование ионных каналов, связывание ионов в комплексы, растворимые в липидах, и их транспортировка. Подобным образом действуют нистатин, грамицидины, полимиксины.

4) Подавление синтеза нуклеиновых кислот: связывание с ДНК и препятствование продвижению РНК-полимеразы (актидин), сшивание цепей ДНК, что вызывает невозможность её расплетания (рубомидин), ингибирование ферментов.

5) Нарушение синтеза пуринов и пиримидинов (азасерин, саркомицин).

6) Нарушение синтеза белка: ингибирование активации и переноса аминокислот, функций рибосом (стрептомицин, тетрациклин, пурамицин).

7) Ингибирование работы дыхательных ферментов (антимидины, олигомицины, ауровертин).

Производство антибиотиков

Так как у микроорганизмов-продуцентов способность образовывать антибиотики возникает только в неблагоприятных ситуациях (при истощении окружающей среды, при стрессовых ситуациях), а химическим способом получить очень сложно. То антибиотики производят путем направленного биосинтеза, полусинтетическим способом.

Максимально высокую активность штамма-продуцента способна обеспечить технология рекомбинантных ДНК, так как можно создавать новые антибиотики с уникальной структурой, оказывающие более мощное воздействие на отдельные микроорганизмы и обладающие минимальными побочными эффектами.

Существует 3 способа получения антибиотиков.

1 Биологический синтез. Для получения антибиотиков этим способом используют штаммы микроорганизмов, образующие наибольшее количество антибиотика.

2 Химический синтез. С помощью этого метода получают основные синтетические антибиотики.

3 Комбинированный способ. представляет собой сочетание двух предыдущих способов: из полученного в результате биологического синтеза антибиотика выделяют так называемое ядро (6-аминопенициллановую кислоту из пенициллина) и химическим путём добавляют к нему различные радикалы. Антибиотики, полученные комбинированным способом, называются полусинтетическими, к которым более длительное время чувствительны микроорганизмы, устойчивые к природным антибиотикам. Комбинированный способ – наиболее экономически выгодный метод производства антибиотиков.

Стадии промышленного биотехнологического производства антибиотиков

1) подготовка питательной среды: в технологии получения антибиотиков применяют твердые питательные среды – агаризованные или сыпучие субстраты (пшено, ячмень, пшеничные отруби и т.п.) и жидкие питательные среды.

2) подготовка посевного материала.

3) Ферментация: для получения антибиотиков используют методы поверхностного и глубинного культивирования. В ходе ферментации культура непрерывно аэрируется стерильным подогретым воздухом. Процесс ферментации осуществляется в строго стерильной глубинной аэробной периодической культуре, носит выраженный двухфазный характер.

4) Выделение антибиотиков. Локализация антибиотика, сфера его применения определяют специфику приемов постферментационной стадии. Если антибиотик находится в клетках, на первом этапе обработки биомассу выделяют из культуральной жидкости; после разрушения клеток антибиотик экстрагируют и переводят в растворимую фазу. Затем данный раствор и культуральные среды подвергают разным методам экстракции, разделения, очистки и концентрирования для получения готового продукта. Цель всех процедур постферментационной стадии – получение стерильных препаратов высокой степени чистоты.

5) Очистка антибиотиков. Данная стадия технологического процесса включает в себя: осаждение, сорбцию, сушку. При обезвоживании препаратов антибиотиков в зависимости от свойств используют лиофильную или распылительную сушку. Затем препарат фасуют в стерильные флаконы с соблюдением условий, гарантирующих стерильность.

6) Получение готового продукта: т.к. биосинтез антибиотиков ведется в асептических условиях, то при выделении, очистке и получении ЛФ также соблюдаются максимально возможные предосторожности против контаминации.

Условия синтеза антибиотиков:

1) Стерильность. Отсутствие посторонней микрофлоры при культивировании продуцентов антибиотиков – важнейший фактор биотехнологического процесса. Для обеспечения стерильности процесса вся аппаратура и коммуникации герметизируются, стерилизуются и держаться под давлением. Питательная среда и воздух для аэрации также стерилизуются. Засев ферментера, отбор проб на анализ проводится в асептических условиях.

2) Питательная среда. Условия синтеза антибиотиков заключаются в том, что в питательной среде должны присутствовать источники азота, углерода, фосфора, предшественники антибиотиков и витамины.

3) pH. Для бактерий pH питательной среды составляет 7, для грибов – 4,5–5, для актиномицетов – 6,7–7,5. Для большинства известных антибиотиков оптимальная величина pH близка к нейтральной. При значительном закислении или защелачивании среды процесс биосинтеза тормозится. Для регулирования pH в питательные среды для получения антибиотиков часто добавляют некоторое количество мела, который вступает в реакцию с возникающими в ходе процесса метаболизма кислотами, образуя при этом нейтральные соли и углекислый газ, впоследствии удаляемый из среды.

4) Температура. Для биосинтеза антибиотика требуется определенная температура: для биосинтеза пенициллина грибом рода пеницилиум оптимальной температурой является 25–26 °С, в то время как при образовании антибиотиков актиномицетами обычно поддерживают более высокую температуру 27–29 °С.

5) Перемешивание и аэрация: т.к. продуценты антибиотиков являются аэробами, следовательно, требуется создать при их синтезе хорошую аэрацию. Кислород необходим для биосинтеза ряда антибиотиков, т.к. последний расходуется при замыкании β -лактамного и тиазолидинового колец во время биосинтеза β -лактамной структуры. В целом потребность в кислороде зависит от концентрации биомассы и ее метаболической активности. Назначение аэрации и перемешивания – снабжение культуры кислородом, но одновременно они способствуют поддержанию мицелия во взвешенном состоянии и выравниванию концентрации питательных веществ и продуктов обмена в культуральной жидкости.

б) Вспенивание. Питательные среды, применяемые при получении антибиотиков, содержат вещества, способные образовывать весьма стойкие пены. Аэрация и перемешивание среды вызывают образование слоя пены на поверхности жидкости, что ухудшает условия развития продуцента. В связи с интенсивным пенообразованием, сопровождающим процесс синтеза антибиотиков, в состав среды вводят пеногасители (растительные и животные жиры, минеральные масла, ПАВ).

Выводы

Сегодня на биотехнологию, как на очень молодую науку, возлагаются надежды на разработку новых препаратов. Поэтому от этой науки ожидается производство препаратов, лечащих различные заболевания.

На данном этапе развития биотехнология, как науки в целом, дала человечеству огромное количество лекарственных препаратов, направленных на профилактику и лечение заболеваний не только человека, но и сельскохозяйственных животных и растений. Так же биотехнология помогает человечеству бороться с болезнями укреплением иммунитета с помощью интерферонов и различных вакцин.

Список литературы

- 1) Информационный блок для провизоров – интернов, обучающихся дистанционным способом. Казьянин А.М., Николаева А.М., Молохова Е.И., Решетников В.И. 2012год. Стр 67 – 75, 77,78.
- 2)http://ru.wikipedia.org/wiki/Интерферон#.D0.98.D0.BD.D1.82.D0.B5.D1.80.D1.84.D0.B5.D1.80.D0.BE.D0.BD_.D0.B2_.D0.B1.D0.B8.D0.BE.D1.82.D0.B5.D1.85.D0.BD.D0.BE.D0.BB.D0.BE.D0.B3.D0.B8.D0.B8
- 3)
<http://veterinarua.ru/leksii/440-biotekhnologiya-proizvodstva-interferona.html>
- 4) http://dic.academic.ru/dic.nsf/enc_biology/1346/Из
- 5) <http://www.polismed.ru/antibiotics-post001.html>
- 6)http://ru.wikipedia.org/wiki/Антибиотики#.D0.94.D0.B5.D0.B9.D1.81.D1.82.D0.B2.D0.B8.D0.B5_.D0.B0.D0.BD.D1.82.D0.B8.D0.B1.D0.B8.D0.BE.D1.82.D0.B8.D0.BA.D0.BE.D0.B2