

Занятие семинарского типа № 5

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Перспективы получения белковых и витаминных препаратов с помощью методов современной биотехнологии

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

Классификация продуктов биотехнологических производств

Биотехнологические производства основаны на использовании жизнедеятельности микроорганизмов. Для того, чтобы управлять микробиологическим процессом, необходимо знать физиологию культур микроорганизмов. Это позволит контролировать процессы, протекающие в клетке, условия культивирования и влияние основных факторов окружающей среды на направленный биосинтез биологически активных веществ.

По отношению к процессам роста низкомолекулярные продукты метаболизма живых клеток классифицируют на первичные и вторичные метаболиты.

Первичные метаболиты представляют собой низкомолекулярные соединения (мол. м. менее 1500 Да), необходимые для роста и развития микроорганизмов.

Одни из них являются строительными блоками макромолекул, другие участвуют в биосинтезе коферментов. Среди наиболее важных для промышленности первичных метаболитов выделяют: аминокислоты, органические кислоты, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, растворители и витамины.

Первичные метаболиты, как правило, накапливаются в логарифмической фазе роста микроорганизмов. Первичные метаболиты синтезируются природными микроорганизмами в количествах, необходимых лишь для удовлетворения их потребностей. В этой связи, задача промышленной биотехнологии состоит в создании мутантных форм микроорганизмов – сверхпродуцентов первичных метаболитов.

Вторичные метаболиты – это низкомолекулярные соединения, не требующиеся для роста в чистой культуре. К ним относятся: антибиотики, алкалоиды, гормоны роста растений, токсины и др.

Механизмы регуляции биосинтеза первичных метаболитов

Микробные клетки, как и клетки других живых организмов, не производят избыточного количества первичных метаболитов, что было бы расточительно и уменьшало их способность к выживанию. Хотя созданы и создаются штаммы с нарушением регуляции биосинтеза данных метаболитов, которые и являются основой для биотехнологических производств.

Одним из важнейших путей интенсификации биотехнологического получения первичных метаболитов является совершенствование применяемого биологического объекта.

Основными путями нарушения регуляции обменных процессов, протекающих в клетке, являются: изменения генетической программы организма и нарушения регуляторных систем организма.

Спонтанные изменения генетической природы продуцента основаны на рекомбинации генетического материала в условиях *in vivo*. Для выделения из природных популяций высокопродуктивных штаммов микроорганизмов применяют методы селекции.

Методы слепого многоступенчатого отбора случайных мутаций очень длительны. Для возникновения мутаций нужный ген должен удвоиться 10^6 – 10^8 раз. В этой связи, более эффективен метод искусственного повреждения генома, к которому, в частности, относится индуцированный мутагенез. Несмотря на трудоемкость, в настоящее время методы селекции не утратили своей актуальности для создания высокопродуктивных штаммов продуцентов биологически активных веществ.

Достижения в области молекулярной биологии и генетики позволили биотехнологам, начиная с 70-х гг. XX в. перейти от слепого отбора штаммов мутантов к сознательному конструированию геномов, применяя технологию рекомбинантных ДНК (рДНК).

Каждое из веществ образуется в клетке в строго необходимом для ее роста и развития количестве в результате ферментативных реакций. Координация химических превращений, обеспечивающая экономичность метаболизма, осуществляется у микроорганизмов в соответствии с тремя основными механизмами:

- ✓ регуляция активности ферментов, в том числе и путем ретроингибирования;
- ✓ регуляция объема синтеза ферментов (индукция и репрессия биосинтеза ферментов);
- ✓ катаболитная репрессия.

В процессе ретроингибирования (ингибирование по принципу обратной связи) активность фермента, стоящего в начале многоступенчатого превращения субстрата, тормозится конечным метаболитом. Таким путем низкомолекулярные метаболиты передают информацию об уровне своей концентрации и состоянии обмена веществ ключевым ферментам метаболизма. С помощью данного механизма конечные продукты саморегулируют свой биосинтез.

Ретроингибирование представляет собой способ точного и быстрого регулирования образования продукта.

Кроме того, на обмен веществ, аналогичный конечным метаболитам, оказывают эффект и их аналоги.

Среди многих тысяч ферментов, присущих микроорганизмам, одни (ферменты гликолиза) синтезируются постоянно и их образование не зависит

от состава среды (конститутивные ферменты), а другие ферменты (адаптивные или индуцибельные) возникают только в ответ на появление в среде индукторов (субстратов или их структурных аналогов).

Регуляция объема биосинтеза ферментов осуществляется на оперонном уровне путем изменения количества иРНК, образующихся в процессе транскрипции.

В процессе индукции низкомолекулярный метаболит-индуктор, соединяясь с репрессорным белком (продукт гена-регулятора), инактивирует его и препятствует взаимодействию белка-репрессора с зоной оператора, что обеспечивает возможность присоединения к промотору РНК-полимеразы и, следовательно, начало биосинтеза.

Изучение механизмов регуляции новообразования ряда аминокислот у микроорганизмов показало, что конечные продукты метаболических путей не только ингибируют активность ферментов первых стадий процесса, но и тормозят биосинтез ферментов последних стадий, т.е. помимо аминокислот у микроорганизмов регулируется новообразование многих первичных метаболитов. Обнаруженный феномен назван репрессией, а ферменты, биосинтез которых тормозится под влиянием низкомолекулярных метаболитов, переводящих репрессорный белок в активную форму, способную оккупировать зону первоначального связывания РНК-полимеразы (оператор), называется репрессибельным (глутаминсинтетаза, триптофансинтетаза, уреазы и др.).

Проведенные исследования продемонстрировали, что репрессия биосинтеза ферментов обеспечивает более грубую, в сравнении с ретроингибированием, регуляцию образования анаболических ферментов.

В случае, если концентрация конечного продукта уменьшается до определенного очень низкого уровня, то происходит депрессия фермента, т.е. скорость его биосинтеза возрастает до необходимой величины.

Бактериальные клетки продуцируют большое разнообразие низкомолекулярных эффекторов в ответ на изменение факторов окружающей среды, каждый из которых, взаимодействуя по аллостерическому механизму с определенными регуляторными белками, моделирует промоторную специфичность РНК-полимеразы, запуская, экспрессию определенного набора генов. В этой связи, ведущими механизмами, обеспечивающими экономичность образования продукта в клетках микроорганизмов, является ретроингибирование и репрессия, базирующиеся на принципе обратной связи.

Если в среде присутствуют несколько разных источников углерода, клетка вырабатывает ферменты для усвоения, лишь одного, наиболее предпочтительного субстрата. Данное явление получило название катаболитной репрессии. Оно заключается в подавлении биосинтеза ферментов, обеспечивающих метаболизм одного источника углерода другим. Экспрессия ферментов регулируется белком-репрессором, пространственно удаленным от гена-оператора. Белок-репрессор, будучи присоединен к гену-оператору, препятствует транскрипции структурных генов.

Характеристика витаминов

Витамины (лат. *vita* – жизнь) – это группа низкомолекулярных органических соединений относительно простого строения и разнообразной химической природы.

Витамины участвуют во множестве биохимических реакций, выполняя каталитическую функцию в составе активных центров большого числа разных ферментов, или выступая информационными регуляторными посредниками, выполняя сигнальные функции экзогенных прогормонов и гормонов. При этом они не являются для организма поставщиком энергии.

Витаминам отводится важнейшая роль в обмене веществ. Концентрация витаминов в тканях и суточная потребность в них невелики, но при их недостаточном поступлении в организм наступают характерные и опасные патологические изменения. Большинство витаминов не синтезируются в организме человека, поэтому они должны регулярно и в достаточном количестве поступать в организм с пищей или в виде витаминно-минеральных комплексов и пищевых добавок. Исключения составляют витамин К, достаточное количество которого в норме синтезируется в толстом кишечнике человека за счет деятельности бактерий, и витамин В₃, синтезируемый бактериями кишечника из триптофана.

С нарушением поступления витаминов в организм связаны три принципиальных патологических состояния:

- ✓ недостаток витамина – гиповитаминоз;
- ✓ отсутствие витамина – авитаминоз;
- ✓ избыток витамина – гипервитаминоз.

В настоящее время известно около полутора десятков витаминов. Исходя из растворимости, их классифицируют (табл. 1) на жирорастворимые (А, D, Е, К) и водорастворимые – все остальные (В, С и др.).

Жирорастворимые витамины накапливаются в организме, причем их депо являются жировая ткань и печень.

Таблица 1

Классификация витаминов

Буквенное обозначение	Химическое название	Активная форма витаминна	Лечебный эффект
<i>Водорастворимые витамины</i>			
В ₁	Тиамин	Тиаминпирофосфат (ТПФ), кокарюоксилаза, тиаминтрифосфат (ТТФ)	Антиневритный
В ₂	Рибофлавин	ФМН, ФАД	Витамин роста
В ₃	Пантотеновая кислота	КоА-SH, дефосфоКоА, 4-фосфопантетеин	Антидерматитный

В ₅ (РР)	Ниацин	НАД ⁺ , НАДФ ⁺	Антипеллагрический
В ₆	Пиридоксин	Пиридоксальфосфат, пиридоксаминофосфат	Антидерматитный
В ₁₂	Кобаламин	Метилкобаламин, дезоксиаденозинкобаламин	Антианемический
С	Аскорбиновая кислота	Аскорбиновая и дегидроаскорбиновая кислоты	Регулятор метаболических процессов, иммуностимулятор
<i>Жирорастворимые витамины</i>			
А	Ретинол	Ретинол/ ретиналь	Антиксерофтальмический
Д	Кальциферол	Эргокальциферол	Антирахитический
Е	Токоферол	α -, β -, γ -, δ -токоферолы, токотриенолы	Антиоксидантный
К	Филлохинон	Дифарнезилнафтохинон	Антигеморрагический

Водорастворимые витамины в больших количествах не депонируются и при избытке выводятся с водой. Это объясняет то, что гиповитаминозы довольно часто встречаются относительно водорастворимых витаминов, а гипервитаминозы чаще наблюдаются относительно жирорастворимых витаминов.

Представители жирорастворимых витаминов, выполняя функцию индукторов биосинтеза белков, проявляют сходство со стероидными гормонами. Все жирорастворимые витамины являются структурными компонентами клеточных мембран, проявляя антиоксидантное действие.

Широкое распространение полигиповитаминозов, снижение резистентности организма к болезнетворным микроорганизмам, сопровождающееся вредными экологическими факторами – все это повышает роль витаминов к профилактической и лечебной работе врачей, поэтому в экономически развитых странах стали реализовываться государственные программы искусственной витаминизации пищевых продуктов.

Способы получения витаминов

Производство витаминов осуществляется следующими способами:

✓ Экстракция витаминов из растительного и животного сырья. С этого направления начиналась витаминная промышленность. Так, витамин В₁₂ получали из сырой печени крупного рогатого скота, каротин – из моркови. Однако, в настоящее время количество витаминов, получаемых данным способом, незначительно в виду очень низкого их содержания в природном сырье и ограниченности сырьевых ресурсов.

✓ Химический синтез витаминов. Производство синтетических витаминов занимает ведущее место в современной витаминной промышленности, т.к. основная номенклатура витаминов представлена веществами, полученными химическим синтезом из химического сырья или сочетанием химического синтеза с биосинтезом. Однако, такой способ производства витаминов представляет собой сложный, многоступенчатый процесс, сопряженный со

значительными производственными затратами, что удорожает стоимость конечных продуктов.

✓ Биосинтез витаминов. Некоторые витамины, имеющие сложное строение, химический синтез которых в крупномасштабном производстве невозможен или экономически нецелесообразен, получают путем биосинтеза с помощью микроорганизмов, способных к сверхсинтезу и накоплению определенных витаминов. Микробиологический синтез применяется и в производстве витаминных концентратов, предназначенных для сельского хозяйства, поскольку в данном случае обычно витамины не выделяют в индивидуальном чистом виде.

Впрочем, следует отметить условность такой классификации основных способов получения витаминов. Так, производство некоторых витаминов (аскорбиновой кислоты) включает химические стадии и стадии биотрансформации. Витамин рибофлавин получают синтетическим и микробиологическим путями. Некоторые витамины (витамин D₂) получают путем химической модификации провитаминов или витаминов, выделенных из растительных клеток или органов животных.

Применение витаминов в качестве добавок в корма животных требует их крупномасштабного производства, поэтому возникла необходимость в разработке более доступных способов их получения. Таким способом оказался микробиологический синтез витаминов.

Микробиологическая промышленность России выпускает кормовые препараты витаминов B₂ и B₁₂. Кроме того, микробиологическим можно считать производство витамина D₂, образующегося из эргостерина при облучении УФ светом кормовых дрожжей.

Продукцию микроорганизмами отдельных витаминов можно увеличить, изменяя состав питательной среды. Так, количество витамина B₁₂ в биомассе дрожжей зависит от интенсивности аэрации и содержания железа в питательной среде. На содержание витаминов в клетках дрожжей заметное влияние оказывают микроэлементы. Так, небольшие добавки марганца способствуют накоплению в клетках дрожжей инозита, а повышенные дозы кобальта приводят к увеличению содержания витамина B₆.

Биотехнология витамина B₂

Витамин B₂ (рибофлавин) по химической природе представляет собой азотистое основание (6,7-диметилизоаллоксазин), соединенное с остатком спирта D-рибита. Он входит в структуру многих ферментов, в составе которых участвует в клеточном дыхании, биосинтезе белков и жиров, регулировании состояния нервной системы, функции печени.

Рибофлавин химически не устойчив, легко разрушается при кипячении и на свету. Он способен легко окисляться и восстанавливаться, что лежит в основе его биологического действия.

В₂-авитаминоз у человека сопровождается остановкой роста, выпадением волос, поражением слизистых оболочек, быстрой утомляемостью зрения, понижением работоспособности, нарушением нормального биосинтеза гемоглобина, патологическими изменениями в нервной системе.

Вплоть до 30-х гг. XX в. рибофлавин выделяли из природного сырья. В наибольшей концентрации он присутствует в моркови и печени трески. Так, из 1 т моркови можно изолировать лишь 1 г рибофлавина, а из 1 т печени – 6 г.

В 1935 г. обнаружен активный продуцент рибофлавина – *Eremothecium ashbyii*, способный при выращивании на 1 т питательной смеси синтезировать до 25 кг витамина.

Сверхсинтеза рибофлавина добиваются воздействием на дикие штаммы мутагенов, нарушающих механизм ретроингибирования биосинтеза витамина флавиновыми нуклеотидами, а также изменением состава культуральной среды. Отбор мутантов ведут по устойчивости к аналогу витамина В₂ – розеофлавинолу. Для получения витамина В₂ можно также использовать культуру дрожжей, ацетобутиловые бактерии, продуцент лизина *Brevibacterium* и др.

Технология получения кормового препарата витамина В₂ микробиологическим способом довольно проста. В качестве продуцента обычно используют *E. ashbyii*. Технологический процесс производства витамина включает 3 основные стадии:

1. аэробная ферментация;
2. термолиз и концентрирование;
3. сушка, размол, гранулирование и упаковка.

Посевной материал и стерильный воздух получают по типовой, для многих микробиологических производств, схеме.

Ферментация осуществляется в типовых биореакторах объемом 63–100 м³ в стерильных условиях при температуре 28–30 °С.

Основными ингредиентами питательной среды являются соевая мука, меласса, технический жир и минеральные соли (СаСО₃, КН₂РО₄ и др.).

Продуцент витамина В₂ также выращивают на средах, в которых источником углерода является глюкоза, сахароза, крахмал или пшеничная мука. В качестве источника азота используют молочную сыворотку, рыбную и кукурузную муку или экстракт, казеин. Развитие продуцента стимулируется добавлением ненасыщенных жирных кислот, биотина, тиамин, инозита, ростовых веществ, содержащихся в зародыше пшенице, картофельном соке и дрожжевом автолизате.

Культивирование продуцента витамина В₂ проводят поверхностным или глубинным способом. Витамин накапливается в клетках продуцента в виде предшественника – флавина дениннуклеотида или в свободном состоянии. Время культивирования составляет 60–80 ч до начала лизиса мицелия гриба и образования спор (определяется микроскопически). При этом содержание рибофлавина в культуральной жидкости достигает 1200 мг/л.

Для сохранения штамма *E. ashbyii* в активном состоянии рекомендуется производить его систематический рассев на плотные питательные среды и отбирать колонии, наиболее интенсивно окрашенные в оранжевый цвет. Яркая окраска колоний коррелирует с высокой способностью к биосинтезу рибофлавина.

В инокуляторе культуру выращивают в течение 21–26 ч, затем ее переводят в биореактор со средой, содержащей кукурузную и соевую муку, кукурузный экстракт, свекловичный сахар, K_2HPO_4 , CaCO_3 , NaCl и технический жир.

Среду стерилизуют в смесителе при температуре 120–122 °С в течение 1 ч. Культивирование в биореакторе ведут до начала лизиса клеток и появления спор. Температура культивирования составляет 28–30 °С, давление воздуха в биореакторе – $(1-2) \cdot 10^4$ Па, расход воздуха – 1,5–2,0 л в мин. на 1 л культуральной жидкости.

После окончания ферментации культуральную жидкость вместе с мицелием передают в вакуум-выпарные аппараты, в которых ее нагревают до температуры 80 °С с целью разрушения (термолиза) клеточных структур и одновременно ведут процесс концентрирования (упаривания) до содержания сухих веществ 30–40%. Концентрат, полученный после упаривания, в виде сиропобразной биомассы высушивают в распылительной сушилке до содержания влаги не более 8%. В результате получают смесь биомассы мицелия *E. ashbyii* и сухих остатков среды. Для получения однородного товарного продукта смесь размалывают и просеивают. На предприятиях концентрат гранулируют, т.к. порошкообразный продукт сильно пылит, что создает неудобства работы с ним и приводит к его потерям.

Кормовой концентрат витамина B_2 представляет собой обработанную, высушенную, размолотую или гранулированную биомассу продуцента *E. ashbyii*, содержащую не менее 15 мг рибофлавина на 1 г вещества. Помимо витамина B_2 концентрат содержит 0,3–0,5% других витаминов группы В (B_1 , B_6 , B_{12}), около 20% белковых веществ, а также полисахариды, липиды, минеральные соли.

Для животноводства можно получить кормовой рибофлавин как отход при производстве ацетона. В данном случае продуцентами витамина являются ацетобутиловые бактерии.

Преимущество и рентабельность микробного синтеза витамина B_2 иллюстрируют следующие цифры: из 1 т моркови получают 1 г, из 1 т тресковой печени – 6 г, а из 1 т культуральной жидкости *E. ashbyii* – 25 кг витамина.

Предложена и другая технологическая схема получения витамина B_2 , согласно которой в качестве посевного материала используются споры *E. ashbyii*, выращенные на пшене. Промытое пшено выдерживают в течение 30–35 мин. в молочной сыворотке для набухания. Затем его подсушивают, расфасовывают по 50–60 г в простерилизованные флаконы и подвергают трехкратной стерилизации. После этого производят его засев водной суспензией спор *E. ashbyii*. Флаконы с засеянной культурой в течение 7–8 сут. инкубируют при температуре 29–30 °С. Затем подсушивают в вакуум-

сушильной установке и направляют для приготовления жидкого посевного материала, который после стерилизации подается в производственный ферментер.

Культивирование продуцента осуществляют при температуре 28–30 °С в течение 72 ч. При этом через каждые 8 ч отбирают пробы для контроля за развитием продуцента, составом культуральной среды и накоплением целевого продукта. Культуральная жидкость после окончания ферментации содержит 1,4 мг/мл рибофлавина.

В целях стабилизации витамина В₂, в процессе сушки культуральную жидкость подкисляют соляной кислотой до значения рН 4,5–5. Затем ее концентрируют в вакуум-выпарной установке, проводят дополнительную очистку с помощью ионообменной установки. При этом элюат концентрируют путем упаривания, а полученный целевой продукт (концентрат рибофлавина) высушивают с помощью распылительной сушилки.

В 1983 г. во ВНИИ генетики микроорганизмов сконструирован рекомбинантный штамм продуцента *Bacillus subtilis*, характеризующийся увеличенной дозой оперонов, которые контролируют биосинтез рибофлавина.

Клонированием генов рибофлавинового оперона в одной из созданных плазмид был получен производственный штамм продуцент витамина В₂, способный синтезировать в 3 раза больше по сравнению с *E. ashbyii* количество рибофлавина всего за 40 ч ферментации.

Биотехнология витамина С

Витамин С (аскорбиновая кислота) представляет собой группу соединений – производных L-(+)-гулоновой кислоты. Данный витамин присутствует у всех высших растений и животных, только человек и микроорганизмы его не синтезируют. Он необходим человеку для жизнедеятельности, тогда как микроорганизмы в нем не нуждаются. И, тем не менее, определенные виды уксуснокислых бактерий причастны к биосинтезу полупродукта аскорбиновой кислоты – L-сорбозы. Биологические функции витамина С связаны с участием в биосинтезе стероидов, в реакциях гидроксирования, в частности, в превращении пролина в оксипролин (биосинтез коллагена). При недостатке витамина С нарушается обмен в соединительной ткани, повышается проницаемость капилляров, что ведет к кровоизлияниям и цинге.

Аскорбиновая кислота в мировом промышленном производстве витаминной продукции в целом занимает наибольшую долю – около 40 тыс. т. в год. Ее синтез был разработан швейцарскими учеными А. Грюсснером и С. Рейхштейном в 1934 г. и используется до настоящего времени. Синтез данного витамина является многостадийным химическим процессом, в котором только одна стадия представлена биотрансформацией. Данная стадия трансформации D-сорбита в L-сорбозу реализуется при участии ацетатных бактерий.

Для получения сорбозы используют глубинную ферментацию, когда культуру продуцента *Gluconobacter oxydans* выращивают в ферментерах периодического действия с мешалкой и барботером для усиления аэрации и массообмена в течение 20–40 ч с результатом по выходу сорбозы до 98% исходного количества сорбита в среде. Обычно для достижения такого высокого выхода целевого продукта в среду вносят кукурузный или дрожжевой экстракт в количестве 20%.

По окончании ферментации сорбозу выделяют из культуральной жидкости.

Кроме оптимизации питательной среды можно совершенствовать и технологическую аппаратуру. Так, переход от периодического культивирования продуцента *G. oxydans* к непрерывному в аппарате колонного типа увеличивает скорость образования сорбозы в 1,7 раз.

В настоящее время широкое использование биотехнологических процессов позволяет совершенствовать синтез аскорбиновой кислоты, сокращая многоэтапные и дорогостоящие химические стадии процесса. Так, синтез витамина С осуществляют енолизацией его важнейшего промежуточного продукта – 2-кето-L-гулоновой кислоты, которую получают методом двухстадийного микробиологического синтеза, состоящего из окисления D-глюкозы в 2,5-дикето-D-глюконовую кислоту (2,5-ДКДГК) и биотрансформации последней в 2-кето-L-гулоновую кислоту (2-КГК).

Основными продуктивными микроорганизмами, обеспечивающими процессы окисления D-глюкозы в 2,5-ДКДГК и восстановление последней до 2-КГК, являются мутантные штаммы *Erwinia punctata* и *Corynebacterium sp.*, при использовании которых выход целевого продукта составляет около 90% глюкозы. Однако, данная технология имеет существенные недостатки, т.к. при совместном культивировании продуцентов происходит ингибирование синтеза 2-КГК. В этой связи, культуральную жидкость после выращивания продуцента 2,5-ДКДГК стерилизуют, применяя ПАВ, что позволяет значительно сократить потери при получении гулоновой кислоты.

Существует и другой биотехнологический способ получения гулоновой кислоты, основанный на ее биосинтезе штаммом микроорганизмов рода *Gluconobacter* из сорбозы, производство которой имеет высокую рентабельность. Способность к биосинтезу целевого продукта обусловлено наличием у данного микроорганизма видоспецифических дегидрогеназ

Биотехнология витамина D

Витамины группы D – группа родственных соединений, обладающих антирахитическим действием, основы химической структуры которых составляет эргостерин, обнаруженный в клеточных мембранах эукариот.

Витамины D₂ и D₃ не растворимы в воде, хорошо растворяются в жирах и растворителях жиров. Они малостабильны и быстро разрушаются под действием окислителей и минеральных солей.

Витамин D₂ производят путем микробиологического синтеза при выращивании микроорганизмов на углеводородном сырье. Предшественником жирорастворимого витамина D₂ является эргостерин. При УФ обработке дрожжевой суспензии или сухих дрожжей происходит фотохимическое превращение эргостерина в эргокальциферол.

Из дрожжей или мицелия плесневых грибов витамин D₂ получают в кристаллическом виде или в виде масляного концентрата.

Производственными продуцентами эргостерина являются клетки дрожжей и плесневые грибы. Наибольшее количество эргостерина присутствует в пекарских дрожжах (до 10%).

Обнаружено, что полиеновые антибиотики, действующие на клеточную мембрану дрожжей, заметно стимулируют их содержание в биомассе.

В табл. 2 представлены микроорганизмы – продуценты эргостерина.

Таблица 2

Содержание эргостерина у микроорганизмов

Микроорганизмы	Количество эргостерина, % (на сухое вещество)
<i>Saccharomyces carlbergensis</i>	0,49–4,3
<i>Saccharomyces ellipsoides</i>	1,2–1,5
<i>Rhodotorula gluinis</i>	0,7–0,9
<i>Candida utilis</i>	0,4–0,6
<i>Candida tropicalis</i>	0,2–0,3
<i>Aspergillus</i>	1,2–1,4
<i>Penicillium Westlingii</i>	2,2

В качестве промышленного источника эргостерина используют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. В анаэробных условиях культивирования происходит накопление в клетках дрожжей сквалена (предшественник эргостерина).

Индукция биосинтеза эргостерина начинается при строго определенной концентрации кислорода (0,03–2%). При этом среда должна содержать избыток углеводов и небольшое количество азота.

После окончания спиртового брожения дрожжи отделяют от барды и вносят в среду необходимое количество источников углерода, азота и фосфора.

Ферментацию осуществляют в аэробных условиях в течение 12–20 ч. После ее завершения клетки дрожжей отделяют от культуральной жидкости, добавляют антиоксиданты и сушат. Обычно в полученной биомассе содержание эргостерина достигает 1,5%. При дальнейшем облучении эргостерина УФ светом получают витамин D₂, который используется в качестве пищевой добавки или подвергается дальнейшей обработке с целью получения кристаллического витамина D₂.

При получении эргостерина из дрожжеподобных грибов рода *Candida* сухую массу грибов экстрагируют петролейным эфиром для извлечения остаточных углеводов. Полученная липидная фракция называется микробный жир и является побочным продуктом микробиологического производства. Данная фракция может быть использована как источник не только эргостерина, но и убихинона, а также других жирорастворимых соединений. Для грибов рода *Candida* характерно, что при переходе от периодического культивирования на углеводах к непрерывному в клетках сохраняются как уровень образования стеринов, так и относительное содержание в них эргостерина.

Для выделения из клеток эргостерина и витаминов необходимо гидролизовать дрожжи, что осуществляют при нагревании с кислотой или ферментативно (автолиз). Гидролиз осуществляется при температуре 105 °С в течение 20–30 мин. Полученный гидролизат обрабатывают спиртом при температуре 75–78 °С в течение 40–50 мин. в коагуляторе. Полученную массу охлаждают до температуры 10–15 °С и фильтруют. Фильтрат концентрируют, отделяя спирт и часть воды, получают концентрат витаминов группы В, содержащий 50% сухих веществ.

Осадок после фильтрования промывают водой, отгоняют спирт и воду. Полученную пасту сушат до влажности 2% и измельчают.

Порошок дрожжей обрабатывают в экстракторе трехкратным объемом спирта-ректификата при температуре 78 °С. После отделения раствора осадок еще раз экстрагируют спиртом, который удаляют из экстракта, а остаток сгущают до 70% содержания сухих веществ. Концентрат омыляют щелочью. Затем раствор кристаллизуют при температуре 0 °С. Выпавший осадок с целью дополнительной очистки растворяют в спирте или бензоле. Выпавшие кристаллы сушат в эфире. Чистый препарат эргостерина облучают УФ лучами для получения витамина D₂.

На выход витамина D₂ оказывает влияние длительность облучения, температура и наличие примесей.

Биотехнология витамина Н

Витамин Н – кофактор многих ферментов. Это значит, что только в соединении с биотином белковые молекулы ферментов обретают каталитическую активность и получают возможность выполнять свою функцию. В его отсутствии многие важные процессы в клетке прекращаются.

Человека обеспечивают определенным количеством биотина микроорганизмы, обитающие в кишечнике. Кроме того, он поступает в организм человека вместе с пищей (в яичный желток, дрожжи, цветная капуста). Однако, при нарушении естественной микрофлоры кишечника (в результате длительного приема антибиотиков), ее производительность снижается, что может привести к дефициту биотина. К биотиновой недостаточности может привести и употребление в пищу больших количеств сырого яичного белка, т.к. в нем содержится гликопротеин, присоединяющий биотин. При этом образует-

ся прочный комплекс, который не переваривается и не усваивается организмом.

Признаками биотиновой недостаточности у человека являются: пепельно-бледная кожа, атрофия сосочков языка, боли в мышцах, сонливость, потеря аппетита, снижение содержания эритроцитов и холестерина в крови. У животных дефицит биотина выражается в замедлении роста, появлении дерматитов, депигментации, нарушении роста волос.

Биотин необходим и некоторым видам микроорганизмов, не способным его самостоятельно вырабатывать. К ним, в частности, относится *Corinebacterium*, которая широко используется в микробиологическом производстве для биосинтеза незаменимой аминокислоты лизина (ценной кормовой добавки).

Промышленное производство данного витамина в нашей стране пока не налажено. В этой связи, практическое применение биотина сильно ограничено. Получать биотин из природных источников невыгодно, т.к. для выделения 1 мг витамина необходимо переработать почти 230 кг сухого яичного желтка.

Кроме того, разработаны методы его химического синтеза. Однако, данным способом удастся получить всего несколько сот грамм витамина в год, а потребность в нем в тысячи раз выше. Помимо этого, при химическом синтезе образуется смесь изомеров, которую приходится разделять для получения активного D-биотина.

Остается еще один путь получения биотина – микробиологический синтез. Основным ограничением данного способа получения является то, что микроорганизмы синтезируют биотин в минимальных количествах. В этой связи, вначале исследования были сосредоточены на поиске такого микроорганизма, который по своей производительности подходил на роль продуцента. С этой целью было исследовано большое количество штаммов плесневых грибов, дрожжей, грибов, актиномицетов. Однако большинство из них оказались неподходящими продуцентами: бактерии ведут очень экономный образ жизни, строго контролируют свои затраты, поэтому лишнего биотина почти не производят. В этом отношении более перспективными оказались грибы, особенно растущие на богатых органических субстратах. В итоге исследователи остановили свой выбор на грибах рода *Rhizopus delemar*, являющихся настоящими «рекордсменами» среди микроорганизмов: они образуют около 1 мг биотина на 1 л среды и большую его часть выделяют в культуральную среду.

Следующей проблемой, связанной с получением биотина микробиологическим способом, является проблема масштабирования. В ходе отбора продуцентов было обнаружено, что многие штаммы микроорганизмов активно поглощают биотин из внешней среды, накапливая его в своих клетках. Особенно выделяются в этом отношении дрожжи рода *Trichosporon*. Даже небольшое их количество за 1 ч аккумулирует 60% биотина, содержащегося в культуральной жидкости. Кроме того, дорогостоящий процесс концентрирования сильно разбавленного раствора биотина данные дрожжи осуществ-

ляют очень быстро. К тому же их биомасса нетоксична и может использоваться в качестве кормовой добавки. В этой связи, казалось бы, достаточно насытить дрожжи биотином и проблема создания препарата решена. Однако, все оказалось не так просто. Выяснилось, что дрожжи не только поглощают биотин, но еще и его разрушают, поэтому часть витамина теряется. На первый взгляд казалось странным, что в природе существуют организмы, разрушающие столь ценное и достаточно химически стойкое соединение, но позже было установлено, что это вовсе не редкое явление. Так, одни штаммы разрушают биотин, если получают его в слишком большом количестве, потому что в высоких концентрациях он может быть для них токсичен, другие используют его не по назначению, а в качестве источника углерода и азота.

Таким образом, дрожжи рода *Trichosporon* на роль поглотителя биотина явно не подходили, поэтому пришлось продолжить поиск. Предположили, что более бережно будут относиться к витамину организмы, которые, сами его не синтезируя, нуждаются в его поступлении извне (ауксотрофы). Для этой цели были выбраны метилотрофные дрожжи, выращиваемые на метаноле. Они применяются в качестве белковой добавки к кормам животных. Эти дрожжи поглощают биотин лучше, чем дрожжи *Trichosporon*: 95% биотина, находящегося в среде, переходит в их клетки всего за 20–30 мин. и при этом биотин остается в целостности и сохранности. Таким образом, метилотрофные дрожжи стали вторым компонентом биотинового препарата.

В целом схема получения биотина заключается в следующем: на питательной среде, оптимизированной по составу, выращивают грибы рода *Rhizopus* (продуцент биотина). Затем биомассу гриба отфильтровывают, а к культуральной жидкости, в которую *Rhizopus* выделяет большое количество биотина, добавляют метилотрофные дрожжи, за короткое время поглощающие почти весь имеющийся в среде витамин. Смесь биомассы *Rhizopus* и дрожжей, богатая биотином, и представляет собой биотиновый препарат.

Первая партия продукта, полученная по описанной технологии на Серебрянопрудском биохимическом заводе, была испытана на одной из подмосковных птицефабрик. Цыплята, получившие корм с добавкой биотинового препарата, быстрее росли и меньше болели.

Кроме того, данный препарат был испытан и в другой области – при искусственном выкармливании личинок тутового шелкопряда специально составленными кормами. В результате было установлено, что в таких кормах при наличии, казалось бы, всех питательных веществ содержится очень мало биотина. Биотиновая недостаточность у шелкопряда приводит к тому, что у него нарушается липидный обмен, снижается содержание C₁₈-жирных кислот, насекомые болеют и погибают, поэтому весьма эффективно введение в корм биотинового препарата.

Таким образом, можно сделать вывод, о том, что разработанный биотиновый препарат найдет широкое практическое применение, но для получения чистого биотина, его пока еще нельзя использовать. Точнее, невыгодно, потому, что для налаживания экономичного биотехнологического производства чистого биотина необходимо, по крайней мере, в 100–150 раз увеличить вы-

ход целевого продукта, а это за пределами возможностей разработанного штамма продуцента. В этой связи, требуется изменение его генетики, что обычно достигается воздействием мутагенов. Однако в данном случае имеет-ся одно трудно преодолемое препятствие. Для подобных манипуляций про-дуцент грибного происхождения не подходит, т.к. после отработки мутаге-ном популяцию микроорганизмов рассеивают на плотную среду, чтобы полу-чить отдельные колонии и отобрать среди них те, в которых произошли нуж-ные мутации, но *Rhizopus* не растет в виде отдельных колоний, а быстро за-нимает всю поверхность плотной среды. В этой связи, обычный способ отбо-ра мутантов не подходит. Нельзя применить к *Rhizopus* и методы генетиче-ской инженерии, поскольку его генетика практически не изучена.

В этой связи, в поисках пути получения чистого биотина ученые сосре-доточили свое внимание на другом биологическом объекте – *E. coli*, хорошо изученной в генетическом отношении. В настоящее время обнаружены не-сколько ее перспективных штаммов, у которых в результате мутации изме-нен и нарушен механизм управления биосинтезом биотина. Данные штаммы лишены внутренних тормозов, заставляющих обычные бактерии производить биотин очень экономно, и синтезирующих его бесконтрольно. Однако для того, чтобы довести выработку биотина бактериями до нужного уровня, предстоит очень много работы.

Биотехнология витамина В₃

В условиях промышленного производства пантотеновую кислоту полу-чают методом химического синтеза.

Наиболее важной коферментной формой витамина В₃ является кофер-ментацетилированная (КоА).

Способностью продуцировать в значительных количествах КоА обла-дают многие микроорганизмы, в частности, актиномицеты.

Активно внедряются в промышленное производство способы получения пантотеновой кислоты и ее структурных компонентов из β-аланина и панто-теата калия с помощью иммобилизованных клеток бактерий, а также достиг-нуты существенные успехи при получении КоА с использованием мутантных штаммов *Brevibacterium ammoniagenes*, которые позволяют КоА в количестве до 3 г на 1 л культуральной среды.

Биотехнология витамина РР (никотиновая кислота)

Одним из наиболее распространенных биотехнологических способов получения коферментной формы никотиновой кислоты – никотинамидаде-ниндинуклеотида (НАД) является его выделение (экстракция) из микроорга-низмов, как правило, из пекарских дрожжей. Для повышения содержания НАД в дрожжевых клетках культивирование проводят на средах с предше-ственниками биосинтеза никотиновой кислоты.

Так, при добавлении в среды культивирования аденина или самой никотиновой кислоты получают до 12 мг НАД на 1 г клеток (по сухой массе). Использование мутантных штаммов *Brevibacterium ammoniagenes* с одновременным изменением проницаемости мембраны клеток микроорганизмов (коферменты через биомембраны не проникают) с помощью ПАВ (цетилсульфата натрия, цетилпиридина хлорида) позволяет получать НАД до 6 г/л.

Рекомбинантные белки

Высокая стоимость лекарственных препаратов, получаемых традиционным способом из дефицитного природного сырья, послужила предпосылкой для разработки технологии, основанной на применении генетически измененных (модифицированных) микроорганизмов.

Разработка методов изменения генетического аппарата клеток, позволяющих вводить в них чужеродные гены, клонировать их, экспрессировать и получать нужные ценные продукты, совершила настоящую революцию в биологии. Данные достижения находят самое широкое применение, прежде всего, в области медицины. Так, белки и пептиды, доступные совсем недавно лишь в очень небольших количествах, в настоящее время предполагается производить в массовом масштабе и использовать для лечения различных заболеваний.

Рекомбинантная ДНК-биотехнология

Практическое использование рекомбинантных ДНК различного происхождения составляет основу рекомбинантной ДНК-биотехнологии (рДНК-биотехнологии).

Генетическая рекомбинация заключается в обмене генами между двумя хромосомами.

По определению Понтекорво (1958 г.), рекомбинация – это любой процесс, способный привести к возникновению клеток или организмов с двумя или более наследственными детерминантами, по которым их родители различаются между собой и которые соединены новым способом.

Живые организмы, чаще всего клетки прокариот, обладают рестрикционными эндонуклеазами (рестриктазами), которые узнают чужеродную ДНК, проникшую в организм, и расщепляют ее, таким образом, сводя на нет генетическую рекомбинацию между эволюционно удаленными геномами.

Обмен генами, которые представляют собой сегменты ДНК, равно как и введение в клетку гена, принадлежащего другому виду, можно осуществить посредством рДНК-биотехнологии в условиях *in vitro*. Данный подход был реализован на бактериях, в частности на кишечной палочке, в клетки которой вводили гены животных и человека и добились их репликации (репликация – процесс самовоспроизведения нуклеиновых кислот, обеспечивающий точное воспроизведение генетической информации).

рДНК-биотехнологию подразделяют на следующие этапы:

- получение чужеродной ДНК;
- разрезание полученной ДНК на фрагменты и их очистка;
- включение фрагмента чужеродной ДНК в векторную плазмиду и получение рекомбинантной ДНК.
- введение рДНК в пермиссивные клетки и клонирование генов.
- амплификация (образование дополнительных копий хромосомных последовательностей) и экспрессия ДНК (функциональная активность генов).

Чужеродную ДНК можно получить с помощью химического или ферментативного синтеза, либо из любого организма или из вирусов с последующим определением ее первичной структуры. В случае, если ДНК выделяют из клеток эукариот, то для клонирования, амплификации и экспрессии не нужны интроны (последовательности внутри структурного гена, которые не участвуют в кодировании белкового продукта гена; после транскрипции гена последовательности, соответствующие интронам удаляются из мРНК в процессе сплайсинга). Поэтому в таких случаях используют мРНК (информационная (матричная) РНК, служащая матрицей при биосинтезе белков на рибосомах), образующуюся в процессе сплайсинга (ферментативного удаления интронов и соединения экзонов (участков структурного гена, кодирующих аминокислотную последовательность белкового продукта; экзоны разделены интронами и объединяются в мРНК в непрерывную последовательность в результате сплайсинга) при биосинтезе мРНК).

Выделение генов из ДНК с помощью рестриктаз

Расщепление может происходить по середине узнаваемого участка нуклеотидных пар, и тогда обе нити ДНК «разрезаются» на одном уровне. Образующиеся фрагменты имеют двухнитевые (тупые) концы. Другие рестриктазы расщепляют нити ДНК со сдвигом, так, что образуется ступенька – одна из нитей ДНК выступает на несколько нуклеотидов, образуя одонитевые (липкие) концы.

При необходимости тупые концы могут быть превращены в липкие, для чего к тупым концам присоединяют двухцепочечные последовательности (линкеры) с участками узнавания рестриктазы, дающей липкие концы.

Метод выделения генов из ДНК с помощью рестриктаз имеет существенные недостатки: трудно подобрать рестриктазы, позволяющие вырезать из ДНК именно тот участок, который соответствует нужному гену. Наряду с интересующим геном, фрагменты ДНК, как правило, включают лишние нуклеотидные последовательности, создающие помехи для использования гена. Кроме того, рестриктаза может отщепить часть нуклеотидной последовательности гена, в результате чего ген теряет функциональную полноценность.

Химико-ферментативный синтез генов

Химико-ферментативный синтез генов является важной альтернативой «вырезанию» генов с помощью рестриктаз из нативной ДНК. Данный метод включает химический синтез коротких (8–16-тизвенных) одноцепочечных фрагментов ДНК (олигонуклеотидов) за счет поэтапного образования эфирных связей между нуклеотидами и сшивку олигонуклеотидов между собой посредством ДНК-лигазы с образованием двухцепочечных полинуклеотидов.

Химико-ферментативный синтез позволяет точно воссоздать минимально необходимую последовательность нуклеотидов и избежать проблем, связанных с элиминированием лишних нуклеотидных последовательностей в фрагментах ДНК, в том числе интронов; появляется возможность введения в гены участков узнавания различных рестриктаз, регуляторных последовательностей и т.п.

Для данного метода синтеза генов необходима полная информация о его нуклеотидной последовательности, поэтому применимость метода ограничена возможностями получения такой информации. Последовательность нуклеотидов в гене может быть воссоздана на основе первичной структуры соответствующего белка.

Триумфом в анализе структуры гена является параллельное воссоздание нуклеотидной последовательности ДНК и цепочки аминокислотных остатков в кодируемом белке. Путем химико-ферментативного синтеза получены гены соматостатина, А- и В-цепей инсулина, проинсулина.

Ферментативный синтез генов на основе выделенной из клетки матричной РНК (мРНК)

Ферментативный синтез генов на основе выделенной из клетки матричной РНК является наиболее популярным методом синтеза генов. Обратная транскриптаза (ревертаза) катализирует синтез нити ДНК, комплементарной мРНК. Полученную одноцепочечную ДНК, называемую комплементарной ДНК (кДНК), используют в качестве матрицы для синтеза второй нити ДНК с применением ДНК-полимеразы или ревертазы.

Преимущество метода состоит в том, что ген получается без интронов и других нетранскрибируемых последовательностей. Кроме того, легче создать условия, когда клетка аккумулирует нужный вид мРНК, чем отбирать ген из смеси фрагментов ДНК. На этом методе основано получение в 1979 г. гормона роста человека (соматотропина).

Фрагменты ДНК, полученные тем или иным способом, **разделяют** с помощью электрофореза на гелях (агарозном, полиакриламидном геле и т.п.), из которых их экстрагируют, вырезая соответствующие участки геля. Данные участки, например, агарозного геля расплавляют в пробирках при температуре 68 °С и ДНК экстрагируют фенолом, затем концентрируют изо-

бутанолом, пересаждают этанолом и проводят анализ выделенных и очищенных фрагментов.

Следующим этапом является **включение фрагмента чужеродной ДНК в вектор**. Понятие «вектор» в молекулярную биологию введено М. Томасом в 1974 г. и обозначает «способный переносить в клетку-реципиент чужеродную ДНК любого происхождения». Вектор является важным компонентом процесса клонирования.

Вектор – это молекула ДНК, обеспечивающая амплификацию фрагмента в растущей популяции соответствующего вида.

Для клонирования ДНК, например, в клетках *E. coli* можно использовать векторы двух классов – плазмиды и фаги (фаги – вирусы; вирусы, поражающие бактерии – бактериофаги; вирусы, поражающие актиномицеты – актинофаги).

Дж. Коллинс и Б. Хон в 1978 г. впервые ввели в практику так называемый космидный вектор или *cos*-вектор, т.е. комбинированную векторную систему «плазида – ДНК фага-лямбда». Космидам присущи свойства фагов и плазмид.

Схема конструирования рДНК, осуществляемая *in vitro*

Кольцевая молекула вектора размыкается с помощью рестриктазы.

При этом необходимо, чтобы полученная линейная молекула ДНК содержала липкие концы, комплементарные концам вводимой ДНК. Комплементарные липкие концы вектора и вводимого гена сшиваются, при этом полученную рДНК с помощью ДНК-лигазы вновь замыкают с образованием единой кольцевой молекулы.

Важной проблемой, возникающей при использовании вирусов в качестве генетических векторов, является аттенюация, т.е. ослабление патогенности для хозяина. Большое значение для биотехнологии имеет способность вирусов быстро транспортироваться из клетки в клетку, распространяясь по растительной или животной ткани так, что в короткие сроки развивается генерализованная инфекция по всему организму. Данное свойство вирусов открывает возможность генетической модификации соматических клеток взрослого организма. В этом отношении открываются огромные перспективы лечения ряда наследственных заболеваний человека путем введения вирусов, разносящих недостающие гены по всем 10^{11} клеткам человеческого организма.

Плазмиды представляют собой автономные самореплицирующиеся генетические единицы. Плазмиды обнаружены у бактерий, грибов, растений и животных. Наиболее широкое практическое применение в генетической инженерии нашли бактериальные плазмиды, особенно плазмиды *E. coli*. Бактериальные плазмиды подразделяются на конъюгативные, т.е. способные к переносу генетической информации от клетки к клетке путем конъюгации бактерий, и неконъюгативные, т.е. передающиеся от одной клетке к другой по-

средством механизма бактериальной трансформации. Перенос неконъюгативных плазмид происходит путем конъюгации возможен только в том случае, если имеется плазида-помощник, способная к самостоятельному транспорту. Некоторые плазмиды способны к амплификации, т.е. образуют в клетке большое число копий, что резко повышает уровень фенотипического выражения генов.

При конструировании векторов исследователь вводит в него участки узнавания рестриктаз, а также гены-маркеры, кодирующие легко распознаваемые признаки, по которым можно отобрать клетки, являющиеся носителем вектора.

Для клонирования ДНК используют пермиссивные клетки, отвечающие следующим основным требованиям:

- ✓ не разрушаются чужеродные ДНК или РНК собственными ферментами;
- ✓ срабатывает механизм репликации вектора;
- ✓ проявляется выраженная активность промотора и/или терминатора транскрипции рДНК (промотор – специфическая последовательность в ДНК, необходимая для инициации транскрипции полимеразой; транскрипция – матричный синтез РНК или ДНК, осуществляемый ферментами РНК-полимеразами; терминация – окончание синтеза ДНК, происходящее благодаря выключению реакции с помощью специфического «стоп-сигнала» от специального терминатора в матричной цепи);
- ✓ отмечается полный сплайсинг мРНК;
- ✓ наблюдается активная трансляция мРНК (трансляция заключается в переводе закодированной в мРНК информации в полипептидную цепь);
- ✓ нет выраженной активности пептидогидролаз, катализирующих реакции гидролиза экспрессируемых чужеродных белков.

Микробиологическое производство биологически активных белков и гормонов

В организме функционирует множество низко- и высокомолекулярных белков – регуляторов жизненных процессов. Важное место среди них занимают разнообразные гормоны. Эти вещества уже давно используют в медицинской практике в терапевтических целях. До недавнего времени их получали из органов и тканей животных, а также в очень ограниченном количестве – из тканей (крови) человека. Аналогичные препараты применяют также в животноводстве.

Различают два типа гормонов: белково-пептидные и стероидные. Первые состоят из аминокислотных цепей разной длины, вторые – из стероидов.

Гормоны, вырабатываемые специализированными клетками, распространяются через кровь по организму, и, взаимодействуя с разными клетками-мишенями, стимулируют в них определенные процессы жизнедеятельности.

Гормоны назначают в следующих случаях:

1. Для восполнения их нехватки у людей с наследственными дефектами (сахарный диабет, импотенция и т.п.) или заболеваниями, возникшими при жизни.
2. Для суперактивации регулируемого гормоном процесса (стимулирование многоплодия и т.д.).

Тормозит практическое применение гормонов, главным образом в медицине, их дефицит. До начала 80-х гг. XX в. источником гормонов служили органы и ткани животных и человека, главным образом донорская кровь, но в последние годы создание любых препаратов из органов и крови человека резко ограничилось из-за опасений распространения таким путем вирусов, и в первую очередь, ВИЧ, вызывающего СПИД.

Белково-пептидные препараты животного происхождения иммунологически отличаются от белков человека, поэтому могут вызывать аллергические реакции, сила которых зависит от индивидуальных особенностей белкового препарата и пациента. Тем не менее, до сих пор люди вынуждены широко применять гормоны животных.

Биотехнология, вступившая в эру генной инженерии, впервые открыла реальные возможности промышленного производства гормонов и иных препаратов человека в масштабах, достаточных для удовлетворения потребностей медицины.

Рассмотрим наиболее ценные для медицины и животноводства продукты, биотехнологическое производство которых налажено или налаживается в промышленных масштабах.

Интерлейкины

Интерлейкины (ИЛ) – это вещества белковой или гликопротеидной природы, синтезируемые преимущественно иммунокомпетентными клетками. В настоящее время выделено и охарактеризовано 15 интерлейкинов. ИЛ, играющими существенную роль в кооперативных взаимодействиях иммунокомпетентных клеток при развитии иммунного ответа, являются ИЛ 1, ИЛ 2, ИЛ 4, ИЛ 5, ИЛ 6.

ИЛ 1 – цитокин, выделяемый макрофагами, стимулирующий функции Т- и В-лимфоцитов. С участием ИЛ 1 активируются Т-хелперы, синтезирующие ИЛ 2, а также β -лимфоциты, трансформирующиеся в плазматические клетки антителопродуценты. Он является посредником в обеспечении взаимодействия различных защитных противоифекционных механизмов на уровне организма.

ИЛ 2 – цитокин, синтезируемый Т-лимфоцитами, стимулирует β -лимфоциты при гуморальном иммунном ответе и созревание Т-эффекторов в

реакциях клеточного иммунного ответа. ИЛ 2 является ключевым фактором развития иммунного ответа.

ИЛ 4 – фактор стимуляции В-клеток и части Т-лимфоцитов. ИЛ 4 регулирует аллергические реакции организма. С помощью ИЛ 4 Т-хелперы влияют на продукцию *IgE* в процессе развития иммунного ответа. Основными продуцентами ИЛ 4 являются нормальные Т-лимфоциты и Т-клеточные гибридомы.

ИЛ 5 – мультифункциональный цитокин (Т-замещающий фактор), активирующий Т- и В-лимфоциты и эозинофилы; является продуктом активированных Т-лимфоцитов.

ИЛ 6 – один из ранних цитокинов, продуцируемый многими типами клеток (В-стимулирующий фактор, фактор роста гибридом/плазмоцитом, Т-лимфоцитактивирующий фактор), участвует в регуляции функций лимфоцитов, обладает противовирусным действием.

Биотехнологическое получение интерлейкинов

В качестве продуцентов интерлейкинов используют культуры нормальных лимфоцитов или макрофагов; клоны трансформированных (опухолевых) клеток; Т-клеточные гибридомы (продукты гибридизации опухолевых лимфоцитов, способных к нормальному росту и Т-клеток, синтезирующих определенный ИЛ; рекомбинантные микробные клетки, полученные методами генной инженерии).

Продуценты культивируют в условиях *in vitro* в сосудах определенного объема, затем ИЛ выделяют из культуральной среды, концентрируют, очищают.

Для увеличения продукции ИЛ культуры клеток стимулируют митогенами (веществами, вызывающими митотическое деление клеток). В качестве митогенов используют глобулярные растительные белки (фитогемагглютинин и др.), а также компонент клеточной стенки бактерий – мурамилдипептид.

Для создания рекомбинантных микроорганизмов – продуцентов ИЛ, гены, контролирующие их синтез, вводят в составе вектора в микробную клетку, выделяют и размножают клон рекомбинантов и культивируют полученный продуцент с целью накопления ИЛ.

В качестве рекомбинантных продуцентов используют клетки *E. coli* (ИЛ 1, ИЛ 2), дрожжи-сахаромицеты (ИЛ 2), причем дрожжи более удобны, т.к. клетки *E. coli* накапливают ИЛ внутриклеточно, а дрожжи выделяют в окружающую среду, следовательно, полученный продукт легче отделяется от клеток и очищается.

Интерфероны

Функционально связанными с интерлейкинами являются интерфероны (ИНФ).

ИНФ – это группа биологически активных белков или гликопротеинов, синтезируемых клетками организма в ответ на воздействие (индукцию) различными агентами – интерференогенами, которыми могут быть вирусы, бактерии и продукты их метаболизма, а также другие антигены и митогены.

В систему ИНФ входят гены и их репрессоры, сами ИНФ, специфические клеточные рецепторы и ферментные системы, активирующиеся под влиянием интерференогенов и самих ИНФ.

Первоначально биологическая роль ИНФ сводилась к способности защищать организм от вирусной инфекции. Впоследствии было показано, что они выполняют и другие важные для организма функции: торможение роста опухолевых клеток за счет усиления цитотоксической активности лимфоцитов, макрофагов, естественных киллеров и стимуляции биосинтеза фактора некроза опухолей; активация интерференогенеза (прайминг); стимуляция антителообразования и др.

ИНФ являются видоспецифическими клеточными белками, каждому виду животного свойственен свой белок. ИНФ птиц, грызунов, крупного рогатого скота, человека защищают от вирусов только клетки своего вида, но есть исключение – человеческий ИНФ, который защищает клетки крупного рогатого скота лучше, чем коровий ИНФ.

ИНФ не является вирус специфичным и вырабатывается в ответ на воздействие многих вирусов.

В зависимости от происхождения ИНФ разделяют на несколько видов. Различают α -, β -, γ -интерфероны. По химическому составу α -ИНФ является белком, а β , γ -интерфероны – гликопротеины.

Расшифровка структурных генов позволила получить рекомбинантный интерферон.

Человеческий α -ИНФ является продуктом лейкоцитов крови, подвергнутых воздействию вирусов, используемых в качестве интерференогенов.

β -интерферон синтезируется в культурах фибробластов (диплоидных клеток соединительной ткани человека) под действием вирусов или синтетической двухцепочечной РНК.

γ -интерферон или иммунный интерферон выделяют лимфоциты при антигенной стимуляции.

Человеческий лимфобластоидный γ -интерферон получают из лимфобластов, выделенных от больных злокачественной лимфомой Беркита. Размножение лимфобластов в культуре стимулируют митогенами.

Рекомбинантные ИНФ синтезируются рекомбинантными микробными клетками – продуцентами (бактериями, дрожжами), полученными с помощью методов генной инженерии.

α - и β -интерфероны проявляют противовирусное и противоопухолевое действие, γ -интерферон отличается выраженными иммуномодулирующими свойствами. Действие рекомбинантных ИНФ лишено видовых ограничений и не уступает эффекту природных по активности.

Кроме противоопухолевого, противовирусного и иммуномодулирующего действия, ИНФ могут в определенных условиях снижать активность неко-

торых ферментов (гидролаз), подавлять биосинтез некоторых гормонов, участвуя в регуляции и коррекции состояния организма в норме и при патологиях, связанных с нарушениями функций иммунной системы.

Использование интерферона показано в целом ряде заболеваний. Так, из вирусных инфекций к ним относятся герпетический кератит, кератоконъюнктивит, стоматит, опоясывающий лишай, герпес, энцефалиты, вирусные гепатиты, полиомиелит и др. Кроме того, интерфероны нашли применение при пересадке органов и тканей как средство, предупреждающее вторичные вирусные осложнения. Эффективность применения препаратов интерферона для лечения ряда онкологических заболеваний зависит от вида опухоли, своевременности начала терапии, схем введения препаратов и некоторых других условий.

Рассмотрим основные способы получения интерферонов.

Впервые интерферон был получен в 1967 г. Айзексом и Линдеманном в Национальном институте медицинских исследований (Англия).

Получение α -интерферона основано на способности лейкоцитов образовывать интерферон под действием вируса. Лейкоциты из периферической крови человека культивируют при температуре 37 °С в течение 16 – 20 ч на специальной питательной среде, содержащей сыворотку крови человека и вирус-интерфероноген (вирус Сендай). Затем лейкоциты отделяют центрифугированием, вирус инактивируют снижением значения рН до 2,5. Нативный интерферон, находящийся в надосадочной жидкости, осаждают сульфатом аммония, очищают и концентрируют хроматографией на сефадексах. Активность полученного препарата определяется по его защитному противовирусному действию на культуру клеток эмбрионов человека, зараженных вирусами. Через 2–3-е суток культивирования с интерфероном фиксируется степень разрушения монослоя клеток. Активность интерферона выражается в единицах на 1 мг белка. Получение α -интерферона из лейкоцитов человека имеет ограничения из-за необходимости использования большого количества донорской крови.

β -интерферон получают из культур фибробластов, выращенных в монослое *in vitro*. Фибробласты – это клетки соединительной ткани, получаемой из тканей плода или из материала передней плоти при обрезании младенцев. Фибробласты удается поддерживать в культуре, поэтому они пригодны для массового производства интерферона. Данная технология получения интерферона гораздо проще, в сравнении с его выделением из лейкоцитов крови.

В данном случае в качестве интерфероногена используют двухцепочечную РНК. Выход β -интерферона усиливают ингибиторы метаболизма, например, противоопухолевый антибиотик актиномицин Д, ингибирующий биосинтез РНК. β -интерферон накапливается в культуральной жидкости в небольших количествах (1 мг на 10 л). культура клеток-продуцентов через 2–3 суток отмирает.

Выход γ -интерферона, синтезирующегося в культурах иммунных Т- или В-лимфоцитов, еще меньше, чем α - и β -интерферонов. Однако γ -интерферон обладает высокой противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью.

Человеческий фибробластоидный интерферон получают в глубоинной суспензионной культуре лимфоидных клеток от больных лимфомой. Данные клетки можно культивировать в биореакторах объемом до 500 л. Для индукции биосинтеза интерферона используют вирус Сендай, а для увеличения его выхода лимфобласты обрабатывают 5-бромдезоксинуридином или кортикостероидами, замедляющими все реакции метаболизма клеток, кроме биосинтеза интерферона. При добавлении указанных антиметаболитов, клетка переключается практически целиком на биосинтез интерферона и через определенный промежуток времени погибает.

В целом методы получения интерферонов трех классов – синтезируемых лейкоцитами, лимфобластоидными клетками, фибробластами и лимфоцитами – характеризуются низкими выходами; стоимость продукции велика (так, стоимость промышленного получения в лучшем случае составляет 40–50 долларов за 1 млн. единиц), а чистота препарата недостаточна (хотя в случае лимфобластного интерферона ее удалось повысить с 0,1–10 до 50%). В этой связи, очень большие надежды возлагались на способы получения интерферонов, основанные на методах рекомбинантных ДНК.

В качестве рекомбинантных продуцентов первоначально использовали клетки *E. coli*, накапливающие продукт внутриклеточно, что осложняет его выделение и очистку. Более перспективными оказались бактерии *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, способные секретировать рекомбинантные белки в окружающую среду. Из эукариот хорошими продуцентами генно-инженерного интерферона являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, которые растут на достаточно доступных и экономичных средах, легче отделяются от культуральной жидкости, не подвергаются воздействию бактериофагов. При использовании данного вида дрожжей производство интерферона возросло в 10 раз. Клетки *Saccharomyces cerevisiae* действительно обладают особыми преимуществами при биосинтезе гликопротеидов высших организмов (например, интерферонов), поскольку присоединение углеводных групп (гликозилирование) в них осуществляется по тому же механизму, что и в клетках животных.

Принципиальная технологическая схема получения рекомбинантного интерферона включает следующие этапы:

1. Выделение иРНК, несущую информацию о структуре молекулы интерферона (РНК выделяют после индукции биосинтеза интерферона);
2. Получение кДНК на матрице иРНК;
3. Встраивание кДНК в векторную плазмиду с участием ферментов рестриктаз и лигаз и получение рекомбинантной ДНК (рДНК), содержащей ДНК вектора с генетическими маркерами и ДНК, кодирующую биосинтез целевого продукта;
4. Трансформация рДНК в реципиентную (пермиссивную) микробную клетку;
5. Получение клонов рекомбинантных продуцентов, способных синтезировать интерферон (на плотной питательной среде);

6. Размножение клоновой культуры – продуцента в жидкой питательной среде;

7. Отделение клеток от культуральной жидкости с помощью центрифугирования;

8. Выделение целевых белков из нативного раствора или лизата биомассы продуцента, например, осаждением сульфатом аммония;

9. Очистка интерферона после растворения осадка с помощью аффинной хроматографии при использовании сорбента, связанного с моноклональными антителами к интерферону. При пропускании раствора, содержащего целевой продукт и балластные вещества через колонку с иммуносорбентом происходит высокоспецифическое связывание антигена (интерферона) с моноклональными антителами к нему, все прочие вещества не задерживаются. Затем интерферон элюируют слабой кислотой, происходит диссоциация комплекса «антиген-антитело».

Выполнение 1 – 5 этапов осуществляется в лабораторных условиях, последующие этапы выполняются на производственных установках. Выход рекомбинантного интерферона значительно выше, чем при использовании культур клеток микроорганизма (лимфоцитов, лейкоцитов, фибробластов). Для получения 60 мкг лейкоцитарного интерферона нужно 100 л крови или 1 л культуральной жидкости микроорганизма-рекомбинанта.

Индукторы интерферонов

К началу XXI века открыто и изучено около 1500 вирусов, из которых более 500 вызывают различные заболевания человека (от местных поражений до генерализованных инфекций), причем не менее половины из них убиквитарны, т.е. распространены практически повсеместно. Многочисленные представители семейства вирусов (миксовирусы, парамиксовирусы, риновирусы, энтеровирусы и т.п.) являются причиной наиболее распространенных инфекций, как грипп, герпес, гепатиты, корь, паротит и др.

В последнюю четверть XX века изменилось традиционное отношение к вирусам только как к агентам, вызывающим «классические инфекции». Доказана их роль в этиологии и патогенезе ряда аутоиммунных (системная красная волчанка), аллергических (сенная лихорадка), онкологических и других заболеваний. В настоящее время с определенной долей уверенности можно сказать: в основе до 90% всей патологии человека лежит инфекционная природа, инфекционный агент. Общеизвестно, что профилактика легче и дешевле лечения, а лечение острых форм на ранних этапах дешевле и экономически более выгодно, чем лечение запущенных и тяжелых форм инфекционных болезней и их осложнений.

Все это определяет безусловную актуальность научно обоснованного применения существующих и создания новых этиотропных препаратов, пригодных для профилактики и терапии вирусных инфекций.

По характеру действия и клинической значимости применяемые в настоящее время для лечения вирусных инфекций препараты могут быть разделены на 4 основные группы:

- ✓ этиотропные, действующие на возбудителя заболевания;
- ✓ иммуномодулирующие, корригирующие нарушение системы иммунитета, возникающие и развивающиеся в процессе болезни;
- ✓ патогенетические, направленные на борьбу с интоксикацией, обезвоживанием, сосудистыми поражениями, органическими нарушениями, аллергическими реакциями, а также на профилактику бактериальных осложнений;
- ✓ симптоматические, купирующие сопутствующие симптомы заболевания (головная боль, бессонница, кашель и др.).

Очевидно, что наилучшие результаты лечения могут быть достигнуты при комплексном использовании перечисленных средств, учитывая этнологию заболевания, нарушение систем иммунитета и интерферонов (ИНФ), патогенетические сдвиги и конкретную симптоматику. Отсюда следует, что для рациональной терапии вирусных инфекций в принципе невозможно создать один препарат универсального действия, т.к. они таят в себе опасность возникновения осложнений и/или развития хронических рецидивирующих форм заболевания.

В настоящее время все известные противовирусные средства, с помощью которых возможны терапия и неспецифическая профилактика различных инфекций, в соответствии с их химическим составом и механизмом действия целесообразно разделить на 4 основные группы:

- ✓ химиопрепараты;
- ✓ интерфероны;
- ✓ индукторы ИНФ;
- ✓ иммуномодуляторы.

К химиопрепаратам главным образом относятся средства этиотропной терапии. ИНФ и их индукторы обладают комбинированным эффектом (этиотропным и иммуномодулирующим), а иммуномодуляторы используются для иммунотерапии и иммунокоррекции.

Индукторы интерферонов представляют собой весьма разнородное по составу семейство высоко- и низкомолекулярных природных и синтетических соединений, объединенных способностью вызывать в организме образование собственного (эндогенного) интерферона.

Индукторы интерферонов обладают антивирусными, иммуномодулирующими и другими характерными для интерферона эффектами.

Классификация индукторов интерферона, пригодных для клинического использования

Химическая природа	Препарат
А. Синтетические соединения	
- Низкомолекулярные (ароматические углеводы): флуореноны, акриданоны	Амиксин, Циклоферон, Неовир
- Полимеры	Полудан, Полигуацил, Ампилиген
Б. Природные соединения	
- Низкомолекулярные: полифенолы (производные госсипола)	Мегасин, Кагоцел, Саврац, Рогасин
- Полимеры: двуспиральные РНК	Ларифан, Ридостин

В настоящее время есть все основания полагать, что в недалеком будущем область клинического применения индукторов интерферонов будет значительно расширена, и данные препараты смогут, подобно интерферонам, использоваться при ОРВИ, герпесе, вирусных гепатитах, ВИЧ-инфекции, энцефалитах, бешенстве, а также для предупреждения вторичных вирусных осложнений, возникающих в результате применения цитостатиков и иммунодепрессантов.

Индукторы интерферона относятся к новому поколению лекарственных препаратов. Применение данных препаратов имеет ряд преимуществ перед рекомбинантными интерферонами:

- Индукторы интерферонов не обладают антигенностью.
- Естественный (но стимулированный) биосинтез эндогенного интерферона не вызывает гиперинтерферонемии, которая нередко возникает при использовании рекомбинантных интерферонов и приводит к тяжелым побочным явлениям.
- Однократное введение индукторов интерферона обеспечивает длительную циркуляцию интерферона на терапевтическом уровне. Для достижения такого уровня экзогенных интерферонов требуется многократное введение высоких доз рекомбинантных интерферонов. Некоторые индукторы интерферона обладают уникальной способностью запускать биосинтез интерферона в определенных популяциях клеток, что имеет существенные преимущества перед поликлональной стимуляцией иммуноцитов рекомбинантными интерферонами.
- Индукторы интерферона обладают иммуномодулирующими свойствами и сочетаются не только с рекомбинантными интерферонами, но и с другими противовирусными препаратами, вызывая при этом синергидный эффект при сочетанном применении.

- Широко применяемые рекомбинантные интерфероны являются препаратами α -интерферона, что значительно ограничивает их противовирусные свойства, т.к. для эффективной противовирусной защиты необходимо наличие всех трех классов интерферонов, синтез которых и вызывается применением индукторов интерфероногенеза.

Гормон роста

Гормон роста (соматотропный гормон) – белок, секретируемый передней долей гипофиза позвоночных животных. Его наличие в экстрактах из гипофиза было отмечено в 1921 г. Эвансом и Дж. Лонгом, но лишь через два десятилетия в 1944 г. он был получен в виде очищенного препарата, а в 1948 г. – в кристаллическом виде.

В гипофизе человека содержится от 3,7 до 6 мкг гормона роста, он представлен одной полипептидной цепочкой из 191 аминокислотного остатка.

Гормон роста обладает ярко выраженным анаболическим действием и влияет на все клетки организма, повышая в них уровень биосинтетических процессов, усиливает биосинтез белков, ДНК, РНК и гликогена, способствует мобилизации жиров из жировых депо и ускоряет распад высших жирных кислот и глюкозы. Соматотропный гормон улучшает функции почечных канальцев и нормализует минеральный и водный обмен организма, что способствует росту организма, но, в конечном счете, действие гормона гораздо шире, нежели только регуляция роста. Исследования на молекулярном уровне показали, что СТГ стимулирует действие РНК-полимераз и полирибосомного аппарата клетки. Как свидетельствуют опыты с меченым фосфором, самым ранним эффектом действия гормона роста является биосинтез в ядрах клеток предшественников мРНК и рРНК. Вместе с тем велико его влияние и на проницаемость клеточных стенок, т.к. фонд внутриклеточных аминокислот в присутствии СТГ значительно возрастает, что способствует новообразованию белка. СТГ повышает содержание в крови особых стимулирующих рост факторов – соматомединов.

Гормон роста человека, синтезированный в специально сконструированных клетках бактерий, имеет очевидные преимущества: доступен в больших количествах, его препараты являются биохимически чистыми и свободными от вирусных загрязнений. Биосинтез соматотропина был осуществлен Гедделем с сотрудниками. Поскольку при биосинтезе ДНК на мРНК гормона с последующим превращением ее в двухнитевую форму получается ген, кодирующий предшественник соматотропина, который расщепляется в бактериальных клетках с образованием активного гормона, исследователи избрали следующий подход. На первом этапе клонировали двухнитевую ДНК-копию мРНК и расщеплением рестрикционными эндонуклеазами получили последовательность, которая кодирует всю аминокислотную последовательность гормона, за исключением первых 23 аминокислот. Затем клонировали синтетический полинуклеотид, соответствующий аминокислотам от 1-й до 23-й и, наконец, два полученных фрагмента объединили вместе, и «подстро-

или» к паре промоторов и участку связывания рибосом. Конечный выход гормона составил 2,4 мкг на 1 мл культуры или 1% от растворенных белковых клеток этого генетически сконструированного штамма *E. coli*.

Синтезированный в бактериях гормон обладал нужной молекулярной массой и не был связан с каким-либо бактериальным белком, от которого его необходимо было бы отщепить. Однако синтетический гормон содержал на N-конце полипептидной цепи дополнительный остаток метионина. Эта лишняя аминокислота удалялась при длительном выращивании кишечной палочки. В июне 1978 г. исследователи компании «Генентек» представили данные, доказывающие, что соматотропин с дополнительным остатком метионина, синтезированный в генетически сконструированных клетках бактерий, обладает биологической активностью нативного гормона. Они провели сравнение стимуляции роста крыс с удаленным гипофизом гормоном роста, синтезированным в клетках бактерий, и препаратом, полученным из гипофиза человека. Прирост массы и рост больших берцовых костей был одинаковым как для обоих препаратов, так и для их смеси.

Инсулин

Инсулин (от гист. *Insulae pancreaticaе* – панкреатические островки) – белково-пептидный гормон, синтезируемый в β -клетках островков поджелудочной железы; является универсальным анаболическим гормоном, необходимым для роста и развития организма, подобно соматотропному гормону гипофиза, синергистом которого в этом отношении он является. Одним из наиболее ярких эффектов инсулина служит его гипогликемическое действие.

Инсулин – один из наиболее полно изученных гормонов поджелудочной железы. Действие данного гормона связано с регуляцией содержания сахара в крови. Считают, что инсулин осуществляет вспомогательную функцию при переносе глюкозы из крови через стенки сосудов к мускульной ткани, где глюкоза расходуется для энергетических целей, или к клеткам печени, где из глюкозы синтезируется резервный полисахарид – гликоген. Предполагают, что инсулин способствует удалению глюкозы из крови в результате его специфической ориентации на поверхности клеточной оболочки, что облегчает проникновение через нее глюкозы из крови. При недостатке инсулина концентрация глюкозы в крови начинает повышаться, т.к. глюкоза не может свободно диффундировать внутрь клеток. В последнее время считают, что инсулину принадлежит важная роль в регуляции биосинтеза глюкозы в организме.

Структура инсулина была установлена Сенджером. Инсулин представляет собой циклический гетерогенный пептид, состоящий из двух цепей, соединенных двумя сульфидными мостиками. В одной из цепей, кроме того, имеется внутренний дисульфидный мостик. В цепи А содержится 21, а в цепи В – 30 аминокислотных остатков.

Со времени проведения первых исследований по использованию инсулина для лечения диабета в 1922 г. этот гормон выделяли из поджелудочной железы животных (коров и свиней).

Существует несколько причин, по которым целесообразна разработка методов крупномасштабного производства и выпуск на рынок инсулина человека: среди них коммерческие соображения и эмоциональные факторы, и потребности развития науки, и возможные преимущества при лечении.

Инсулин, как коров, так и свиней немного отличается по аминокислотной последовательности от инсулина человека. Особенно близки инсулины человека и свиньи: у последнего лишь С-концевой треонин В-цепи заменен на аланин. Инсулины коровы и человека различаются по трем аминокислотным остаткам, и именно этими различиями определяется повышенная иммуногенная активность инсулина коровы в сравнении с инсулином свиньи.

Почти у всех больных, которых лечат обычным методом, т.е. вводят им инсулин коровы, в крови появляются антитела к инсулину. Антигенные свойства инсулина частично определяются примесями в его препаратах. Скорее всего, именно образованием антител к инсулину объясняются некоторые незначительные побочные эффекты при инъекциях инсулина коровы, например, атрофия подкожной жировой прослойки. В случае высокоочищенного инсулина свиньи такие эффекты отсутствуют. Далее антитела к инсулину инактивируют его в кровотоке, так что больному приходится вводить большие дозы, чем это необходимо. Антитела влияют и на продолжительность биологического действия введенного инсулина. Можно предположить, что инсулин человека будет еще менее иммуногенным, чем инсулин свиньи.

В связи с тем, что число больных диабетом и соответственно потребность в инсулине постоянно растут, то вполне возможно, что доступность его в будущем уменьшится из-за нехватки исходного сырья – поджелудочной железы животных. Кроме того, из-за чисто эмоциональных факторов лучше использовать инсулин человека, чем какого-либо животного.

Ряд производителей инсулина во главе с фирмой «Eli Lilly and Co» использовали как основу для производства инсулина человека технологию рекомбинантных ДНК. Согласно технологической схеме процесса, разработанного «Eli Lilly» в сотрудничестве с фирмой «Genentech Inc.», на первом этапе воссоздают последовательность ДНК по аминокислотной последовательности инсулина, отдельно синтезируя искусственные гены его А- и В-цепей. На 5'-конце каждого из них располагается кодон метионина (который в синтезированном белке оказывается N-концевым), а на 3'-конце – терминирующие последовательности. Каждый из генов встраивается затем в ген β -галактозидазы плазмид, а их, в свою очередь, вводят в клетки *E. coli*. Поскольку бактерии растут на питательной среде с галактозой, то в них индуцируется биосинтез β -галактозидазы, а вместе с ней А- и В-цепей инсулина, присоединенных через остаток метионина. После лизиса бактерий и обработки бромцианом, который специфически расщепляет белки по остатку метионина, цепи инсулина отделяют от β -галактозидазы (инсулин метионина не содержит). Затем проводят очистку цепей и их объединение, в результате че-

го образуется нативный двухцепочечный инсулин. Было показано, что он не содержит белков *E. coli*, эндотоксинов и пирогенных веществ, по физическим свойствам неотличим от инсулина из поджелудочной железы человека и в тест-системе проявляет полную биологическую активность.

Впоследствии был испытан альтернативный метод: синтезировали ген молекулы-предшественника, проинсулина, который вводили в *E. coli*. После очистки проинсулина его расщепляли трипсином и β -карбоксипептидазой и получили нативный инсулин.

Инсулин человека, полученный с помощью *E. coli*, оказался первым «генно-инженерным белком», испытанным на людях. В опытах со здоровыми добровольцами было установлено, что он безопасен, во всяком случае при краткосрочном применении (не вызывает аллергических и иных нежелательных реакций) и обладает практически одинаковой с инсулином свиньи способностью снижать уровень глюкозы в крови при введении его под кожу и внутривенно. В настоящее время такой инсулин человека получают множество диабетиков во всем мире. Этому предшествовали клинические испытания, в ходе которых изучались изменения метаболизма и иммунологические эффекты. Сегодня это уже обычный метод лечения.