

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «СЕВЕРО-ОСЕТИНСКАЯ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Кафедра Фармации

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
ПО БИОТЕХНОЛОГИИ
(ДЛЯ ПРЕПОДАВАТЕЛЕЙ)**

основной профессиональной образовательной программы высшего образования –
программы специалитета по специальности 33.05.01 Фармация,
утвержденной 30.03.2022 г.

Специальность 33.05.01 Фармация (специалитет)

Курс 5

Семестр 9

Владикавказ , 2022 г.

Разработчики:

Заведующая кафедрой фармации, к. фарм. н., доцент Бидарова Ф.Н.

Ст. преподаватель кафедры фармации, к.б.н. Караева А.М.

Рецензенты:

Заведующая сети аптек «Лада» ИП Сабеева А.Н.

Доцент кафедры фармации ФГБОУ ВО СОГМА Минздрава России, к.фарм.н., Бозрова Д.М.

Содержание

Занятие № 1. ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Введение в биотехнологию. Основы фармацевтической биотехнологии. Биосистемы, используемые в БТ. ДНК, РНК, синтез белка. Основы получения рекомбинантных ДНК.....	4
Занятие № 2. ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Общая характеристика биотехнологического процесса.....	12
Занятие №3. ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Геномика и протеомика. Антисмысловые олигонуклеотиды. Конформационные болезни.....	17
Занятие № 4. ТЕМА ЗАНЯТИЯ: GMP, GLP и GSP в биотехнологии. Экологические аспекты биотехнологии.....	24
Занятие № 5. ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Экологические аспекты биотехнологии.....	30
Занятие № 6. ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Модуль № 1 по темам 1-5.....	36
Занятие № 7. ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Иммунобиотехнология. Вакцины. Сыворотки. Цитокины.....	40
Занятие № 8. ТЕМА ЗАНЯТИЯ: ЛВ и ЛС, полученные на основе рекомбинантных м/о: моноклональные антитела, тромболитики и антикоагулянты.....	46
Занятие № 9. ТЕМА ЗАНЯТИЯ: ЛВ и ЛС, полученные на основе рекомбинантных м/о: гормональные препараты. Стероидные гормоны.....	52
Занятие № 10. ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Биотехнология аминокислот, витаминов и коферментов.....	63
Занятие № 11. ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Модуль № 2 по темам 6-10.....	69
Занятие № 12. ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Антибиотики. Общая характеристика. Общая схема получения антибиотиков.....	77
Занятие № 13. ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Частная технология антибиотиков.....	84
Занятие № 14. ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Ферменты. Имобилизованные ферменты.....	91
Занятие № 15. ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Препараты нормофлоры. Пребиотики. Производство пробиотиков.....	97
Занятие № 16. ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Биопрепараты растительного происхождения.....	103
Занятие № 17. ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Модуль № 3 по темам: 12-16.....	110
Занятие №18 ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Модуль №4 ПО ПРАКТИЧЕСКИМ НАВЫКАМ.....	123

Занятие № 1.

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: «Введение в биотехнологию. Основы фармацевтической биотехнологии. Биосистемы, используемые в БТ. ДНК, РНК, синтез белка. Основы получения рекомбинантных ДНК».

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: студенты должны изучить введение в дисциплину «Биотехнология», биообъекты, используемые в биотехнологии, характеристику прокариотических и эукариотических клеток, изучить генную инженерию, этапы и особенности биотехнологического процесса, биосистемы в биотехнологии, основы получения рекомбинантных ДНК.

ЗНАЧИМОСТЬ: в биотехнологии используют последние достижения науки: молекулярную биологию, генную инженерию, физику и химию ферментов и т.д. Биотехнология, вытесняя традиционные технологии, открывает принципиально новые возможности. Большинство биотехнологических ЛС получают методами генной инженерии. Поэтому будущий специалист должен знать основы фармацевтической биотехнологии, ориентироваться в основах генной инженерии, а также знать биосистемы, используемые в генной инженерии, и биотехнологии в целом.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЗАНЯТИЯ (в академических часах) – 4.

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ: 527 аудитория, 2 корпус.

ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ И БЮДЖЕТ УЧЕБНОГО ВРЕМЕНИ:

1. Организационный момент 5 мин.
2. Тестовый контроль входного уровня знания 15 мин.
3. Опрос, дискуссия, разбор ситуационной задачи на занятии 65 мин.
4. Перерыв 10 мин.
5. Опрос, дискуссия, самостоятельное решение ситуационной задачи 65 мин.
6. Тестовый контроль исходного уровня знания 15 мин.
7. Подведение итогов занятия, задание к следующему занятию 5 мин.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЗАНЯТИЯ:

Контрольные вопросы:

1. Понятия биотехнология, биообъект, эукариоты, прокариоты, термофилы, мезофиллы, психрофилы, эубактерии и археобактерии.
2. История развития БТ.
3. Связь БТ с другими науками.
4. Этапы биотехнологического процесса.
5. Сравнительная характеристика и основные отличия прокариот и эукариот.
6. Характеристика *E. coli* как биообъект БТ.
7. Характеристика *Saccharomyces cerevisiae* как биообъект БТ.
8. Понятия ДНК, Транскрипция, Трансляция, Репликация, Гены, Пульс – электрофорез, ДНК-футпринтинг, Денатурация, Ренатурация, Генотип, Фенотип, Сайты, Экзоны, Интроны, Сплайсинг, Антикодон, Кодон, Оперон.

9. Синтез ДНК.
10. Универсальные аминокислоты.
11. ДНК, РНК; типы РНК.
12. Генетическая информация, методы ее получения, Геном человека.
13. Генная инженерия, задачи.
14. Клонирование, этапы.
15. Ферменты рестрикции, плазмиды, бактериофаги, бакмиды, косимды, фазмиды.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ВХОДНОГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ:

1. Что присуще м/о – E. coli

- а) грамотрицательная палочка
- б) размер менее 1 мкм
- в) непатогенная бактерия
- г) размер более 1 мкм
- д) патогенная бактерия

2. Эубактерии населяют:

- а) почву
- б) болота
- в) воду
- г) океанские глубины
- д) горячие кислые источники

3. Установите соответствие:

- а) термофилы
- б) мезофилы
- в) психрофилы
- 1) 45 -90° С
- 2) -5 - 35° С
- 3) 10 -47° С

4. Отличительные особенности эукариотической клетки:

- а) большой размер
- б) наличие ядра
- в) ригидная клеточная стенка
- г) отсутствие субклеточных органелл
- д) хромосомная ДНК в цитоплазме

5. Типичные направления использования микроорганизмов – психрофилов:

- а) источники генов, кодирующих термолабильные вещества
- б) источники генов, кодирующих термостабильные вещества
- в) утилизация токсических отходов
- г) производство спирта этилового
- д) производство биогаза

6. Начало послепастеровского периода в развитии биотехнологии относят к:

- а) 1941 г.
- б) 1866 г.
- в) 1975 г.
- г) 1982 г.

7. Открыл микроорганизмы и ввел понятие биообъекта:

- а) Д. Уотсон
- б) Ф. Крик
- в) Ф. Сенгер
- г) Л. Пастер

8. Период антибиотиков в развитии биотехнологии относится к:

- а) 1866-1940 гг.
- б) 1941-1960 гг.
- в) 1961-1975 гг.
- г) 1975-2001 гг.

9. Структуру белка инсулина установил:

- а) Д. Уотсон
- б) Ф. Крик
- в) Ф. Сенгер
- г) Л. Пастер

10. Разработка технологии рекомбинантных ДНК относится к периоду развития биотехнологии:

- а) антибиотиков
- б) допастеровскому
- в) послепастеровскому
- г) управляемого биосинтеза

11. Получение хлебопекарных и пивных дрожжей относится к периоду развития биотехнологии:

- а) допастеровскому
- б) послепастеровскому
- в) антибиотиков
- г) управляемого биосинтеза
- д) новой и новейшей биотехнологии

12. Производство этанола относится к периоду развития биотехнологии:

- а) допастеровскому
- б) послепастеровскому
- в) антибиотиков
- г) управляемого биосинтеза
- д) новой и новейшей биотехнологии

13. Период развития производства витаминов относится к периоду развития биотехнологии:

- а) допастеровскому
- б) послепастеровскому
- в) новой и новейшей биотехнологии
- г) управляемого биосинтеза

14. Получение вирусных вакцин относится к периоду развития биотехнологии:

- а) допастеровскому
- б) послепастеровскому
- в) антибиотиков
- г) управляемого биосинтеза

д) новой и новейшей биотехнологии

15. Первая рекомбинантная ДНК получена:

а) в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком

б) в 1972 г. П. Бергом

в) в 1963 г. М. Ниренбергом

г) в 1953 г. Ф. Сенгером

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5
Правильный вариант ответа	А Б В	А В	А – 1 Б – 3 В - 2	А Б	В
	6	7	8	9	10
	Б	Г	Б	В	А
	11	12	13	14	15
	А	Б	Г	В	Б

РАЗБОР СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ НА ЗАНЯТИИ.

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

Проанализируйте данную ситуацию с точки зрения:

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

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

Все биообъекты можно подразделить на:

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

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

благодаря использованию методов мутагенеза и селекции. Методы современной селекции сочетаются с применением генной инженерии, которая манипулирует ДНК, изменяя либо число и порядок расположения генов, либо проводя внутригенные изменения. Важной характеристикой мутантов является их способность к реверсии (обратное мутирование). Типы мутаций: делеция, дупликация, амплификация и др. Проблема безопасности в работе с продуцентами на физическом уровне предполагает понижение давления внутри ферментера для предотвращения возможного выброса культуральной жидкости во внешнюю среду. На биологическом уровне это прежде всего неукоснительное соблюдение правил GMP, одновременно можно, например, сделать биообъект «капризным» в отношении компонентов питательной среды, тогда во внешней среде без них он существовать не сможет.

САМОСТОЯТЕЛЬНОЕ РАБОТА. РЕШЕНИЕ СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ.

Задача. В современной биотехнологии при создании ЛС особое место отводится генной инженерии, суть технологии которой заключается в искусственном соединении отдельных фрагментов ДНК *in vitro* с последующим введением изолированной ДНК в живую клетку с целью получения рекомбинантных белков. Для осуществления этого необходимы определенные условия, наличие транспортного устройства для внесения ДНК в клетку продуцента, использование ферментов для включения нового гена. Генная инженерия оперирует такими понятиями, как вектор, рестриктазы, липкие концы, сайт узнавания, лигазы, ген-маркер, компетентность клетки, экзон, интрон.

С представленных общих позиций по генной инженерии сформулируйте конкретные условия:

- расшифруйте понятие «вектор» и пути его введения в клетку;
- предложите ферменты, работающие в этой ситуации;
- предложите технику генно-инженерного эксперимента (стадии);
- сравните процесс образования мРНК у эукариот и прокариот.

Эталон ответа: Цели генной инженерии - создание новых продуцентов целевых продуктов (новые ЛС, диагностические и профилактические препараты). Суть технологии - соединение фрагментов ДНК *in vitro* с последующим введением изолированной ДНК в живую клетку посредством ферментов эндонуклеаз, в частности рестриктаз. Техника генно-инженерного эксперимента:

- Получение чужеродного фрагмента ДНК для последующей вставки его в клетку хозяина.
- Выделение плазмиды из клетки-донора (например, *E. coli*).
- Конструирование рекомбинантной плазмиды (вектора).

Вектор рекомбинант (плазида в виде фага или изолированной ДНК, или вируса) получают с помощью фермента рестриктазы, разрезающей фосфодиэфирные связи в строго определенном месте последовательности оснований нуклеотидной цепи (сайт узнавания). При этом образуется два липких конца. Далее следует стадия отжига - процесс смещения двух фрагментов ДНК, при котором восстанавливаются только водородные связи. Для восстановления фосфодиэфирных связей используют ферменты ДНК-лигазы, которые «сшивают, склеивают» молекулы ДНК.

- Включение вектора в клетку хозяина. Вектор включается в клетку хозяина при условии, если цитоплазматическая мембрана близко подходит к клеточной стенке, тогда вектор

проникает внутрь клетки через так называемые окошечки, которые образуются при обработке ее ферментами, в результате чего эта клетка становится компетентной.

- Отбор гибридных клонов. Проводят посев на питательную среду, содержащую, например, антибиотик бензилпенициллин. При этом вырастают только клоны, имеющие в своем геноме генмаркер, кодирующий синтез, например, фермента β -лактамазы. Генмаркер заранее внедряется в геном гибридной плазмиды. В процессе образования молекулы мРНК имеет место процесс сплайсинга (сращивания). У эукариот, в отличие от прокариот, ген представляет собой мозаичную структуру, содержащую наряду с экзонами (последовательности оснований, несущие информацию) интроны (последовательности оснований, не несущие информацию). Однако фермент РНК-полимераза катализирует транскрипцию как экзонов, так и интронов. В процессе сплайсинга у эукариот интроны с помощью ферментов вырезаются, а экзоны после удаления интронов сращиваются. При этом образуется функционирующая (зрелая) мРНК. У прокариот нет такого процесса (так как их гены не содержат интроны), и образующаяся в результате транскрипции молекула мРНК сразу же способна к функционированию.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ИСХОДЯЩЕГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ:

1. Азотистые основания соответствуют ДНК:

- а) аденин
- б) гуанин
- в) тимин
- г) цитозин
- д) урацил

2. Азотистые основания соответствуют РНК:

- а) аденин
- б) гуанин
- в) тимин
- г) цитозин
- д) урацил

3. Структурные гены, которые разделены кодирующими областями называются:

- а) интроны
- б) экзоны
- в) кодоны

4. Уникальная пространственная структура молекулы РНК определяет:

- а) процесс репликации
- б) генотип
- в) фенотип
- г) характер взаимодействия с другими молекулами и внешними условиями
- д) локализацию молекулы РНК

5. Сплайсинг:

- а) вырезание из предшественников мРНК экзонов и ковалентное соединение интронов с образованием зрелых молекул мРНК
- б) вырезание из предшественников мРНК интронов и ковалентное соединение экзонов с образованием зрелых молекул мРНК
- в) синтез зрелых молекул тРНК путем сшивки отдельных нуклеотидов «торец в торец»

г) вырезание из предшественников мРНК интронов и их ковалентное соединение с образованием зрелых молекул мРНК

6. Понятию «Биообъект в процессах биосинтеза» соответствует следующее определение:

- а) организм, на котором испытывают новые биологически активные вещества
- б) организм, вызывающий контаминацию биотехнологического оборудования
- в) фермент, используемый в аналитических целях
- г) организм, продуцирующий биологически активные соединения
- д) фермент – промышленный биокатализатор

7. Понятию «Биообъект в процессах биотрансформации» соответствует следующее определение:

- а) организм, на котором испытывают новые биологически активные вещества
- б) организм, вызывающий контаминацию биотехнологического оборудования
- в) фермент, используемый в аналитических целях
- г) организм, продуцирующий биологически активные соединения
- д) фермент – промышленный биокатализатор

8. Донор – это:

- а) биообъект, поставляющий материал для процесса производства лекарственных средств
- б) биообъект, поставляющий материал для процесса производства лекарственных средств без ущерба для своей жизнедеятельности
- в) биообъект, у которого забор материала для производства лекарственных средств оказывается несовместим с продолжением жизнедеятельности
- г) биообъект, поставляющий материал для очистки продуцентов

9. К прокариотам относятся:

- а) бактерии
- б) вирусы
- в) простейшие
- г) грибы

10. Клеточная стенка грамположительных бактерий и актиномицетов состоит из:

- а) хитина
- б) пептидогликана
- в) липополисахаридов
- г) целлюлозы
- д) белка

11. Клеточная стенка грамотрицательных бактерий состоит из:

- а) хитина
- б) пептидогликана
- в) липополисахаридов
- г) целлюлозы
- д) белка

12. Клеточная стенка плесневых грибов состоит из:

- а) пептидогликана
- б) липополисахаридов
- в) целлюлозы
- г) белка

д) хитина

13. Эукариотами являются:

- а) грибы
- б) эубактерии
- в) актиномицеты
- г) вирусы

14. Главный критерий отбора продуцента в качестве биообъекта:

- а) быстрое накопление биомассы
- б) устойчивость к заражению посторонней микрофлорой
- в) способность синтезировать целевой продукт
- г) способности расти на дешевых питательных средах
- д) секреция целевого продукта в культуральную жидкость

15. Донатор – это биологический объект:

- а) фермент-биокатализатор процесса биотрансформации
- б) поставляющий материал для процесса производства лекарственных средств
- в) поставляющий материал для процесса производства лекарственных средств без ущерба для своей жизнедеятельности
- г) поставляющий материал для процесса производства лекарственных средств с прекращением дальнейшей жизнедеятельности

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5
Правильный вариант ответа	А Б В Г	А Б В Г	Б	В	Б
	б	7	8	9	10
	Г	Д	Б	А	Б
	11	12	13	14	15
	В	Д	А	В	Г

ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАНЯТИЮ ПРЕПОДАВАТЕЛЯМ:

Основная:

1. Биотехнология. Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева – М.: «Академия», 2007. – С. 85-101, 182-191, 204-218.
2. Фармацевтическая биотехнология: Учебное пособие для студентов высших уч. заведений Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л., Михалева Л.К., Белова Л.С. Ростов-на-Дону Феникс Томск Издательство НТЛ Сибирский Государственный медицинский Университет, 2006. – 251 с.
3. Фармацевтическая биотехнология: рук. к практ. занятиям: учеб. пособие / С.Н. Орехов ; под ред. В.А. Быкова, А.В. Катлинского. – м.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – С. 123-142.
4. Фармацевтическая биотехнология: руководство к практическим занятиям: учеб. пособие /. 2-е изд., перераб. и доп. С.Н. Орехов М.: ГЭОТАР- Медиа, 2015. – 432 с.

Дополнительная:

5. Терминологический словарь по биотехнологии
6. Биология: учеб. пособие / Г.Г. Чебышев ; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 416 с.
7. Микробиология, вирусология и иммунология: рук. к лаб. занятиям: учеб. пособие / В.С. Сбойчакова; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 320 с.

8. Микробиология: учебник для студентов фармацевтических ВУЗов / А.А. Воробьев и др.; – М.: «Медицина», 2003. – 336 с.

Занятие № 2.

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: «Общая характеристика биотехнологического процесса».

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: студенты должны изучить биотехнологический процесс, как основу фармацевтической биотехнологии, оборудование, используемое в биотехнологическом процессе.

ЗНАЧИМОСТЬ: будущий специалист должен знать основы биотехнологического процесса, общие принципы и основные этапы биотехнологического производства, так как большое количество ЛП на сегодняшний день получаем методами биотехнологии.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЗАНЯТИЯ (в академических часах) – 4.

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ: 527 аудитория, 2 корпус.

ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ И БЮДЖЕТ УЧЕБНОГО ВРЕМЕНИ:

1. Организационный момент 5 мин.
2. Тестовый контроль входного уровня знания 15 мин.
3. Опрос, дискуссия, разбор ситуационной задачи на занятии 65 мин.
4. Перерыв 10 мин.
5. Опрос, дискуссия, самостоятельное решение ситуационной задачи 65 мин.
6. Тестовый контроль исходного уровня знания 15 мин.
7. Подведение итогов занятия, задание к следующему занятию 5 мин.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЗАНЯТИЯ:

Контрольные вопросы:

1. Стадии биотехнологического процесса.
2. Составы питательных сред для культивирования микроорганизмов.
3. Приготовление посевного материала и культивирование микроорганизмов.
4. Оборудование, используемое в биотехнологии: биореакторы, УЗ-моечные машины; Машины используемые в производстве инъекционных ЛФ и некоторое другое оборудование.
5. Методы повышения эффективности ферментации.
6. Методы контроля биомассы и количества клеток при культивировании. Апоптоз и некроз.
7. Выделение продуктов биосинтеза и получение конечного коммерческого продукта.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ВХОДНОГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ:

1. Биореакторы, через которые для перемешивания содержимого пропускают воздух называются:

- а) эрлифтные

- б) барботажные колонны
 - в) реакторы с механическим перемешиванием
- 2. Перемешивание культуральной среды вместе с клетками восходящими потоками воздуха, равномерно циркулируя по всему объему, осуществляется в:**
- а) эрлифтные
 - б) барботажные колонны
 - в) реакторы с механическим перемешиванием
- 3. Процесс ферментации контролируют по:**
- а) рН
 - б) температуре
 - в) концентрации растворенного водорода
- 4. Описание морфологических, физиологических характеристик питательных сред, условий выращивания и срока хранения изложены в:**
- а) ГФ 12 издания
 - б) паспорте на штамм культуры
 - в) справочной и научной литературе
- 5. Режим хранения культур – продуцентов предполагает:**
- а) замораживание при температуре ниже – 20° С
 - б) лиофильное высушивание
 - в) консервирование
- 6. Участок разделения культуральной жидкости как элемент биотехнологической системы относится к ступени иерархии:**
- а) первой
 - б) второй
 - в) третьей
 - г) четвертой
- 7. Технологический воздух для биотехнологического производства стерилизуют:**
- а) УФ-облучением
 - б) нагреванием
 - в) фильтрованием
 - г) радиацией в малых дозах
 - д) антибиотическими веществами
- 8. Фотоафототрофы – организмы, которые для роста и развития:**
- а) нуждаются в факторах роста
 - б) используют диоксид углерода и минеральные вещества
 - в) используют органические вещества
 - г) используют энергию окисления неорганических веществ
- 9. Донатор – это биологический объект:**
- а) фермент-биокатализатор процесса биотрансформации
 - б) поставляющий материал для процесса производства лекарственных средств
 - в) поставляющий материал для процесса производства лекарственных средств без ущерба для своей жизнедеятельности
 - г) поставляющий материал для процесса производства лекарственных средств с прекращением дальнейшей жизнедеятельности
- 10. Хемолитотрофы – организмы, которые для роста и дыхания:**

- а) нуждаются в факторах роста
- б) используют органические вещества
- в) используют энергию окисления неорганических веществ
- г) используют энергию света

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5
Правильный вариант ответа	Б	А	А Б В	А	Б
	6	7	8	9	10
	Б	В	Б	Г	В

РАЗБОР СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ НА ЗАНЯТИИ.

Задача. Стадия ферментации - центральная среди этапов промышленного производства. Под ферментацией понимают всю совокупность последовательных операций от внесения в заранее приготовленную и термостатированную среду инокулята до завершения процессов роста, биосинтеза или биотрансформации.

1. Какие два вида ферментации вам известны?
2. С помощью какого оборудования осуществляется ферментация? Его основные элементы, схематическое изображение.
3. Как технологическое оформление процессов промышленной биотехнологии зависит от отношения микроорганизма-продуцента к кислороду? Три группы биореакторов.
4. Способы управления процессом ферментации

Эталон ответа. Поверхностная и глубинная ферментация. Ферментация проходит в специальных емкостях, называемых ферментерами или биореакторами. Основными элементами ферментера являются двойные стенки, промежуток между которыми заполняется охлаждающей или нагревающей жидкостью, входные отверстия для газовых и жидких потоков, система контроля за составом питательной среды и условиями внутри реактора. Технологическое оформление процессов промышленной биотехнологии в значительной мере определяется отношением микроорганизма-продуцента к кислороду. При использовании аэробных культур ферментационное оборудование и нормы технологического режима подбираются таким образом, чтобы массообмен (перенос кислорода из газовой в жидкую фазу) обеспечивал поступление кислорода к клеткам в количествах, необходимых и оптимальных для данной культуры в данной фазе роста. Промышленное использование факультативных анаэробов не ставит задачи абсолютного исключения кислорода из среды. В начальной фазе этих процессов требуется лишь удалить кислород из газовой фазы над культуральной жидкостью, что может быть достигнуто введением инертного газа или просто вытеснением воздуха углекислотой, выделяемой клетками при метаболизме. Технологическое оформление строго анаэробных процессов сложнее, чем для процессов брожения, так как в этом случае необходимо полностью исключить возможность попадания кислорода в газовую, а оттуда и в жидкую среду.

Биореакторы подразделяют на три основные группы:

1. реакторы с механическим перемешиванием;

2. барботажные колонны, через которые для перемешивания содержимого пропускают воздух;

3. эрлифтные реакторы с внутренней или внешней циркуляцией; перемешивание и циркуляция культуральной среды в них обеспечивается потоком воздуха, за счет которого между верхним и нижним слоями культуральной среды возникает градиент плотности.

Простейшим вариантом управления стадией ферментации в периодическом режиме является изменение концентраций компонентов среды и ее рН, а также введение необходимых добавок по заранее разработанной программе, реализуемой технологом в каждом цикле ферментации. Важно также поддерживать определенный состав питательной

среды. В непрерывных процессах биосинтеза задача технолога сводится к поддержанию концентрации всех питательных веществ (и кислорода) и дозированному введению кислоты или щелочи для рН-стабилизации системы разработанной программы, реализуемой технологом в каждом цикле ферментации. Важно также поддерживать определенный состав питательной среды. В непрерывных процессах биосинтеза задача технолога сводится к поддержанию концентрации всех питательных веществ (и кислорода) и дозированному введению кислоты или щелочи для рН-стабилизации системы на заданном уровне.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА. РЕШЕНИЕ СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ.

Задача. Установите правильную последовательность стадий и операций технологического процесса, представленных на схеме, заполните недостающие операции стадии «Выделение целевого продукта». Предложите методы и аппаратное оснащение операции «Дезинтеграция клеток».

1. Подготовка и стерилизация газового потока
2. Подготовка и стерилизация оборудования и коммуникаций
3. Подготовка и стерилизация субстрата
4. Разделение культуральной суспензии
5. Обработка культуральной суспензии
6. Анализ целевого продукта
7. Дезинтеграция клеток
8. Выделение индивидуального вещества
9. Культивирование биообъекта
10. Подготовка биообъекта
11. Сушка целевого продукта
12. Фасовка, упаковка, маркировка лекарственной субстанции
13. Выделение целевого продукта
14. Биологическая очистка отходов

Эталон ответа. Последовательность стадий технологического процесса: 10, 2, 3, 1, 9, 13, операции: 5, 4, 7, отделение экстракта от разрушенных клеток, 8, 11, 6, 12, 14.

Операция «Дезинтеграция (разрушение клеток)» осуществляется при выделении внутриклеточного метаболита (целевого продукта) физическими, химическими, химико-ферментативными методами в реакторах-дезинтеграторах с мешалкой, шаровых мельницах, холодильных установках и т. д.

Физические методы: обработка ультразвуком (с помощью вращающихся лопастей; продавливанием через узкое отверстие под давлением; раздавливанием замороженной клеточной массы; осмотическим шоком; замораживанием-оттаиванием; декомпрессией)

Химические методы: обработка клеток толуолом, бутанолом.

Химико-ферментативные методы: обработка клеток грам(-) лизоцимом в присутствии ЭДТА; обработка дрожжей зимолазой; обработка ПАВ; обработка клеток бактерий антибиотиками; заражение бактериофагами.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ИСХОДЯЩЕГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ:

1. Колоночный биореактор для иммобилизации целых клеток должен отличаться от реактора для иммобилизации ферментов

- а) большим диаметром колонки
- б) отводом газов
- в) более быстрым движением растворителя
- г) формой частиц нерастворимого носителя
- д) размерами частиц нерастворимого носителя

2. Регулируемая ферментация в процессе биосинтеза достигается при способе

- а) периодическом
- б) непрерывном
- в) отъемно-доливном
- г) полупериодическом
- д) циклическом

3. Борьба с фаговой инфекцией в цехах ферментации антибиотической промышленности наиболее рациональна путем

- а) ужесточения контроля за стерилизацией технологического воздуха
- б) ужесточения контроля за стерилизацией питательной среды
- в) получения и использования фагоустойчивых штаммов биообъекта
- г) ужесточения контроля за стерилизацией оборудования
- д) ужесточения контроля за фильтрационными установками

4. Способ сохранения нужной биотехнологу продуктивности культур микроорганизмов

- а) в холодильнике
- б) под слоем минерального масла
- в) в сыпучих материалах
- г) сублимационное высушивание
- д) криохранение

5. Преимущество клеточной инженерии перед скрещиванием:

- а) направленные комбинации генов
- б) быстрая селекция новых вариантов
- в) преодоление видовых и родовых барьеров
- г) мутационные изменения генома

6. Основные методы совершенствования биообъекта в современной биотехнологии:

- а) индуцированный мутагенез
- б) селекция

- в) генная инженерия
- г) интродукция растений

7. Скрининг лекарственных средств:

- а) совершенствование путем химической трансформации
- б) совершенствование путем биотрансформации
- в) поиск и отбор («просеивание») природных структур
- г) полный химический синтез
- д) изменение пространственной конфигурации природных структур

8. Роль индуктора могут выполнять:

- а) субстраты
- б) конечный продукт реакции
- в) первичные метаболиты
- г) вторичные метаболиты

9. Оператор – это:

- а) начальный участок транскриптона
- б) стартовая точка транскрипции
- в) начальный участок экзона
- г) участок ДНК, связывающий белки-регуляторы транскрипции в прокариотической клетке
- д) участок ДНК, связывающий белки-регуляторы транскрипции в эукариотической клетке

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Правильный вариант ответа	Б	Г	В	Г	В	В	В	А	Г

ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАНЯТИЮ ПРЕПОДАВАТЕЛЯМ:

Основная:

1. Биотехнология. Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева – М.: «Академия», 2007. – С. 85-101, 182-191, 204-218.
2. Фармацевтическая биотехнология: Учебное пособие для студентов высших уч. заведений Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л., Михалева Л.К., Белова Л.С. Ростов-на-Дону Феникс Томск Издательство НТЛ Сибирский Государственный медицинский Университет, 2006. – 251 с.
3. Фармацевтическая биотехнология: рук. к практ. занятиям: учеб. пособие / С.Н. Орехов ; под ред. В.А. Быкова, А.В. Катлинского. – м.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – С. 123-142.
4. Фармацевтическая биотехнология: руководство к практическим занятиям: учеб. пособие / . 2-е изд., перераб. и доп. С.Н. Орехов М.: ГЭОТАР- Медиа, 2015. – 432 с.

Дополнительная:

5. Терминологический словарь по биотехнологии
6. Биология: учеб.пособие / Г.Г. Чебышев ; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 416 с.
7. Микробиология, вирусология и иммунология: рук. к лаб. занятиям: учеб. пособие / В.С. Сбойчакова; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 320 с.

8. Микробиология: учебник для студентов фармацевтических ВУЗов / А.А. Воробьев и др.; – М.: «Медицина», 2003. – 336 с.

Занятие № 3.

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: «Геномика и протеомика. Антисмысловые олигонуклеотиды. Конформационные болезни».

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: студенты должны изучить геномику и протеомику, их взаимосвязь между собой и значение в фармацевтической биотехнологии.

ЗНАЧИМОСТЬ: будущий специалист должен знать о существовании конформационных болезнях, способах их исследования и возможных причинах возникновения; о создании антисмысловых олигонуклеотидов и препаратов на их основе.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЗАНЯТИЯ (в академических часах) – 4.

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ: 527 аудитория, 2 корпус.

ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ И БЮДЖЕТ УЧЕБНОГО ВРЕМЕНИ:

1. Организационный момент 5 мин.
2. Тестовый контроль входного уровня знания 15 мин.
3. Опрос, дискуссия, разбор ситуационной задачи на занятии 65 мин.
4. Перерыв 10 мин.
5. Опрос, дискуссия, самостоятельное решение ситуационной задачи 65 мин.
6. Тестовый контроль исходного уровня знания 15 мин.
7. Подведение итогов занятия, задание к следующему занятию 5 мин.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЗАНЯТИЯ:

Контрольные вопросы:

1. Генетика. История развития.
2. Геномика. Цели и задачи геномики.
3. Протеомика.
4. Связь протеомики и геномики.
5. Сравнительная геномика.
6. Структурная геномика.
7. Функциональная геномика.
8. Таргетный скрининг.
9. Секвенирование генома.
10. Проект «геном человека».
11. Генотерапия.
12. Антисмысловые олигонуклеотиды.
13. Конформационные болезни.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ВХОДЯЩЕГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ:

1. Установление степени близости по последовательности нуклеотидов в генах, полученных из разных источников – это:

- а) геномика сравнительная;
- б) геномика структурная;
- в) геномика функциональная.

2. Установление полной последовательности нуклеотидных пар в гене, хромосоме – это:

- а) геномика сравнительная;
- б) геномика структурная;
- в) геномика функциональная.

3. Определение функций белка, кодируемого каждым отдельным геном, и роли этого белка в метаболизме – это:

- а) геномика сравнительная;
- б) геномика структурная;
- в) геномика функциональная.

4. Секвенирование – это:

- а) определение последовательности нуклеотидных пар;
- б) определение существенности нуклеотидных пар;
- в) отбор и поиск генов.

5. Международный проект «Геном человека» был завершен в:

- а) 2003 году;
- б) 2000 году;
- в) 1993 году.

6. Международный проект «Геном человека» утвержден в:

- а) 1953 г.
- б) 1972 г.
- в) 1963 г.
- г) 1990 г.
- д) 2005 г.

7. Целью проекта «Геном человека» является:

- а) установление структуры ДНК
- б) разработка технологии рекомбинантных ДНК
- в) полное секвенирование генома человека
- г) идентификация и клонирование генов наследственных заболеваний
- д) клонирование человека

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5	6	7
Правильный вариант ответа	А	Б	В	А	А	Б	Г

РАЗБОР СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ НА ЗАНЯТИИ.

Задача. В процессе биотехнологического процесса из ядра клетки патогенного

для человека микроорганизма выделен геном, в котором был выбран определенный ген (участок нуклеиновой кислоты микроорганизма). Данный ген размножен с применением ПЦР. В базе антимикробных агентов выбран один, взаимодействие с которым подавило активность гена наиболее эффективно. Затем выбранный из антимикробных агент был опробован в действии на целую микробную клетку исходного микроорганизма, вызвав выраженное подавление ее жизнедеятельности.

1. Определите вид скрининга антимикробной структуры для конкретного патогена.
2. Выделите основные этапы скрининга, определите их значение в ходе скрининга.
3. Для чего применяется данный вид скрининга антимикробной структуры.
4. Что послужит продолжением указанного процесса?

Эталон ответа. В данном примере применяется таргетный скрининг.

Последовательные этапы таргетного скрининга:

- Выбор гена. На первой стадии осуществляется выбор гена с использованием данных биоинформатики о роли гена и значении его продукта экспрессии в метаболизме клетки, а также структурной и сравнительной геномики.
- Амплификация гена. На втором этапе ДНК выбранного гена амплифицируют (преумножают) с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с целью получения достаточного для дальнейших исследований количества гена. Нарботанная матрица ДНК подвергается транскрипции и трансляции в бесклеточной рибосомно-матричной системе с целью получения достаточного количества генного продукта (таргета).
- Определение специфической активности таргета в бесклеточной системе. Природные метаболиты и синтетические вещества с антимикробным действием из библиотек антимикробных агентов испытываются на способность подавлять активность таргета.
- Выбор антимикробного агента, обладающего наиболее высокой аффинностью (избирательностью) к таргету.
- Исследование механизма взаимодействия отобранного антимикробного агента с целой микробной клеткой. Важный этап исследования, так как на практике антимикробное вещество может не проникать в клетку, подвергаться ферментативной инактивации или вступать во взаимодействие с другими макромолекулами клетки.

Таргетный скрининг сформирован как новая стратегия в области скрининга антагонистов патогенов и созданием инновационных антимикробных лекарственных средств, обладающих принципиально иным механизмом действия, чем антибиотики, отбираемые при первичном скрининге по активности на лабораторных питательных средах.

Отличительной особенностью новой стратегии является то, что поисковая работа начинается не с ингибиторов того или иного метаболического процесса патогена, а с возможных мишеней для потенциальных антимикробных агентов с применением знаний о геноме и гене.

В дальнейшем значение конкретного гена для жизнедеятельности и размножения патогенного микроорганизма определяется при его трансляции в живом органе.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА. РЕШЕНИЕ СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ.

Задача. Генная инженерия появилась благодаря работам многих исследователей в разных отраслях биохимии и молекулярной генетики. Генная инженерия – совокупность методов, позволяющих в пробирке переносить генетическую информацию из одного организма в другой. Перенос генов дает возможность преодолевать межвидовые барьеры и передавать отдельные наследственные признаки одних организмов другим. **ЦЕЛЬ** - получение клеток, в промышленных масштабах нарабатывать некоторые белки.

- Что представляют из себя плазмиды, их роль в генной инженерии.
- Для чего бактериальные клетки вырабатывают рестриктазы?
- Сущность процесса клонирования для получения рекомбинантной ДНК с применением плазмид и рестриктаз.
- Основные продуценты, используемые в построении рекомбинантных белков.
- Понятие вектора в генной инженерии

Эталон ответа. Наиболее распространенным методом генной инженерии является метод получения рекомбинантных плазмид, которые представляют собой кольцевые, двухцепочечные молекулы ДНК, состоящие из нескольких пар нуклеотидов. Каждая бактерия помимо основной, не покидающей клетку молекулы ДНК ($5 \cdot 10^6$ пар нуклеотидов), может содержать несколько различных плазмид, которыми она обменивается с другими бактериями.

Плазмиды являются автономными генетическими элементами, реплицирующимися в бактериальной клетке не в то же время, что основная молекула ДНК. Плазмиды несут важные для бактерии гены, как гены лекарственной устойчивости. Разные плазмиды содержат разные гены устойчивости к антибактериальным препаратам. При действии определенного антибиотика на бактериальные клетки плазмиды, придающие устойчивость к нему, быстро распространяются среди бактерий, сохраняя им жизнь.

Бактериальные клетки вырабатывают рестриктазы для разрушения инородной (фаговой) ДНК, что необходимо для ограничения вирусной инфекции. Рестриктазы узнают определенные последовательности нуклеотидов (сайты – участки узнавания) и вносят симметричные, расположенные наискось друг от друга разрывы в цепях ДНК на равных расстояниях от центра сайта. В результате на концах каждого фрагмента рестриktированной ДНК образуются короткие одноцепочечные «хвосты», которые называют липкими концами.

Для получения рекомбинантной плазмиды ДНК одной из плазмид расщепляется выбранной рестриктазой. Ген, который нужно ввести в бактериальную клетку, расщепляют из ДНК хромосом человека с помощью рестриктазы, поэтому его «липкие» концы являются комплементарными нуклеотидными последовательностями на концах плазмид. Ферментом лигазой «склеивают» оба куска ДНК в результате получается рекомбинантная кольцевая плазида, которую вводят в бактерию, например, *E. coli*. Все потомки этой бактерии (клоны) содержат в плазмидах чужеродный ген. Весь этот процесс называют клонированием.

В качестве продуцентов различных рекомбинантных белков используют:

Escherichia coli (кишечная палочка) – грамотрицательная условно-патогенная палочка, у которой в настоящее время детально изучен геном и механизмы экспрессии генов, имеется плазида, так называемый собственный-вектор на основе которой созданы химерные плазмиды, содержащие гены-маркеры устойчивости к антибиотикам.

Bacillus subtilis (сенная палочка) – грамположительный спорообразующий непатогенный микроорганизм, способный адсорбировать и поглощать молекулы ДНК из внешней среды и секретировать из клеток в культуральную жидкость большие количества белков.

Pseudomonas (псевдомонады) – грамотрицательные условно-патогенные и патогенные палочки, способные к накоплению рекомбинантных белков, в отличие от кишечной палочки, в растворенном состоянии за счет специфических окислительно-восстановительных потенциалов цитоплазмы клеток.

Сахаромицеты (пекарские дрожжи - *Saccaromyces cerevisiae* и пивные дрожжи - *Saccaromyces carlsbergensis*) - эукариотиче-ские клетки, способные к посттрансляционной модификации белков и содержащие 2 микронную дрожжевую плазмиду с селективным геном-маркером, кодирующим синтез лейцина. Сахаромицеты способны к ферментативной модификации белков и экскреции рекомбинантных продуктов из клетки. Кроме сахаромицетов используют другие виды дрожжей. Наиболее эффективными продуцентами полноценных белков являются метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* и *Hansenula rofynogpha*, способные использовать метанол как единственный источник углерода и энергии.

Культуры клеток животной ткани, которые в отличие от культур микроорганизмов, способны осуществлять более детальную модификацию белков. Используются следующие культуры клеток: культура клеток китайского хомячка ССL-2 (СНО); МК-2 - культура клеток почки обезьяны; НLM- культура клеток печени эмбриона человека; LM- культура клеток соединительной ткани мышц.

Вектор - самореплицирующаяся молекула ДНК (например, бактериальная плазида), используемая в генной инженерии для переноса генов от организма донора к организму реципиента, а также, для клонирования нуклеотидных последовательностей.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ИСХОДЯЩЕГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ:

1. В качестве основного метода геномики используют:

- а) микроскопию
- б) газожидкостную хроматографию
- в) двухмерный электрофорез
- г) секвенирование
- д) спектральный анализ

2. Протеомика характеризует состояние микробного патогена по:

- а) ферментативной активности
- б) скорости роста
- в) экспрессии отдельных белков
- г) нахождению на конкретной стадии ростового цикла
- д) метаболизму

3. В качестве основного метода протеомики используют:

- а) микроскопию
- б) газожидкостную хроматографию
- в) двухмерный электрофорез
- г) радиоизотопный анализ
- д) спектральный анализ

4. Направление геномики, непосредственно связанное с протеомикой:

- а) структурная
- б) сравнительная
- в) функциональная
- г) формальная

5. Целью структурной геномики является:

- а) установление связи между геномом и метаболизмом
- б) определение существенности отдельных генов

в) идентификация генов по молекулярной массе, количеству в геноме, нуклеотидной последовательности

г) определение уникальности и степени гомологии генов разных организмов

6. Целью сравнительной геномики является:

а) установление связи между геномом и метаболизмом

б) определение существенности отдельных генов

в) идентификация генов по молекулярной массе, количеству в геноме, нуклеотидной последовательности

г) определение уникальности и степени гомологии генов разных организмов

7. Антисмысловые олигонуклеотиды перспективны для лечения:

а) инфекционных бактериальных болезней

б) онкологические заболевания

в) противогрибковых заболеваний

г) наследственных моногенных заболеваний

д) вирусных заболеваний

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5	6	7
Правильный вариант ответа	Г	В	В	В	В	Г	Г

ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАНЯТИЮ ПРЕПОДАВАТЕЛЯМ:

Основная:

1. Биотехнология. Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева – М.: «Академия», 2007. – С. 85-101, 182-191, 204-218.

2. Фармацевтическая биотехнология: Учебное пособие для студентов высших уч. заведений Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л., Михалева Л.К., Белова Л.С. Ростов-на-Дону Феникс Томск Издательство НТЛ Сибирский Государственный медицинский Университет, 2006. – 251 с.

3. Фармацевтическая биотехнология: рук. к практ. занятиям: учеб. пособие / С.Н. Орехов ; под ред. В.А. Быкова, А.В. Катлинского. – м.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – С. 123-142.

4. Фармацевтическая биотехнология: руководство к практическим занятиям: учеб. пособие /. 2-е изд., перераб. и доп. С.Н. Орехов М.: ГЭОТАР- Медиа, 2015. – 432 с.

Дополнительная:

5. Терминологический словарь по биотехнологии

6. Биология: учеб. пособие / Г.Г. Чебышев ; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 416 с.

7. Микробиология, вирусология и иммунология: рук. к лаб. занятиям: учеб. пособие / В.С. Сбойчакова; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 320 с.

8. Микробиология: учебник для студентов фармацевтических ВУЗов / А.А. Воробьев и др.; – М.: «Медицина», 2003. – 336 с.

Занятие № 4.

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: «GMP, GLP и GSP в биотехнологии.».

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: студенты должны изучить экологические основы в биотехнологии, аспекты использования правил GMP в биотехнологическом производстве.

ЗНАЧИМОСТЬ: продукция биотехнологических предприятий на всех этапах – от исследования и лабораторных испытаний до производства и упаковки конечного продукта – требует строгих правил к качеству, чистоте, безопасности ЛП. Производство стерильных препаратов особенно точно регулируется ОСТом GMP «Правила производства и контроля качества ЛС». Правила GMP обязательны для всех фармацевтических предприятий.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЗАНЯТИЯ (в академических часах) – 4.

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ: 527 аудитория, 2 корпус.

ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ И БЮДЖЕТ УЧЕБНОГО ВРЕМЕНИ:

1. Организационный момент 5 мин.
2. Тестовый контроль входного уровня знания 15 мин.
3. Опрос, дискуссия, разбор ситуационной задачи на занятии 65 мин.
4. Перерыв 10 мин.
5. Опрос, дискуссия, самостоятельное решение ситуационной задачи 65 мин.
6. Тестовый контроль исходного уровня знания 15 мин.
7. Подведение итогов занятия, задание к следующему занятию 5 мин.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЗАНЯТИЯ:

Контрольные вопросы:

1. Система GMP производства и контроля качества ЛС.
2. Общая характеристика правил GLP и GSP.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ВХОДЯЩЕГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ.

1. Для сбраживания субстрата при производстве этанола целесообразнее использовать:

- А) *S. cerevisiae*.
- Б) *Zygomonas mobilis*.
- В) *E. coli*.
- Г) *C. albicans*.

2. Феромоны, вызывающие немедленные поведенческие эффекты:

А) феромоны – релизеры.

Б) феромоны – праймеры.

3. Мицелий продуцента после его отделения от культуральной жидкости представляет собой:

А) жидкие отходы.

Б) твердые отходы.

В) газообразные отходы.

4. Какие основные виды микроорганизмов присутствуют в «активном иле»:

А) рода Staphylococcus

Б) рода Pseudomonas

В) рода Streptococcus

Г) рода Bacterium

5. Препарат «Phenobac» используют:

А) для утилизации углеводов

Б) для окисления полисахаридов

В) для освобождения от синтетических детергентов.

6. Функцией феромонов является:

а) антимикробная активность

б) противовирусная активность

в) изменение поведения организма со специфическим рецептором

г) терморегулирующая активность

д) противоопухолевая активность

7. Значение алломонов как сигнально-коммуникативных веществ для секретирующего организма:

а) адаптативно выгодное

б) органические популяции

в) узнавание на территории

г) половые аттрактанты

8. Значение крайромонов в природе:

а) антимикробная активность

б) регуляция численности популяции

в) привлечение особей своего вида

г) отпугивание особей других видов

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5	6	7	8
Правильный вариант ответа	Б	А	Б	Б, Г	А	В	А	Б

РАЗБОР СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ НА ЗАНЯТИИ.

Задача. Правила GMP - руководящий нормативный документ международного значения, который должны обязательно принимать к сведению как отдельные фирмы, так и все производство фармацевтических препаратов в целом. Это правила организации и контроля производства, которые составляют единую систему требований к качеству выпускаемой продукции. Все производства, интегрированные в международный рынок ЛС и медицинских препаратов, выпускающие готовые лекарственные формы и любую продукцию медицинского назначения, включая субстанции, обязаны работать по этим правилам. В то же время каждая страна, производящая ЛС, имеет свою Государственную фармакопею как руководящий документ проверки качества той или иной медицинской продукции. Проведите сравнительный анализ: □ правил GMP и государственных фармакопей с позиций требований для экспорта фармацевтической продукции; □ необходимости проведения валидации как любого фармацевтического производства, так и биотехнологической продукции в частности; □ правил международного значения для получения достоверных данных о проведенных испытаниях и безопасности ЛС.

Эталон ответа. Правила GMP - правила организации производства и контроля качества ЛС, единственная система требований к производству и контролю, руководящий нормативный документ для производителей и фирм, выпускающих ЛС, для всей продукции медицинского назначения и субстанций. Самые жесткие требования предъявляют к инъекционным лекарственным препаратам. Эта система требований была введена в развитых странах в 1969 г. под эгидой ВОЗ. В последующие годы ее неоднократно пересматривали.

Внедрение этой системы приносит выгоду импортерам и имеет значительные преимущества для экспортеров, так как является гарантией высокого качества предлагаемой продукции при соблюдении определенных требований:

- обязательной государственной регистрации ЛС;
- обязательного государственного инспектирования и надзора за фармацевтическими предприятиями;
- в стране должны быть приняты правила GMP; подобно фармакопеям, правила GMP неоднородны, поэтому существуют:
- международные правила GMP (разрабатывает ВОЗ);
- региональные правила GMP (например, в странах Европейского экономического сообщества, ассоциации стран Юго-Восточной Азии);
- национальные правила GMP (внедрены в 30 странах мира).

В некоторых странах, в частности в Японии, национальные правила GMP ужесточены по сравнению с международными. В перечне разделов правил GMP особое место занимает раздел валидации. Валидация - оценка и документальное подтверждение соответствия производственного процесса и качества продукции установленным требованиям. Валидация бывает периодической и внеплановой и оценивает как сам производственный процесс, так и пределы его возможностей. На биотехнологическом производстве внеплановую валидацию проводят, если производство меняет штамм продуцента или изменена питательная среда (меняется метаболизм продуцента и возможно появление нежелательных примесей). Для получения достоверных данных о проведенных испытаниях и безопасности ЛС используют правила GLP - правила организации лабораторных исследований. Перед клиническими испытаниями проводят лабораторные исследования (in vitro, in vivo). При испытании на животных можно получить различные результаты, поэтому важна правильная организация исследований. Животные должны быть гетерогенны (разные виды), их питание должно быть постоянным и одинаковым; требуется определенная планировка вивария для исключения стресса у животных и поддержания их жизнеспособности. Правила GCP - правила организации клинических испытаний с соблюдением прав больных и добровольцев, с созданием общественных и этических комитетов по контролю клинических испытаний лекарственных препаратов. Цель клинических испытаний: получение достоверных результатов по терапевтическому

эффекту ЛС и безвредности его применения на пациентах. Для исключения вероятности необъективности трактования полученных данных рекомендуют увеличивать количество учреждений, где проходят испытания, а не ограничиваться рамками одного учреждения и одним и тем же количеством испытуемых.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА. РЕШЕНИЕ СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ.

ЗАДАЧА. Биосинтез ЛС или БАВ в условиях производства требует создания стерильных условий при многостадийности всего процесса в целом. При этом для успешного осуществления биосинтеза необходимо не допустить контаминации целевого продукта.

В условиях поставленной задачи укажите:

- в чем выражается многостадийность биосинтеза;
- способы предотвращения контаминации целевого продукта;
- схему очистки воздуха, используемую в процессе биосинтеза.

Эталон ответа. Многостадийность биосинтеза выражается в выращивании посевной среды (многоэтапность), в приготовлении соответствующей питательной среды многокомпонентного состава, в самом процессе ведения биосинтеза (биокатализа), в выделении, очистке, концентрировании, сушке, фасовке и упаковке ЛС. Все эти этапы требуют стерильных условий производства, его асептики, начиная с воздуха, оборудования и заканчивая асептикой питательной и посевной среды. Биосинтез осуществляют с использованием жидкой питательной среды, при глубинном культивировании. Емкости ферментеров имеют объем от 100 л (1 м³) до 10 000 л (100 м³), и все коммуникации стерилизуют острым паром (130 °С) в течение 1 ч. Стерилизацию воздуха производят методом фильтрации по следующей схеме: воздух с улицы поступает в фильтр предварительной очистки, где он очищается от пыли и влаги, затем на компрессор, где воздух нагревается, далее в холодильник для охлаждения, после чего под давлением проходит в головной фильтр (общий для цеха ферментации) и, наконец, в индивидуальный фильтр для каждого ферментера. Поступающий с улицы воздух содержит от 1000 до 100 000 клеток микроорганизмов в 1 м³, среди которых могут встречаться и патогенные штаммы. Именно поэтому, чтобы не допустить контаминации культуральной жидкости, индивидуальные фильтры не должны пропускать микроорганизмы размером более 0,25 микрона (мкм). Для сравнения, размеры, например, кокков составляют 0,5-1,5 мкм, кишечной палочки - 0,4-0,8 мкм. При этом существует так называемый коэффициент проскока, поэтому 100% стерилизация не всегда возможна. Фильтры стерилизуют острым паром при 120-130 °С в течение 30 мин. Для проверки эффективности стерилизации проводят биологический анализ проб. Питательную среду стерилизуют с применением термического нагревания (в 1 г кукурузной муки содержится от 10⁴ до 10⁹ клеток микроорганизмов). К воде как компоненту питательной среды предъявляют те же требования, что и к питьевой воде (водопроводная вода должна содержать не более 100 микробных клеток в 1 мл).

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ИТОГОВОГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ.

1. В состав активного ила входят:

- а) вирусы
- б) бактериофаги
- в) бактерии
- г) сине-зеленые водоросли

2. При очистке стоков биотехнологических производств применяют активный ил – это:

- а) природный комплекс микроорганизмов
- б) сорбент

- в) смесь сорбентов
- г) смесь микроорганизмов, полученных генно-инженерными методами

3. Биологическая очистка сточных вод основана на:

- а) способности микроорганизмов к минерализации органических веществ
- б) химическом окислении органических веществ
- в) сжигании органических веществ в токе кислорода
- г) окислении органических веществ под действием хлора

4. Аппараты, в которых осуществляется деструкция органических загрязнений сточных вод, называется:

- а) усреднители
- б) отстойники
- в) аэротенки
- г) регенераторы

5. Правила GMP предусматривают производство в отдельных помещениях и на отдельном оборудовании:

- а) пенициллинов
- б) аминогликозидов
- в) тетрациклинов
- г) макролидов
- д) полиенов

6. GLP регламентируют:

- а) лабораторные исследования
- б) планирование поисковых работ
- в) набор тестов при предклинических испытаниях
- г) методы математической обработки данных
- д) проведение валидации

7. При очистке промышленных стоков в «часы пик» применяют штаммы-деструкторы:

- а) природные микроорганизмы
- б) постоянные компоненты активного ила
- в) стабильные генно-инженерные штаммы
- г) не стабильные генно-инженерные штаммы

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5	6	7
Правильный вариант ответа	В	А	А	В	А	В	Г

ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАНЯТИЮ ПРЕПОДАВАТЕЛЯМ:

Основная:

1. Биотехнология. Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева – М.: «Академия», 2007. – С. 85-101, 182-191, 204-218.
2. Фармацевтическая биотехнология: Учебное пособие для студентов высших уч. заведений Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л., Михалева Л.К., Белова Л.С. Ростов-

на-Дону Феникс Томск Издательство НТЛ Сибирский Государственный медицинский Университет, 2006. – 251 с.

3. Фармацевтическая биотехнология: рук. к практ. занятиям: учеб. пособие / С.Н. Орехов ; под ред. В.А. Быкова, А.В. Катлинского. – м.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – С. 123-142.

4. Фармацевтическая биотехнология: руководство к практическим занятиям: учеб. пособие /. 2-е изд., перераб. и доп. С.Н. Орехов М.: ГЭОТАР- Медиа, 2015. – 432 с.

Дополнительная:

5. Терминологический словарь по биотехнологии

6. Биология: учеб. пособие / Г.Г. Чебышев ; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 416 с.

7. Микробиология, вирусология и иммунология: рук. к лаб. занятиям: учеб. пособие / В.С. Сбойчакова; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 320 с.

8. Микробиология: учебник для студентов фармацевтических ВУЗов / А.А. Воробьев и др.; – М.: «Медицина», 2003. – 336 с.

Занятие № 5.

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: «Экологические аспекты биотехнологии».

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: студенты должны изучить экологические основы в биотехнологии и утилизацию биоотходов в биотехнологическом производстве.

ЗНАЧИМОСТЬ: Биотехнологическое производство не лишено проблем, относящихся к ликвидации и очистке отходов. Будущий специалист должен знать правила GMP, а также владеть приемами утилизации отходов.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЗАНЯТИЯ (в академических часах) – 4.

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ: 527 аудитория, 2 корпус.

ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ И БЮДЖЕТ УЧЕБНОГО ВРЕМЕНИ:

1. Организационный момент 5 мин.
2. Тестовый контроль входного уровня знания 15 мин.
3. Опрос, дискуссия, разбор ситуационной задачи на занятии 65 мин.
4. Перерыв 10 мин.
5. Опрос, дискуссия, самостоятельное решение ситуационной задачи 65 мин.
6. Тестовый контроль исходного уровня знания 15 мин.
7. Подведение итогов занятия, задание к следующему занятию 5 мин.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЗАНЯТИЯ:

Контрольные вопросы:

1. Система GMP производства и контроля качества ЛС.
2. Общая характеристика правил GLP и GCP.
3. Экологические аспекты биотехнологии
4. Эколого – биохимические взаимодействия в организменных сообществах.
5. Биодegradация токсических соединений и утилизация биомассы.
6. Основные санитарные и экологические требования к биотехнологическому производству.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ВХОДЯЩЕГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ.

1. Для сбраживания субстрата при производстве этанола целесообразнее использовать:

- A) *S. cerevisiae*.
- Б) *Zygomonas mobilis*.

В) E. coli.

Г) C. albicans.

2. Феромоны, вызывающие немедленные поведенческие эффекты:

А) феромоны – релизеры.

Б) феромоны – праймеры.

3. Мицелий продуцента после его отделения от культуральной жидкости представляет собой:

А) жидкие отходы.

Б) твердые отходы.

В) газообразные отходы.

4. Какие основные виды микроорганизмов присутствуют в «активном иле»:

А) рода Staphylococcus

Б) рода Pseudomonas

В) рода Streptococcus

Г) рода Bacterium

5. Препарат «Phenobac» используют:

А) для утилизации углеводов

Б) для окисления полисахаридов

В) для освобождения от синтетических детергентов.

6. Функцией феромонов является:

а) антимикробная активность

б) противовирусная активность

в) изменение поведения организма со специфическим рецептором

г) терморегулирующая активность

д) противоопухолевая активность

7. Значение алломонов как сигнально-коммуникативных веществ для секретирующего организма:

а) адаптативно выгодное

б) органические популяции

в) узнавание на территории

г) половые аттрактанты

8. Значение крайромонов в природе:

а) антимикробная активность

б) регуляция численности популяции

в) привлечение особей своего вида

г) отпугивание особей других видов

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5	6	7	8
Правильный вариант ответа	Б	А	Б	Б, Г	А	В	А	Б

РАЗБОР СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ НА ЗАНЯТИИ.

Задача. Правила GMP - руководящий нормативный документ международного значения, который должны обязательно принимать к сведению как отдельные фирмы, так и все производство фармацевтических препаратов в целом. Это правила организации и контроля производства, которые составляют единую систему требований к качеству выпускаемой продукции. Все производства, интегрированные в международный рынок ЛС и медицинских препаратов, выпускающие готовые лекарственные формы и любую продукцию медицинского назначения, включая субстанции, обязаны работать по этим правилам. В то же время каждая страна, производящая ЛС, имеет свою Государственную фармакопею как руководящий документ проверки качества той или иной медицинской продукции. Проведите сравнительный анализ: □ правил GMP и государственных фармакопей с позиций требований для экспорта фармацевтической продукции; □ необходимости проведения валидации как любого фармацевтического производства, так и биотехнологической продукции в частности; □ правил международного значения для получения достоверных данных о проведенных испытаниях и безопасности ЛС.

Эталон ответа. Правила GMP - правила организации производства и контроля качества ЛС, единственная система требований к производству и контролю, руководящий нормативный документ для производителей и фирм, выпускающих ЛС, для всей продукции медицинского назначения и субстанций. Самые жесткие требования предъявляют к инъекционным лекарственным препаратам. Эта система требований была введена в развитых странах в 1969 г. под эгидой ВОЗ. В последующие годы ее неоднократно пересматривали.

Внедрение этой системы приносит выгоду импортерам и имеет значительные преимущества для экспортеров, так как является гарантией высокого качества предлагаемой продукции при соблюдении определенных требований:

- обязательной государственной регистрации ЛС;
- обязательного государственного инспектирования и надзора за фармацевтическими предприятиями;
- в стране должны быть приняты правила GMP; подобно фармакопеям, правила GMP неоднородны, поэтому существуют:
- международные правила GMP (разрабатывает ВОЗ);
- региональные правила GMP (например, в странах Европейского экономического сообщества, ассоциации стран Юго-Восточной Азии);
- национальные правила GMP (внедрены в 30 странах мира).

В некоторых странах, в частности в Японии, национальные правила GMP ужесточены по сравнению с международными. В перечне разделов правил GMP особое место занимает раздел валидации. Валидация - оценка и документальное подтверждение соответствия производственного процесса и качества продукции установленным требованиям. Валидация бывает периодической и внеплановой и оценивает как сам производственный процесс, так и пределы его возможностей. На биотехнологическом производстве внеплановую валидацию проводят, если производство меняет штамм продуцента или изменена питательная среда (меняется метаболизм продуцента и возможно появление нежелательных примесей). Для получения достоверных данных о проведенных испытаниях и безопасности ЛС используют правила GLP - правила организации лабораторных исследований. Перед клиническими испытаниями проводят лабораторные исследования (*in vitro*, *in vivo*). При испытании на животных можно получить различные результаты, поэтому важна правильная организация исследований. Животные должны быть гетерогенны (разные виды), их питание должно быть постоянным и одинаковым; требуется определенная планировка вивария для исключения стресса у животных и поддержания их жизнеспособности. Правила GCP - правила организации клинических испытаний с соблюдением прав больных и добровольцев, с созданием общественных и

этических комитетов по контролю клинических испытаний лекарственных препаратов. Цель клинических испытаний: получение достоверных результатов по терапевтическому эффекту ЛС и безвредности его применения на пациентах. Для исключения вероятности необъективности трактования полученных данных рекомендуют увеличивать количество учреждений, где проходят испытания, а не ограничиваться рамками одного учреждения и одним и тем же количеством испытуемых.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА.РЕШЕНИЕ СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ.

ЗАДАЧА.Биосинтез ЛС или БАВ в условиях производства требует создания стерильных условий при многостадийности всего процесса в целом. При этом для успешного осуществления биосинтеза необходимо не допустить контаминации целевого продукта.

В условиях поставленной задачи укажите:

- в чем выражается многостадийность биосинтеза;
- способы предотвращения контаминации целевого продукта;
- схему очистки воздуха, используемую в процессе биосинтеза.

Эталон ответа.Многостадийность биосинтеза выражается в выращивании посевной среды (многоэтапность), в приготовлении соответствующей питательной среды многокомпонентного состава, в самом процессе ведения биосинтеза (биокатализа), в выделении, очистке, концентрировании, сушке, фасовке и упаковке ЛС. Все эти этапы требуют стерильных условий производства, его асептики, начиная с воздуха, оборудования и заканчивая асептикой питательной и посевной среды. Биосинтез осуществляют с использованием жидкой питательной среды, при глубинном культивировании. Емкости ферментеров имеют объем от 100 л (1 м³) до 10 000 л (100 м³), и все коммуникации стерилизуют острым паром (130 °С) в течение 1 ч. Стерилизацию воздуха производят методом фильтрации по следующей схеме: воздух с улицы поступает в фильтр предварительной очистки, где он очищается от пыли и влаги, затем на компрессор, где воздух нагревается, далее в холодильник для охлаждения, после чего под давлением проходит в головной фильтр (общий для цеха ферментации) и, наконец, в индивидуальный фильтр для каждого ферментера. Поступающий с улицы воздух содержит от 1000 до 100 000 клеток микроорганизмов в 1 м³, среди которых могут встречаться и патогенные штаммы. Именно поэтому, чтобы не допустить контаминации культуральной жидкости, индивидуальные фильтры не должны пропускать микроорганизмы размером более 0,25 микрона (мкм). Для сравнения, размеры, например, кокков составляют 0,5-1,5 мкм, кишечной палочки - 0,4-0,8 мкм. При этом существует так называемый коэффициент проскока, поэтому 100% стерилизация не всегда возможна. Фильтры стерилизуют острым паром при 120-130 °С в течение 30 мин. Для проверки эффективности стерилизации проводят биологический анализ проб. Питательную среду стерилизуют с применением термического нагревания (в 1 г кукурузной муки содержится от 10⁴ до 10⁹ клеток микроорганизмов). К воде как компоненту питательной среды предъявляют те же требования, что и к питьевой воде (водопроводная вода должна содержать не более 100 микробных клеток в 1 мл).

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ИТОГОВОГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ.

1. В состав активного ила входят:

- а) вирусы
- б) бактериофаги
- в) бактерии
- г) сине-зеленые водоросли

2. При очистке стоков биотехнологических производств применяют активный ил – это:

- а) природный комплекс микроорганизмов
- б) сорбент
- в) смесь сорбентов
- г) смесь микроорганизмов, полученных генно-инженерными методами

3. Биологическая очистка сточных вод основана на:

- а) способности микроорганизмов к минерализации органических веществ
- б) химическом окислении органических веществ
- в) сжигании органических веществ в токе кислорода
- г) окислении органических веществ под действием хлора

4. Аппараты, в которых осуществляется деструкция органических загрязнений сточных вод, называется:

- а) усреднители
- б) отстойники
- в) аэротенки
- г) регенераторы

5. Правила GMP предусматривают производство в отдельных помещениях и на отдельном оборудовании:

- а) пенициллинов
- б) аминогликозидов
- в) тетрациклинов
- г) макролидов
- д) полиенов

6. GLP регламентируют:

- а) лабораторные исследования
- б) планирование поисковых работ
- в) набор тестов при предклинических испытаниях
- г) методы математической обработки данных
- д) проведение валидации

7. При очистке промышленных стоков в «часы пик» применяют штаммы-деструкторы:

- а) природные микроорганизмы
- б) постоянные компоненты активного ила
- в) стабильные генно-инженерные штаммы
- г) не стабильные генно-инженерные штаммы

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5	6	7
Правильный вариант ответа	В	А	А	В	А	В	Г

ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАНЯТИЮ ПРЕПОДАВАТЕЛЯМ:

Основная:

1. Биотехнология. Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева – М.: «Академия», 2007. – С. 85-101, 182-191, 204-218.

2. Фармацевтическая биотехнология: Учебное пособие для студентов высших уч. заведений Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л., Михалева Л.К., Белова Л.С. Ростов-на-Дону Феникс Томск Издательство НТЛ Сибирский Государственный медицинский Университет, 2006. – 251 с.
3. Фармацевтическая биотехнология: рук. к практ. занятиям: учеб. пособие / С.Н. Орехов ; под ред. В.А. Быкова, А.В. Катлинского. – м.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – С. 123-142.
4. Фармацевтическая биотехнология: руководство к практическим занятиям: учеб. пособие /. 2-е изд., перераб. и доп. С.Н. Орехов М.: ГЭОТАР- Медиа, 2015. – 432 с.
Дополнительная:
5. Терминологический словарь по биотехнологии
6. Биология: учеб. пособие / Г.Г. Чебышев ; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 416 с.
7. Микробиология, вирусология и иммунология: рук. к лаб. занятиям: учеб. пособие / В.С. Сбойчакова; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 320 с.
8. Микробиология: учебник для студентов фармацевтических ВУЗов / А.А. Воробьев и др.; – М.: «Медицина», 2003. – 336 с.

Занятие №6

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Модуль № 1 по темам:

«Предмет, объекты и методы биотехнологии», «Биосистемы, используемые в БТ. ДНК, РНК, синтез белка. Получение рекомбинантных ДНК (генная инженерия).
Общая характеристика биотехнологического процесса. GMP, GLP и GSP в биотехнологии. Экологические аспекты биотехнологии».

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: закрепление и систематизация знаний у студентов по изученным за модуль темам.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЗАНЯТИЯ (в академических часах) – 4.

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ: 527 аудитория, 2 корпус.

ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ И БЮДЖЕТ УЧЕБНОГО ВРЕМЕНИ:

1. Организационный момент 5 мин.
2. Тестовый контроль входного уровня знания 15 мин.
3. Опрос, дискуссия, разбор ситуационной задачи на занятии 65 мин.
4. Перерыв 10 мин.
5. Опрос, дискуссия, самостоятельное решение ситуационной задачи 65 мин.
6. Тестовый контроль исходного уровня знания 15 мин.
7. Подведение итогов занятия, задание к следующему занятию 5 мин.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЗАНЯТИЯ:

Контрольные вопросы:

1. Понятия биотехнология, биообъект, эукариоты, прокариоты, термофилы, мезофиллы, психрофилы, эубактерии и археобактерии.
2. История развития БТ.
3. Связь БТ с другими науками.
4. Этапы биотехнологического процесса.
5. Сравнительная характеристика и основные отличия прокариот и эукариот.
6. Характеристика *E. coli* как биообъект БТ.
7. Характеристика *Saccharomyces cerevisiae* как биообъект БТ.
8. Понятия ДНК, Транскрипция, Трансляция, Репликация, Гены, Пульс – электрофорез, ДНК-футпринтинг, Денатурация, Ренатурация, Генотип, Фенотип, Сайты, Экзоны, Интроны, Сплайсинг, Антикодон, Кодон, Оперон.
9. Синтез ДНК.

10. Универсальные аминокислоты.
11. ДНК, РНК; типы РНК.
12. Генетическая информация, методы ее получения, Геном человека.
15. Ферменты рестрикции, плазмиды, бактериофаги, бакмиды, косимды, фазмиды.
16. Стадии биотехнологического процесса.
17. Составы питательных сред для культивирования микроорганизмов.
18. Приготовление посевного материала и культивирование микроорганизмов.
19. Оборудование, используемое в биотехнологии: биореакторы, УЗ-моечные машины; Машины используемые в производстве инъекционных ЛФ и некоторое другое оборудование.
20. Методы повышения эффективности ферментации.
21. Методы контроля биомассы и количества клеток при культивировании. Апоптоз и некроз.
22. Выделение продуктов биосинтеза и получение конечного коммерческого продукта.
23. Генетика. История развития.
24. Геномика. Цели и задачи геномики.
25. Протеомика.
26. Связь протеомики и геномики.
27. Сравнительная геномика.
28. Структурная геномика.
29. Функциональная геномика.
30. Таргетный скрининг.
31. Секвенирование генома.
32. Проект «геном человека».
33. Генотерапия.
34. Антисмысловые олигонуклеотиды.
35. Конформационные болезни.
36. Система GMP производства и контроля качества ЛС. Общая характеристика правил GLP и GCP.
37. Экологические аспекты биотехнологии
38. Эколого – биохимические взаимодействия в организменных сообществах.
39. Биодеградация токсических соединений и утилизация биомассы.
40. Основные санитарные и экологические требования к биотехнологическому производству.
41. От гена до прототипа лекарства. Новые подходы к разработке лекарств в постгеномную эру.
42. Поиск биомишеней для создания новых лекарственных средств на основе анализа геномных данных.
43. Основные критерии селекции мишеней для создания антимикробных средств.
44. Экспериментальные технологии валидации потенциальных мишеней.
45. Стратегия поиска соединений – лидеров.
46. Дизайн молекул. Структурные критерии.
47. Конструирование лекарств на основе известной структуры мишени (технология SBDD).

ЭТАЛОНЫ ТЕСТОВЫХ И КОНТРОЛЬНЫХ МОДУЛЬНЫХ ЗАДАНИЙ:

Тестовые модульные задания:

Вариант 1

1. Что присуще м/о – E. coli

- а) грамотрицательная палочка
- б) размер менее 1 мкм
- в) непатогенная бактерия
- г) размер более 1 мкм
- д) патогенная бактерия

2. Эубактерии населяют:

- а) почву
- б) болота
- в) воду
- г) океанские глубины
- д) горячие кислые источники

3. Установите соответствие:

- а) термофилы
- б) мезофилы
- в) психрофилы
- 1) 45 -90° С
- 2) -5 - 35° С
- 3) 10 -47° С

4. Отличительные особенности эукариотической клетки:

- а) большой размер
- б) наличие ядра
- в) ригидная клеточная стенка
- г) отсутствие субклеточных органелл
- д) хромосомная ДНК в цитоплазме

5. Типичные направления использования микроорганизмов – психрофилов:

- а) источники генов, кодирующих термолabile вещества
- б) источники генов, кодирующих термостабильные вещества
- в) утилизация токсических отходов
- г) производство спирта этилового
- д) производство биогаза

6. Установление степени близости по последовательности нуклеотидов в генах, полученных из разных источников – это:

- а) геномика сравнительная;
- б) геномика структурная;
- в) геномика функциональная.

7. Установление полной последовательности нуклеотидных пар в гене, хромосоме – это:

- а) геномика сравнительная;
- б) геномика структурная;
- в) геномика функциональная.

8. Определение функций белка, кодируемого каждым отдельным геном, и роли этого белка в метаболизме – это:

- а) геномика сравнительная;
- б) геномика структурная;
- в) геномика функциональная.

9. Секвенирование – это:

- а) определение последовательности нуклеотидных пар;
- б) определение существенности нуклеотидных пар;
- в) отбор и поиск генов.

10. Международный проект «Геном человека» был завершен в:

- а) 2003 году;
- б) 2000 году;
- в) 1993 году.

11. Биореакторы, через которые для перемешивания содержимого пропускают воздух называются:

- а) эрлифтные
- б) барботажные колонны
- в) реакторы с механическим перемешиванием

12. Перемешивание культуральной среды вместе с клетками восходящими потоками воздуха, равномерно циркулируя по всему объему, осуществляется в:

- а) эрлифтные
- б) барботажные колонны
- в) реакторы с механическим перемешиванием

13. Процесс ферментации контролируют по:

- а) рН
- б) температуре
- в) концентрации растворенного водорода

14. Описание морфологических, физиологических характеристик питательных сред, условий выращивания и срока хранения изложены в:

- а) ГФ 12 издания
- б) паспорте на штамм культуры
- в) справочной и научной литературе

15. Режим хранения культур – продуцентов предполагает:

- а) замораживание при температуре ниже – 20° С
- б) лиофильное высушивание
- в) консервирование

16. Биологическая очистка сточных вод основана на:

- а) способности микроорганизмов к минерализации органических веществ
- б) химическом окислении органических веществ
- в) сжигании органических веществ в токе кислорода
- г) окислении органических веществ под действием хлора

17. Согласно ССР в обязанности этических комитетов входят:

- а) контроль за санитарным состоянием лечебно-профилактических учреждений
- б) защита прав больных, на которых испытываются новые лекарственные препараты
- в) утверждение назначаемых режимов лечения
- г) контроль за соблюдением внутреннего распорядка

18. Значение крайромонов в природе:

- а) антимикробная активность
- б) регуляция численности популяции
- в) привлечение особей своего вида
- г) отпугивание особей других видов

19. Директором (главным инженером) фармацевтического предприятия должен являться согласно требованиям GMP:

- а) инженер-экономист
- б) юрист
- в) провизор
- г) врач

Вариант 2

1. Начало послепастеровского периода в развитии биотехнологии относят к:

- а) 1941 г.
- б) 1866 г.
- в) 1975 г.
- г) 1982 г.

2. Открыл микроорганизмы и ввел понятие биообъекта:

- а) Д. Уотсон
- б) Ф. Крик
- в) Ф. Сенгер
- г) Л. Пастер

3. Период антибиотиков в развитии биотехнологии относится к:

- а) 1866-1940 гг.
- б) 1941-1960 гг.
- в) 1961-1975 гг.
- г) 1975-2001 гг.

4. Структуру белка инсулина установил:

- а) Д. Уотсон
- б) Ф. Крик
- в) Ф. Сенгер
- г) Л. Пастер

5. Разработка технологии рекомбинантных ДНК относится к периоду развития биотехнологии:

- а) антибиотиков
- б) допастеровскому
- в) послепастеровскому
- г) управляемого биосинтеза

6. Международный проект «Геном человека» утвержден в:

- а) 1953 г.
- б) 1972 г.
- в) 1963 г.
- г) 1990 г.
- д) 2005 г.

7. Целью проекта «Геном человека» является:

- а) установление структуры ДНК
- б) разработка технологии рекомбинантных ДНК
- в) полное секвенирование генома человека
- г) идентификация и клонирование генов наследственных заболеваний
- д) клонирование человека

8. Возникновение геномики как научной дисциплины стало возможным после:

- а) установления структуры ДНК
- б) создания концепции гена
- в) дифференциации регуляторных и структурных участков гена
- г) полного секвенирования генома у ряда организмов
- д) подтверждения концепции о двойной спирали ДНК

9. В качестве основного метода геномики используют:

- а) микроскопию
- б) газожидкостную хроматографию
- в) двухмерный электрофорез
- г) секвенирование
- д) спектральный анализ

10. Протеомика характеризует состояние микробного патогена по:

- а) ферментативной активности
- б) скорости роста
- в) экспрессии отдельных белков
- г) нахождению на конкретной стадии ростового цикла
- д) метаболизму

11. Участок разделения культуральной жидкости как элемент биотехнологической системы относится к ступени иерархии:

- а) первой
- б) второй
- в) третьей
- г) четвертой

12. Технологический воздух для биотехнологического производства стерилизуют:

- а) УФ-облучением
- б) нагреванием
- в) фильтрованием
- г) радиацией в малых дозах
- д) антибиотическими веществами

13. Фотоавтотрофы – организмы, которые для роста и развития:

- а) нуждаются в факторах роста
- б) используют диоксид углерода и минеральные вещества
- в) используют органические вещества
- г) используют энергию окисления неорганических веществ

14. Донатор – это биологический объект:

- а) фермент-биокатализатор процесса биотрансформации
- б) поставляющий материал для процесса производства лекарственных средств
- в) поставляющий материал для процесса производства лекарственных средств без ущерба для своей жизнедеятельности

г) поставляющий материал для процесса производства лекарственных средств с прекращением дальнейшей жизнедеятельности

15. Хемолитотрофы – организмы, которые для роста и дыхания:

- а) нуждаются в факторах роста
- б) используют органические вещества
- в) используют энергию окисления неорганических веществ
- г) используют энергию света

16. Мицелий продуцента после его отделения от культуральной жидкости представляет собой:

- а) жидкие отходы.
- б) твердые отходы.
- в) газообразные отходы.

17. GLP регламентируют:

- а) лабораторные исследования
- б) планирование поисковых работ
- в) набор тестов при предклинических испытаниях
- г) методы математической обработки данных
- д) проведение валидации

18. Значение алломонов как сигнально-коммуникативных веществ для секретирующего организма:

- а) адаптативно выгодное
- б) органические популяции
- в) узнавание на территории
- г) половые аттрактанты

19. Правила GMP предусматривают производство в отдельных помещениях и на отдельном оборудовании:

- а) пенициллинов
- б) аминогликозидов
- в) тетрациклинов
- г) макролидов
- д) полиенов

Вариант 3

1. Получение хлебопекарных и пивных дрожжей относится к периоду развития биотехнологии:

- а) допастеровскому
- б) послепастеровскому
- в) антибиотиков
- г) управляемого биосинтеза
- д) новой и новейшей биотехнологии

2. Производство этанола относится к периоду развития биотехнологии:

- а) допастеровскому
- б) послепастеровскому
- в) антибиотиков
- г) управляемого биосинтеза
- д) новой и новейшей биотехнологии

3. Период развития производства витаминов относится к периоду развития биотехнологии:

- а) допастеровскому
- б) послепастеровскому
- в) новой и новейшей биотехнологии
- г) управляемого биосинтеза

4. Получение вирусных вакцин относится к периоду развития биотехнологии:

- а) допастеровскому
- б) послепастеровскому
- в) антибиотиков
- г) управляемого биосинтеза
- д) новой и новейшей биотехнологии

5. Первая рекомбинантная ДНК получена:

- а) в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком
- б) в 1972 г. П. Бергом
- в) в 1963 г. М. Ниренбергом
- г) в 1953 г. Ф. Сенгером

6. В качестве основного метода протеомики используют:

- а) микроскопию
- б) газожидкостную хроматографию
- в) двухмерный электрофорез
- г) радиоизотопный анализ
- д) спектральный анализ

7. Направление геномики, непосредственно связанное с протеомикой:

- а) структурная
- б) сравнительная
- в) функциональная
- г) формальная

8. Целью структурной геномики является:

- а) установление связи между геномом и метаболизмом
- б) определение существенности отдельных генов
- в) идентификация генов по молекулярной массе, количеству в геноме, нуклеотидной последовательности
- г) определение уникальности и степени гомологии генов разных организмов

9. Целью сравнительной геномики является:

- а) установление связи между геномом и метаболизмом
- б) определение существенности отдельных генов
- в) идентификация генов по молекулярной массе, количеству в геноме, нуклеотидной последовательности
- г) определение уникальности и степени гомологии генов разных организмов

10. Антисмысловые олигонуклеотиды перспективны для лечения:

- а) инфекционных бактериальных болезней
- б) онкологические заболевания
- в) противогрибковых заболеваний
- г) наследственных моногенных заболеваний
- д) вирусных заболеваний

11. Преимущество клеточной инженерии перед скрещиванием:

- а) направленные комбинации генов
- б) быстрая селекция новых вариантов
- в) преодоление видовых и родовых барьеров
- г) мутационные изменения генома

12. Основные методы совершенствования биообъекта в современной биотехнологии:

- а) индуцированный мутагенез
- б) селекция
- в) генная инженерия
- г) интрадукция растений

13. Скрининг лекарственных средств:

- а) совершенствование путем химической трансформации
- б) совершенствование путем биотрансформации
- в) поиск и отбор («просеивание») природных структур
- г) полный химический синтез
- д) изменение пространственной конфигурации природных структур

14. Роль индуктора могут выполнять:

- а) субстраты
- б) конечный продукт реакции
- в) первичные метаболиты
- г) вторичные метаболиты

15. Оператор – это:

- а) начальный участок транскриптона
- б) стартовая точка транскрипции
- в) начальный участок экзона
- г) участок ДНК, связывающий белки-регуляторы транскрипции в прокариотической клетке
- д) участок ДНК, связывающий белки-регуляторы транскрипции в эукариотической клетке

16. Какие основные виды микроорганизмов присутствуют в «активном иле»:

- а) рода Staphylococcus
- б) рода Pseudomonas
- в) рода Streptococcus
- г) рода Bacterium

17. Правила GMP предусматривают производство в отдельных помещениях и на отдельном оборудовании:

- а) пенициллинов
- б) аминогликозидов
- в) тетрациклинов
- г) макролидов
- д) полиенов

18. Биологическая очистка сточных вод основана на:

- а) способности микроорганизмов к минерализации органических веществ
- б) химическом окислении органических веществ
- в) сжигании органических веществ в токе кислорода
- г) окислении органических веществ под действием хлора

19. GLP регламентируют:

- а) лабораторные исследования
- б) планирование поисковых работ
- в) набор тестов при предклинических испытаниях

- г) методы математической обработки данных
- д) проведение валидации

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ:

ПП/№ варианта	Вариант -1	Вариант - 2	Вариант - 3
1.	АБВ	Б	А
2.	АБ	Г	Б
3.	А-1, Б-3, В-2	Б	Г
4.	АБ	В	В
5.	В	А	Г
6.	А	Б	В
7.	Б	Г	В
8.	В	В	В
9.	А	Г	Г
10.	А	В	Г
11.	Б	Б	В
12.	А	В	В
13.	АБВ	Б	В
14.	А	Г	А
15.	Б	В	Г
16.	А	Б	А
17.	Б	В	А
18.	Б	А	А
19.	В	А	В

ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАНЯТИЮ ПРЕПОДАВАТЕЛЯМ:

Основная:

1. Биотехнология. Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева – М.: «Академия», 2007. – С. 85-101, 182-191, 204-218.
2. Фармацевтическая биотехнология: Учебное пособие для студентов высших уч. заведений Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л., Михалева Л.К., Белова Л.С. Ростов-на-Дону Феникс Томск Издательство НТЛ Сибирский Государственный медицинский Университет, 2006. – 251 с.
3. Фармацевтическая биотехнология: рук. к практ. занятиям: учеб. пособие / С.Н. Орехов ; под ред. В.А. Быкова, А.В. Катлинского. – м.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – С. 123-142.
4. Фармацевтическая биотехнология: руководство к практическим занятиям: учеб. пособие /. 2-е изд., перераб. и доп. С.Н. Орехов М.: ГЭОТАР- Медиа, 2015. – 432 с.

Дополнительная:

5. Терминологический словарь по биотехнологии
6. Биология: учеб. пособие / Г.Г. Чебышев ; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 416 с.
7. Микробиология, вирусология и иммунология: рук. к лаб. занятиям: учеб. пособие / В.С. Сбойчакова; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 320 с.
8. Микробиология: учебник для студентов фармацевтических ВУЗов / А.А. Воробьев и др.; – М.: «Медицина», 2003. – 336 с.

Занятие № 7.

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: «Иммунобиотехнология. Вакцины. Сыворотки. Цитокины».

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: студенты должны изучить основы получения вакцин, цитокинов, интерферонов и др. ЛП, используемых для лечения инфекционных препаратов и иммунодефицитных состояний.

ЗНАЧИМОСТЬ: проблемы лечения и профилактики инфекционных заболеваний в настоящее время не утратили своей актуальности. Вакцины, цитокины, интерфероны и др. ЛС занимают лидирующее место в лечении и профилактики инфекционных заболеваний. В связи с чем, будущий специалист должен знать биотехнологию данных ЛС.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЗАНЯТИЯ (в академических часах) – 4.

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ: 527 аудитория, 2 корпус.

ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ И БЮДЖЕТ УЧЕБНОГО ВРЕМЕНИ:

1. Организационный момент 5 мин.
2. Тестовый контроль входного уровня знания 15 мин.
3. Опрос, дискуссия, разбор ситуационной задачи на занятии 65 мин.
4. Перерыв 10 мин.
5. Опрос, дискуссия, самостоятельное решение ситуационной задачи 65 мин.
6. Тестовый контроль исходного уровня знания 15 мин.
7. Подведение итогов занятия, задание к следующему занятию 5 мин.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЗАНЯТИЯ:

Контрольные вопросы:

1. Вирусы, их строение. Репликация вирусов.
2. Подходы к разработке вакцин с помощью технологии рекомбинантных ДНК.
3. ДНК – вакцины. Принципы их действия.
4. Противогерпетические и противосальмонеллезные вакцины.
5. Цитокины. Интерфероны. Типы ИФН человека. Классификация, характеристика каждой группы. Методы получения различных интерферонов, краткая характеристика каждого метода.
6. Получение кДНК из ИФН.
7. Интерлейкины.
8. Препараты ИФН человека.
9. Каковы особенности получения сывороток?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ВХОДЯЩЕГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ:

1. Применение человеческих противовирусных вакцин ограничено:

- а) невозможностью культивирования всех патогенных микроорганизмов
- б) потенциальной опасностью в работе с патогенными микроорганизмами и вирусами
- в) возможностью аттенуированных штаммов к исходному вирулентному штамму
- г) высокой стоимостью производства традиционных вакцин

2. Субъединичные вакцины - это:

- а) вакцины против одного возбудителя
- б) генетически модифицированный патогенный микроорганизм
- в) непатогенные микроорганизмы с клонированным геном, кодирующим антигенные детерминанты патогенного организма

3. Недостатки субъединичных вакцин:

- а) низкая эффективность
- б) высокая стоимость
- в) риск изменения конформации белка (антигенных свойств)
- г) способность проявлять вирулентность

4. Пероральные вакцины, созданные методом двойной делеции, это:

- а) мертвые вакцины, прошедшие двойную стерилизацию
- б) живые вакцины на основе патогенных бактерий с удаленными из генома областями, отвечающими за независимые жизненно важные функции
- в) живые вакцины на основе патогенных бактерий с удаленными из генома областями, отвечающими за вирулентность

5. Большие количества ИФН получают из:

- а) шестидневных однослойных культур клеток куриного эмбриона
- б) культивируемых лейкоцитов крови человека, зараженных определенным видом вируса
- в) генно-инженерным путем

6. Период получения вирусных вакцин относится к периоду развития биотехнологии:

- а) дрпастеровскому
- б) послепастеровскому
- в) управляемого биосинтеза
- г) антибиотиков
- д) новой и новейшей биотехнологии

7. По происхождению иммуностимуляторы подразделяют на:

- а) экзогенные
- б) химические
- в) биосинтетические
- г) экстракционные

8. Эндогенные иммуностимуляторы синтезируются:

- а) клетками микроорганизмов
- б) с помощью химических реакций
- в) клетками макроорганизма
- г) половыми клетками

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5	6	7	8
Правильный вариант ответа	А Б В Г	В	Б В	Б	А Б	Г	А	В

РАЗБОР СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ НА ЗАНЯТИИ.

Задача. Иммунобиотехнология вносит весомый вклад в создание ЛС, профилактических и диагностических препаратов. Однако не у всех людей и не всегда иммунная система обеспечивает защиту организма от различных микробных и вирусных инфекций. Она может быть неадекватна внешним условиям, и иногда требуется помощь в усилении иммунного ответа. При анализе данной ситуации:

- сопоставьте виды и цели иммунизации с классификацией вакцин по способам их получения и применению;
- свяжите атакующие агенты (ксенобиотики) с ответной реакцией организма, используя понятия «антиген», «антитело», «антигенные детерминанты» («эпитопы»), «гаптены»;
- прокомментируйте проявление иммунного ответа и способы его усиления.

Эталон ответа. Вакцины на основе рекомбинантных протективных антигенов, живых гибридных носителей как иммунобиопрепараты вызывают активную иммунизацию посредством возникновения в организме человека или животного антител, вызывающих блокировку пролиферации патогенного микроорганизма, что не позволяет развиваться заболеванию. Сюда относятся живые и аттенуированные вакцины, получаемые путем культивирования штамма либо в курином эмбрионе, либо в других культурах животных клеток. Примером дивергентной вакцины (с общим протективным антигеном у непатогенного для человека микроорганизма и с патогенным для человека возбудителем инфекции) служит вакцина против натуральной оспы человека, в которой использован непатогенный для человека вирус оспы коров. Кроме того, это и БЦЖ-вакцина (с родственными в антигенном отношении микобактериями бычьего типа). Далее можно отметить рекомбинантные вакцины (выделенный ген вируса вставляют с помощью вектора в дрожжевую клетку или в клетку кишечной палочки), к примеру вакцина против гепатита В. Кроме того, существуют комбинированные вакцины, в частности АКДС (дифтерийный, столбнячный анатоксины и коклюшные корпускулярные антигены). Неживые вакцины (инактивированные) включают в себя убитые культуры патогенных бактерий или вирусов (цельноклеточные, цельновирусные вакцины) или комплексы из патогенных микробов с протективными антигенами (субклеточные, субвирионные вакцины). В молекулярных вакцинах антиген находится в виде фрагментов его молекул, определяющих специфичность антигенности, т.е. в виде эпитопов, детерминант.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА. РЕШЕНИЕ СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ.

Задача. Проанализируйте описание технологического процесса по следующей схеме: название иммунотропного лекарственного средства;

класс и группа препаратов, к которым относится данное средство;
достоинства и недостатки данного иммулотропного средства;
основные этапы получения;
показатели качества;
условия хранения и транспортирования;
влияние на иммунитет и применение.

«из плазмы или сыворотки крови доноров-добровольцев, иммунизированных вакциной против клещевого энцефалита, выделяют фракцию Ig фракционированием этанолом при температуре ниже 00С глобулиновой части белков крови. Далее про водят лиофилизацию, изготовление 10% раствора, стерилизующую фильтрацию и ампулирование по 1 мл (1 доза)».

Эталон ответа. Название иммулотропного лекарственного средства: иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита.

Класс и группа препаратов, к которым относится данное средство: эндогенные специфические иммуностимуляторы, иммуноглобулины (поликлональные антитела).

Достоинства:

- обеспечивают высокий титр антител благодаря концентрированию целевого продукта;
- освобождены от балластных белков, что снижает количество аллергических реакций и осложнений;
- современная технология получения гарантирует гибель вируса инфекционного гепатита;
- пассивный иммунитет возникает через несколько часов после инъекции и длится до двух недель.

Недостатки:

- малая длительность иммунитета;
- необходимость контроля доноров-добровольцев на отсутствие антител к вирусам иммунодефицита человека ВИЧ-1 и ВИЧ-2, гепатита С, поверхностного антигена вируса гепатита В.

Основные этапы получения:

1. Иммунизация доноров-добровольцев вакциной против клещевого энцефалита.
2. Заготовка крови доноров и получение плазмы.
3. Выделение γ -глобулина, стерилизующая фильтрация и ампулирование.
4. Контроль качества

Заготовка крови доноров и получение плазмы методом плазмофереза.

Кровь донора собирают в стерильные емкости из полимерного материала, содержащие раствор антикоагулянта (5% раствор натрия цитрата) для предотвращения свертывания крови; центрифугируют кровь, при этом отделяется плазма и осаждаются клетки, которые возвращаются донору, что значительно снижает возможность возникновения неблагоприятных последствий в организм донора.

Выделение γ -глобулиновой части белков крови осуществляют фракционированием 8-26% этанолом при температуре ниже 0⁰С. В этих условиях денатурирующие действие этанола на белки крови незначительно и выделяемая γ -глобулиновая фракция сохраняет растворимость.

Лиофилизация γ -глобулина осуществляется методом лиофильной сушки. Далее следует изготовление 10% раствора γ -глобулина, стерилизующая фильтрация и ампулирование.

Контроль качества проводится по следующим показателям:

- стерильность;
- апиrogenность;

- содержание белка;
- безвредность;
- специфическая активность.

Условия хранения и транспортирования: в сухом, защищенном от света месте при температуре $6 \pm 40^\circ\text{C}$.

Влияние на иммунитет: специфическое взаимодействие с антигенами, создание искусственного пассивного иммунитета.

Применение: экстренная профилактика и лечение клещевого энцефалита у непривитых людей, отметивших присасывание клеща в районах, эндемичных по клещевому энцефалиту.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ИСХОДЯЩЕГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ:

1. ELISA – твердофазный иммуноферментный анализ является:

- а) иммунометрическим
- б) конкурентным
- в) быстрым
- г) гетерогенным

2. Варианты постановки ИФА:

- а) иммунометрический
- б) конкурентный
- в) люминисцентный
- г) радиоиммунный
- д) флюоресцентный

3. Вакцины формируют иммунитет:

- а) пассивный
- б) активный
- в) быстрый
- г) медленный

4. Преимущества ИФА перед методом РИА:

- а) меньшая стоимость анализа
- б) легкость освоения персоналом
- в) отсутствие радиоактивных изотопов
- г) возможность визуальной оценки результата

5. «Сендвич» - анализ применим к:

- а) поликлональным иммуноглобулинам
- б) иноклональным антителам
- в) поли- и моноклональным антителам
- г) аминокислотам

6. В качестве маркеров тесте ИФА установления факта беременности используют:

- а) йод-125
- б) тритий
- в) пероксидазу
- г) галактозидазу

7. Гомогенный ИФА основан на:

- а) разделении компонентов после проведения реакции
- б) изменении активности фермента в процессе реакции
- в) адсорбции фермента на носителе

г) подавлении фермента

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5	6	7
Правильный вариант ответа	Г	А	Б	Г	В	В	Б

ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАНЯТИЮ ПРЕПОДАВАТЕЛЯМ:

Основная:

1. Биотехнология. Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева – М.: «Академия», 2007. – С. 85-101, 182-191, 204-218.
2. Фармацевтическая биотехнология: Учебное пособие для студентов высших уч. заведений Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л., Михалева Л.К., Белова Л.С. Ростов-на-Дону Феникс Томск Издательство НТЛ Сибирский Государственный медицинский Университет, 2006. – 251 с.
3. Фармацевтическая биотехнология: рук. к практ. занятиям: учеб. пособие / С.Н. Орехов ; под ред. В.А. Быкова, А.В. Катлинского. – м.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – С. 123-142.
4. Фармацевтическая биотехнология: руководство к практическим занятиям: учеб. пособие /. 2-е изд., перераб. и доп. С.Н. Орехов М.: ГЭОТАР- Медиа, 2015. – 432 с.

Дополнительная:

5. Терминологический словарь по биотехнологии
6. Биология: учеб. пособие / Г.Г. Чебышев ; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 416 с.
7. Микробиология, вирусология и иммунология: рук. к лаб. занятиям: учеб. пособие / В.С. Сбойчакова; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 320 с.
8. Микробиология: учебник для студентов фармацевтических ВУЗов / А.А. Воробьев и др.; – М.: «Медицина», 2003. – 336 с.

Занятие № 8.

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: «ЛВ и ЛС, полученные на основе рекомбинантных м/о: моноклональные антитела, тромболитики и антикоагулянты».

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: студенты должны изучить биотехнологические методы получения моноклональных антител, тромболитиков и антикоагулянтов.

ЗНАЧИМОСТЬ: на сегодняшний день с помощью рекомбинантных ДНК клонировано более 1000 генов различных белков человека, которые являются или могут быть использованы для получения ЛС. Будущий специалист должен знать получение рекомбинантных ЛС.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЗАНЯТИЯ (в академических часах) – 4.

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ: 527 аудитория, 2 корпус.

ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ И БЮДЖЕТ УЧЕБНОГО ВРЕМЕНИ:

1. Организационный момент 5 мин.
2. Тестовый контроль входного уровня знания 15 мин.
3. Опрос, дискуссия, разбор ситуационной задачи на занятии 65 мин.
4. Перерыв 10 мин.
5. Опрос, дискуссия, самостоятельное решение ситуационной задачи 65 мин.
6. Тестовый контроль исходного уровня знания 15 мин.
7. Подведение итогов занятия, задание к следующему занятию 5 мин.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЗАНЯТИЯ:

Контрольные вопросы:

1. Моноклональные антитела (МкАТ). Определение. Характеристика. Этапы производства МкАТ.
2. Антикоагулянты? Какую классификацию их вы знаете?
3. Тромболитики? Какую классификацию их вы знаете?
4. Что такое липосомы?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ВХОДНОГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ:

1. Тромболитик прямого действия, являющийся активатором Пг, и относящийся к тромболитикам 1 поколения, м.м. = 40000-50000:

А стрептокиназа

- Б урокиназа
- В стрептодеказа

2. Фрагмент антитела, состоящий из двух доменов Н-цепи, соединенных между собой дисульфидной связью, обозначается:

- А Fc
- Б Fab
- В Fv

3. К АПг относятся:

- А кабриказа
- Б актилизе
- В стрептаза
- Г гепарин

4. Механизм получения пролекарства на основе моноклональных антител заключается в:

- а) использовании лекарства в неактивной форме
- б) использовании лекарства в активной форме
- в) связывании лекарства с ферментом
- г) заключении антитела в липосомы
- д) связывании фермента с моноклональным антителом

5. Активация лекарственного средства у клетки – мишени происходит за счет:

- а) введения активаторов связывания
- б) локального повышения температуры вблизи клетки - мишени
- в) связывания фермента с моноклональным антителом

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5
Правильный вариант ответа	А	А	А Б В	А В Г Д	В

РАЗБОР СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ НА ЗАНЯТИИ

ЗАДАЧА. Многие исследователи пытались отыскать способы получения антител узкой специфичностью.

- Иммунизация *in vitro* при производстве моноклональных антител, преимущества.
- Клонирование гибридомных клеток, известные вам методы клонирования.
- Принцип работы теста для ранней диагностики беременности с помощью моноклональных антител.

ЭТАЛОН ОТВЕТА. В последнее время активно развиваются методы полной иммунизации внеорганизма с целью получения гибридомы. Иммунизация *in vitro* имеет ряд существенных преимуществ:

- укорачивается период иммунизации до 4-5 суток;
- требуется существенно меньшее количество антигена;
- ко многим антигенам можно получить более выраженный иммунный ответ (частично за счет снижения вклада толерантности и супрессии);

- повышается процент отвечающих клеток;
- легко проверять факторы, влияющие на эффективность иммунизации.

Клонирование осуществляется для выделения стабильных клонов гибридных клеток. Для недавно образованных гибридных клеток характерна высокая нестабильность, связанная с утратой хромосом. При культивировании могут появляться клетки, потерявшие способность продуцировать антитела и они могут перерасти в антителообразующие гибридные клетки.

К основным методам клонирования клеток относятся клонирование методом лимитирующих разведений, клонирование в полужидком агаре и клонирование с помощью прибора – проточного цитофлуориметра.

Принцип работы теста для ранней диагностики беременности. На поверхности индикаторной полоски иммобилизованы антитела к хорионическому гонадотропину. В тестовой и контрольной зонах нанесены моноклональные меченые антитела. В контрольной зоне также нанесено минимальное количество антигена - гонадотропина хорионического. При проведении анализа полоску опускают в исследуемый образец мочи до отмеченного на полоске уровня. В процессе движения жидкости вверх по полоске определяемый антиген взаимодействует с иммобилизованными антителами, вызывая их постепенное насыщение. При наличии в моче хорионического гонадотропина в концентрации выше 25 мг/мл в тестовой зоне - образуется «сендвич» антитело - определяемый антиген – меченое антитело и появляется полоса розового цвета. При отсутствии в пробе гонадотропина хорионического окраски в тестовой зоне не наблюдается. В контрольной зоне, расположенной выше тестовой зоны, образуется «сендвич» антитело-стандартный антиген-меченое антитело» и появляется полоса розового цвета. Таким образом, при наличии двух розовых полос на тесте концентрация гонадотропина в моче превышает уровень 25 мг/мл и с достоверностью близкой к 100 % можно говорить об установлении факта беременности. Наличие только одной розовой полосы в контрольной зоне свидетельствует об отсутствии беременности.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА. РЕШЕНИЕ СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ.

ЗАДАЧА. Многие исследователи пытались отыскать способы получения антител с узкой специфичностью.

- Какие этапы включает процедура получения моноклональных антител?
- Назначение процесса иммунизации животных при получении моноклональных антител.
- Какие клетки используют для гибридизации *in vivo* при производстве моноклональных антител?

ЭТАЛОН ОТВЕТА. Процедура получения моноклональных антител включает в себя следующие этапы:

- иммунизация животных
- подготовка клеток к слиянию
- слияние
- отбор индуцирующих специфические антитела клонов
- клонирование и реклонирование

- массовая наработка гибридных клеток
- получение культуральной жидкости или асцита, содержащих антитела
- выделение антител.

Обычно вся процедура от момента начала иммунизации до выделения антител занимает 3-4 месяца. Назначение процесса иммунизации состоит в том, чтобы увеличить долю клеток, продуцирующих антитела заданной специфичности, и перевести эти клетки в функциональное состояние, при котором они способны сливаться и образовывать антителообразующие гибридные клетки.

Экспериментально установлено, что для гибридизации необходимо выделять селезеночные клетки животных через 3-4 суток после последнего введения антигена, то есть тогда, когда в лимфоидных органах много активно пролиферирующих клеток.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ИСХОДЯЩЕГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ

1. Моноклональные антитела получают в производстве:

- а) фракционированием антител организма
- б) фракционированием лимфоцитов
- в) по гибридной технологии
- г) очисткой антител методом аффинной хроматографии
- д) химико-ферментативным синтезом

2. Существенность гена у патогенного организма - кодируемый геном - продукт, необходим для

- а) размножения клетки
- б) поддержания жизнедеятельности
- в) инвазии в ткани
- г) инактивации антимикробного вещества
- д) идентификации гена

3. Мишенью для физических и химических мутагенов в клетке биообъектов являются

- а) ДНК
- б) ДНК-полимераза
- в) РНК-полимераза
- г) рибосома
- д) информационная РНК

4. Мониторинг (применительно к лекарству) - это

- а) введение в организм
- б) выделение
- в) выявление в тканях
- г) слежение за концентрацией
- д) дозирование

5. Способ сохранения нужной биотехнологу продуктивности культур микроорганизмов

- а) в холодильнике
- б) под слоем минерального масла
- в) в сыпучих материалах

г) сублимационное высушивание

д) криохранение

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5
Правильный вариант ответа	В	Б	А	Г	Г

ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАНЯТИЮ ПРЕПОДАВАТЕЛЯМ:

Основная:

1. Биотехнология. Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева – М.: «Академия», 2007. – С. 85-101, 182-191, 204-218.

2. Фармацевтическая биотехнология: Учебное пособие для студентов высших уч. заведений Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л., Михалева Л.К., Белова Л.С. Ростов-на-Дону Феникс Томск Издательство НТЛ Сибирский Государственный медицинский Университет, 2006. – 251 с.

3. Фармацевтическая биотехнология: рук. к практ. занятиям: учеб. пособие / С.Н. Орехов ; под ред. В.А. Быкова, А.В. Катлинского. – м.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – С. 123-142.

4. Фармацевтическая биотехнология: руководство к практическим занятиям: учеб. пособие / . 2-е изд., перераб. и доп. С.Н. Орехов М.: ГЭОТАР- Медиа, 2015. – 432 с.

Дополнительная:

5. Терминологический словарь по биотехнологии

6. Биология: учеб. пособие / Г.Г. Чебышев ; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 416 с.

7. Микробиология, вирусология и иммунология: рук. к лаб. занятиям: учеб. пособие / В.С. Сбойчакова; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 320 с.

8. Микробиология: учебник для студентов фармацевтических ВУЗов / А.А. Воробьев и др.; – М.: «Медицина», 2003. – 336 с.

Занятие № 9.

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: «ЛВ и ЛС, полученные на основе рекомбинантных м/о: гормоны. Стероидные гормоны».

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: студенты должны изучить биотехнологию гормональных препаратов.

ЗНАЧИМОСТЬ: данный раздел фармацевтической биотехнологии является очень обширным и достаточно важным достижением науки. Получение гормонов биотехнологическими методами позволяет получить химически чистые ЛС, лишенные множества побочных (токсических) реакций. Будущий специалист должен знать биотехнологию гормонов.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЗАНЯТИЯ (в академических часах) – 4.

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ: 527 аудитория, 2 корпус.

ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ И БЮДЖЕТ УЧЕБНОГО ВРЕМЕНИ:

1. Организационный момент 5 мин.
2. Тестовый контроль входного уровня знания 15 мин.
3. Опрос, дискуссия, разбор ситуационной задачи на занятии 65 мин.
4. Перерыв 10 мин.
5. Опрос, дискуссия, самостоятельное решение ситуационной задачи 65 мин.
6. Тестовый контроль исходного уровня знания 15 мин.
7. Подведение итогов занятия, задание к следующему занятию 5 мин.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЗАНЯТИЯ:

Контрольные вопросы:

1. Инсулин. История открытия и развития технологии. Методы получения различных инсулинов, механизм действия.
2. СТГ.
3. Эритропоэтин.
4. Пептидные факторы роста тканей.
5. Стероидные гормоны: общие сведения.

6. Биотрансформация.
7. Биоконверсия стероидов.
8. Микробиологический синтез преднизолона.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ВХОДНОГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ:

1. Гормон гликопротеиновой природы, стимулирующий пролиферацию и дифференцировку чувствительных клеток в морфологически распознаваемые эритробласты – это:

- а) эритропоэтин
- б) соматотропный гормон
- в) инсулин

2. Соматотропный гормон состоит из:

- а) 191 аминокислоты
- б) 189 аминокислоты
- в) 101 аминокислоты

3. Производство инсулина, идентичного человеческому, осуществляется:

- а) высокоэффективной очисткой инсулина животного происхождения
- б) превращением свиного инсулина замещением аланина на треонин
- в) химическим синтезом
- г) генно-инженерным методом

4. Отличия препарата генно – инженерного соматотропина от гормона, выделяемого из гипофиза, заключаются в:

- а) разной степени чистоты
- б) разном аминокислотном составе
- в) отсутствии нейротоксических вирусов

5. Промышленным источником препаратов эритропоэтина являются:

- а) моча больных анемией
- б) донорская кровь животных, больных анемией
- в) культура клеток млекопитающих

6. Инсулин состоит из:

- а) 3-х пептидных цепей
- б) 2-х пептидных цепей
- в) 2-х дисульфидных мостиков
- г) 3-х дисульфидных мостиков

7. Длительность действия препаратов инсулина зависит от:

- а) количества ионов инсулина
- б) размеров кристаллов инсулина
- в) наличия аморфного инсулина
- г) количества консерванта нипагина и фенола

8. Инсулин образует стойкие комплексы с ионами:

- а) магния
- б) цинка
- в) кальция
- г) натрия

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5	6	7	8
Правильный вариант ответа	А	А	Г	А В	В	Б	Б	Б

РАЗБОР СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ НА ЗАНЯТИИ.

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

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

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

ЭТАЛОН ОТВЕТА. Выбор конкретного продуцента рекомбинантных белков, в частности инсулина, предусматривает его промышленное применение в качестве суперпродуцента. В этом отношении можно предложить использовать *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* и др. микроорганизмы, которые могут секретировать целевой продукт в культуру-растворную жидкость. Преимуществом *Esherichia coli* по сравнению с этими микроорганизмами считают то, что синтезируемые кишечной палочкой чужеродные белки депонируются внутри клеток в виде белковых тел (так называемых *Dense bodies*) и недоступны для действия протеаз, от которых нет защиты у других вышеуказанных продуцентов. Применение *Esherichia coli* в качестве промышленного штамма также целесообразно благодаря наиболее низкому уровню опасности для персонала и окружающей среды, что достигается обеспечением фильтрами всех линий, через которые происходят газовые выбросы из ферментеров, и термической стерилизацией всех стоков, содержащих биоматериал.

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

- Химический синтез генов, кодирующих образование цепей А и В в определенной последовательности нуклеотидов.
- Конструирование вектора.
- Введение каждого синтетического гена в плазмиду: в одну - ген, синтезирующий цепь А, в другую - ген, синтезирующий цепь В.

- Для интенсивной репликации плазмид в каждую из них вводят также ген, кодирующий образование фермента β -галактозидазы.
- Введение полученных плазмид в клетку *Escherichia coli* с последующим получением двух культур продуцента, одна из которых синтезирует цепь А, а другая - цепь В.
- Культуры помещают в ферментер, в культуральную среду добавляют галактозу, которая индуцирует образование фермента β -галактозидазы. При этом плазмиды активно реплицируются и в результате получается большое количество генов, синтезирующих цепи А и В.
- Клетки лизируют, выделяют цепи А и В, которые обрабатывают бромцианом для отщепления от них β -галактозидазы.
- Затем следует очистка и выделение А и В-цепей.
- Далее окисляют остатки цистеина и соединяют цепи А и В.

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

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА. РЕШЕНИЕ СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ.

ЗАДАЧА. В качестве продуцента рекомбинантного человеческого инсулина используют также пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, так как они обладают рядом преимуществ перед другими изученными и культивируемыми в промышленном масштабе микроорганизмами.

- Тип нуклеиновой кислоты, применяемой для переноса в геном (построения вектора), в производстве рекомбинантного инсулина, источник ее получения.
- Селекцию трансформированных сахарометов при производстве рекомбинантного инсулина проводят на питательной среде, не содержащей аминокислоты лейцин. Почему?
- Метод культивирования продуцента *Saccharomyces cerevisiae* при производстве рекомбинантного инсулина.

Культуральную суспензию *Saccharomyces cerevisiae* разделяют центрифугированием, целевой продукт выделяют из культуральной жидкости и очищают методами ионообменной и гель-хроматографии. Далее его подвергают биоконверсии по реакции транспептидации, используя трипсин и бета-карбоксипептидазу. С какой целью производится реакция транспептидации?

ЭТАЛОН ОТВЕТА. Ген синтеза проинсулина получают ферментативным методом на основе РНК выделенной из клеток островков Лангерганса поджелудочной железы человека.

Так как в качестве вектора используют *Scpl* -двухмикронную плазмиду, содержащую в качестве гена-маркера ген синтеза аминокислоты лейцин, а в качестве сильного промотора - промотор лактазного оперона. Для эффективной трансформации рекомбинантной ДНК клетки

дрожжей, ауксотрофные по лейцину, подвергают ферментативному сферопластированию. Сферопласты *Saccharomyces cerevisiae* и рекомбинантные ДНК инкубируют в присутствии

полиэтиленгликоля и кальция хлорида. Селекцию трансформированных сахарометов проводят на питательной среде, не содержащей аминокислоты лейцин, в результате выживают только те клоны, которые несут интактную плазмиду или усвоили рекомбинантную ДНК, несущую ген синтеза аминокислоты лейцин.

Культивирование продуцентов прекурсора инсулина ведут глубинным методом на питательной среде с мелассой.

Далее проинсулин инсулина подвергают биоконверсии по реакции транспептидации, используя трипсин и бета-карбоксипептидазу с целью отщепления пептида С и получения молекулы инсулина.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ИСХОДЯЩЕГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ:

1. Проинсулин – это белок, который состоит из:

- а) 2-х молекул инсулина
- б) 84-х аминокислотных остатков
- в) инсулина и инсулиноподобных белков
- г) 4-х молекул инсулина

2. Преимуществом генно-инженерного инсулина является:

- а) высокая активность
- б) меньшая аллергенность
- в) меньшая токсичность
- г) большая стабильность

3. Молекула инсулина свиней отличается от молекулы человеческого инсулина следующими параметрами:

- а) тремя аминокислотами
- б) одной аминокислотой
- в) наличием дисульфидных мостиков
- г) количеством полипептидных цепей

4. Метод получения гена инсулина:

- а) химико-ферментативный
- б) ферментативный на основе мРНК
- в) выделение из генома рестриктазой
- г) химический

5. Активность субстанции инсулина определяют:

- а) на людях-добровольцах
- б) на кроликах
- в) на мышах
- г) на кошках

6. Инсулин стандартизируют по:

- а) молекулярной массе
- б) гипогликемическому эффекту
- в) повышению артериального давления
- г) гипергликемическому эффекту

7. Монокомпонентный инсулин получают методом:

- а) гель-хроматографии
- б) ионообменной хроматографии

- в) гидрофобной хроматографии
- г) аффинной хроматографии

8. Ослабление ограничений на использование в промышленности микроорганизмов-рекомбинантов, продуцирующих гормоны человека, стало возможным благодаря

- а) совершенствованию методов изоляции генно-инженерных рекомбинантов от окружающей среды
- б) повышению квалификации персонала, работающего с рекомбинантами
- в) установленной экспериментально слабой жизнеспособности рекомбинанта
- г) экспериментальному подтверждению обязательной потери чужеродных генов
- д) правилам GMP

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5	6	7	8
Правильный вариант ответа	Б	Б	Б	А	Б	Б	Г	Г

ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАНЯТИЮ ПРЕПОДАВАТЕЛЯМ:

Основная:

1. Биотехнология. Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева – М.: «Академия», 2007. – С. 85-101, 182-191, 204-218.
2. Фармацевтическая биотехнология: Учебное пособие для студентов высших уч. заведений Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л., Михалева Л.К., Белова Л.С. Ростов-на-Дону Феникс Томск Издательство НТЛ Сибирский Государственный медицинский Университет, 2006. – 251 с.
3. Фармацевтическая биотехнология: рук. к практ. занятиям: учеб. пособие / С.Н. Орехов ; под ред. В.А. Быкова, А.В. Катлинского. – м.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – С. 123-142.
4. Фармацевтическая биотехнология: руководство к практическим занятиям: учеб. пособие /. 2-е изд., перераб. и доп. С.Н. Орехов М.: ГЭОТАР- Медиа, 2015. – 432 с.

Дополнительная:

5. Терминологический словарь по биотехнологии
6. Биология: учеб. пособие / Г.Г. Чебышев ; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 416 с.
7. Микробиология, вирусология и иммунология: рук. к лаб. занятиям: учеб. пособие / В.С. Сбойчакова; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 320 с.
8. Микробиология: учебник для студентов фармацевтических ВУЗов / А.А. Воробьев и др.; – М.: «Медицина», 2003. – 336 с.

Занятие № 10.

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: «Биотехнология аминокислот, витаминов и коферментов».

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: студенты должны изучить биотехнологические методы получения аминокислот и витаминов.

ЗАНЧИМОСТЬ: Получение аминокислот, витаминов и коферментов биотехнологическим методами позволяет получить высокоэффективные химически чистые ЛС. Будущий специалист должен знать биотехнологические способы получения данных лекарственных средств.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЗАНЯТИЯ (в академических часах) – 4.

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ: 527 аудитория, 2 корпус.

ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ И БЮДЖЕТ УЧЕБНОГО ВРЕМЕНИ:

1. Организационный момент 5 мин.
2. Тестовый контроль входного уровня знания 15 мин.
3. Опрос, дискуссия, разбор ситуационной задачи на занятии 65 мин.
4. Перерыв 10 мин.
5. Опрос, дискуссия, самостоятельное решение ситуационной задачи 65 мин.
6. Тестовый контроль исходного уровня знания 15 мин.
7. Подведение итогов занятия, задание к следующему занятию 5 мин.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЗАНЯТИЯ:

Контрольные вопросы.

I. Вопросы для проверки уровня знаний:

1. Что такое аминокислоты? Какова их структура?
2. Методы получения аминокислот L-аскорбиновая кислота.
3. Механизмы регуляции биосинтеза аминокислот
4. Витамины. Традиционные методы получения. Перспективы развития биотехнологии в получении витаминных препаратов.
5. Микробиологический синтез витаминов.
6. Витамин B₁₂, Витамин PP, витамин B₂, пантотеновая кислота.

7. Витамин D, эргостерин, витамин А

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ВХОДНОГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ:

1. Для промышленного получения аскорбиновой кислоты применяют метод Рейхштейна. Согласно данному методу, процесс состоит из 6 стадий, одна из которых является биотехнологической:

- а) получение D-сорбита из D-глюкозы методом каталитического восстановления водородом
- б) получением L-сорбозы из D-сорбита методом глубинного аэробного окисления
- в) получение диацетон-L-сорбозы из L-сорбозы путем ее ацетонирования
- г) получение гидрата диацетон-2-кето-L-гулоновой кислоты путем окисления диацетон-L-сорбозы

2. Биотехнологический процесс получения аскорбиновой кислоты может включать:

- а) культивирование трансформированных клеток *Erwiniaherbicola*
- б) микробиологическое расщепление целлюлозы
- в) совместное культивирование микроорганизмов *Corinebacterium* и *Erwiniaherbicola*
- г) последовательное культивирование микроорганизмов *Corinebacterium* и *Erwiniaherbicola*

3. Аминокислоты в свете биотехнологического процесса являются:

- а) первичными метаболитами
- б) вторичными метаболитами
- в) витаминами
- г) внеклеточными целевыми продуктами

4. Периоду развития биотехнологии по производству витаминов соответствует период развития:

- а) допастеровский
- б) послепастеровский
- в) антибиотиков
- г) новой и новейшей биотехнологии
- д) управляемого биосинтеза

5. В биотехнологическом производстве никотиновой кислоты (витамина РР) в качестве продуцента НАД используют:

- а) *E. coli*
- б) бета-аланин и калия пантонат
- в) пекарские дрожжи
- г) крахмал

6. Дрожжи-сахаромицеты культивируют в аэробных условиях при избытке углеводов в питательной среде, сниженном количестве азота и оптимальном содержании кислорода для получения:

- а) сразу кристаллического витамина D₂
- б) рабофлавина
- в) аскорбиновой кислоты
- г) провитамина D₂

7. Кишечная палочка *E. Coli* является продуцентом для:

- а) витаминов B₁₂ и аскорбиновой кислоты

- б) витамина В₁₂ и убихинонов
- в) витамина В₁₂ и пантотеновой кислоты
- г) витамина В₁₂ и витамина D

8. Перспективно использование в качестве продуцента грибов рода *Candida* растущих на углеводных средах, *Candidamaltose*, при культивации которых получения липидная фракция называется «микробный жир» для получения:

- а) витаминов В₁₂ и аскорбиновой кислоты
- б) витамина В₁₂ и убихинонов
- в) эргостерина и пантотеновой кислоты
- г) убихинонов и витамина D₂

9. Витамин РР, его продуцент НАД в биотехнологическом производстве:

- а) пекарские дрожжи
- б) *E. coli*
- в) бета-аланин и калия пантонат
- г) крахмал

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Правильный вариант ответа	Б	А	А	Г	В	Г	В	Г	А

РАЗБОР СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ НА ЗАНЯТИИ.

Задача. В процессе промышленного производства аскорбиновой кислоты используют многостадийный химический синтез, в который наряду с тонкими химическими реакциями встроена и технологически необходимая биосинтетическая реакция, что является одним из примеров успешного сочетания органического синтеза с биосинтезом. При проведении технологического этапа биосинтеза на производстве применяют определенные микроорганизмы, осуществляющие биосинтетические реакции. Не менее важными являются оптимизация условий ферментации и контроль за количеством биомассы микроорганизмов в ферментационном аппарате.

Проанализируйте ситуацию с точки зрения:

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

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

жидкости. Совершенствование этой стадии в части повышения выхода целевого продукта при переходе от периодического культивирования продуцента *Gluconobacter oxydans* к непрерывному в аппарате колонного типа позволило увеличить скорость образования сорбозы в 1,7 раза. Также можно привести пример получения 2-кето- β -гулоновой кислоты (промежуточный продукт синтеза витамина С), которая легко превращается в аскорбиновую кислоту. Это метод двух-стадийного микробиологического синтеза, включающий окисление D-глюкозы в 2, 5-дикето-О-глюконовую кислоту с дальнейшей биотрансформацией в 2-кето- β -гулоновую кислоту. Наиболее продуктивными микроорганизмами, осуществляющими эту реакцию, являются представители родов *Acetobacter*, *Erwinia*, *Gluconobacter*, в частности мутантный штамм *Erwinia punctate*, который обеспечивает выход до 94,5% 2, 5-дикето-О-глюконовой кислоты от общего количества исходной глюкозы

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА. РЕШЕНИЕ СИТУАЦИОННЫХ ЗАДАЧ.

Задача 1. Витамины как группа незаменимых органических соединений различной химической природы необходимы любому организму в небольших концентрациях с целью выполнения в нем каталитических и регуляторных функций. С помощью биотехнологии сегодня можно получать в необходимых количествах такие витамины, как В2, В12, р-каротин, витамин РР, эргостерин, аскорбиновую кислоту.

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

- биообъекты, которые используют в каждом конкретном случае;
- получение суперпродуцентов рибофлавина и витамина В2,
- преимущества биотехнологического производства витаминов.

Эталон ответа. С помощью биотехнологии производство витаминов стало не только высокоэкономичным (не требует дорогостоящего оборудования), но и экологичным (без агрессивных сред) и безвредным для работающего персонала. Известно, что высокой биологической активностью часто обладают не сами витамины, а их производные - коферменты. Например, для рибофлавина характерно функционирование в двух коэнзимных формах: флавиномононуклеотида и флавинадениндинауклеотида. Активным продуцентом рибофлавина является культура дрожжеподобного гриба *Ermothecium ashbyii* и *Ashbya gossipii*. Сверхсинтеза рибофлавина достигают при использовании мутагенов для нарушения механизма ретроингибирования у продуцентов. Одновременно для активного биосинтеза целевого продукта в питательную среду вносят соевую муку или кукурузный экстракт, сахарозу, карбонат кальция, хлорид натрия, витамины. Кроме того, методами генной инженерии получен рекомбинантный штамм-продуцент (*Bacillus subtilis*) с повышенной устойчивостью к экзогенной контаминации. Продуцентом витамина В12* являются пропионовые бактерии, продуктивность которых резко повышается при добавлении в среду предшественника витамина В12* - 5, 6-диметилбензинимидазола - и использовании мутантных штаммов. Если 5,6-диметилбензинимидазол не добавлять, то вместо витамина В12* синтезируется фактор В (кобинамид) и псевдовитамин В12, которые не обладают терапевтическим эффектом. Продуцентом кофермента НАД являются пекарские дрожжи. Выход НАД значительно увеличивается при добавлении в среду предшественников (аденина и никотинамида). Кроме того, можно повысить проницаемость мембран, обрабатывая клетки микроорганизмов ПАВ (поверхностно-активными веществами), например,

цетилсульфатом натрия и др. При производстве аскорбиновой кислоты используют биотрансформацию D-сорбита в L-сорбозу уксуснокислыми бактериями. В качестве промышленного источника эргостерина*⁷ применяют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Получение (β -каротина* возможно микробиологическими методами, однако при этом нужно использовать дорогие среды сложного состава, поэтому более рентабельным является химический синтез.

Преимущества использования биотехнологических методов при производстве витаминов:

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

Задача 2. Аминокислоты известны как составные элементы белков. Биологически активными являются только L-стереоизомеры аминокислот. Чистые L-аминокислоты находят свое применение в медицине в качестве или самостоятельных лечебных препаратов (L-метионин), или в составе смесей для парентерального питания, и в фармацевтической промышленности при синтезе различных ЛС. Используют их и как добавки при коррекции питания. Аминокислоты получают различными способами: биологическим, химическим, химико-энзиматическим, микробиологическим. В настоящее время аминокислоты как ЛС завоевали себе определенный и довольно значительный сегмент от общего объема фармацевтической продукции.

С учетом представленной информации проведите сравнительный анализ:

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

Эталон ответа. При получении аминокислот применяют различные методы.

- Биологический метод (гидролиз белоксодержащих субстратов) наиболее дешевый. Однако существуют ограничения по стандартизации и по источникам сырья. Также из-за проблемы чистоты препаратов необходима многоступенчатая химическая очистка с частичным разрушением целевых продуктов (триптофан, треонин, серин, цистеин и др.).
- Химический синтез: образуется смесь D и L-изомеров, тогда как биологически активными являются только L-изомеры аминокислот. Такое производство дорогое, небезопасно и неэкологично.
- Тем не менее производство аминокислоты (глицина) и метионина данным методом рентабельно (в первом случае из-за отсутствия изомеров, во втором - вследствие равной терапевтической активности изомеров).
- Химико-энзиматический метод проводят в 2 этапа. Сначала химически синтезируют предшественник аминокислоты, например, карбоновую кислоту, а затем осуществляют биотрансформацию предшественника ферментами живых клеток. Таким путем можно получать, например, аспарагиновую кислоту на основе фумаровой или фенилаланин на основе коричной кислоты. Однако способ дорогой и сложный.

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

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

Их биосинтез контролируется на уровне первого фермента общего участка согласованным ингибированием конечными продуктами (ретроингибирование). Кроме того, в селекции продуцентов аминокислот активно применяют методы генной инженерии. Например, при вставке генов треонина в плазмиды для их клонирования значительно повышается количество ферментов, ответственных за биосинтез соответствующей аминокислоты. Особенностью питательных сред является добавление в ограниченном количестве той аминокислоты, биосинтез которой блокирован в результате мутагенного воздействия. Таким методом получают, в частности, глутаминовую кислоту, лизин, треонин.

ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАНЯТИЮ ПРЕПОДАВАТЕЛЯМ:

Основная:

1. Биотехнология. Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева – М.: «Академия», 2007. – С. 85-101, 182-191, 204-218.
2. Фармацевтическая биотехнология: Учебное пособие для студентов высших уч. заведений Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л., Михалева Л.К., Белова Л.С. Ростов-на-Дону Феникс Томск Издательство НТЛ Сибирский Государственный медицинский Университет, 2006. – 251 с.
3. Фармацевтическая биотехнология: рук. к практ. занятиям: учеб. пособие / С.Н. Орехов ; под ред. В.А. Быкова, А.В. Катлинского. – м.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – С. 123-142.
4. Фармацевтическая биотехнология: руководство к практическим занятиям: учеб. пособие /. 2-е изд., перераб. и доп. С.Н. Орехов М.: ГЭОТАР- Медиа, 2015. – 432 с.

Дополнительная:

5. Терминологический словарь по биотехнологии
6. Биология: учеб. пособие / Г.Г. Чебышев ; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 416 с.
7. Микробиология, вирусология и иммунология: рук. к лаб. занятиям: учеб. пособие / В.С. Сбойчакова; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 320 с.
8. Микробиология: учебник для студентов фармацевтических ВУЗов / А.А. Воробьев и др.; – М.: «Медицина», 2003. – 336 с.

Занятие № 11.

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Модуль № 2 по темам:

«ЛВ и ЛС, полученные на основе рекомбинантных м/о: моноклональные антитела, тромболитики и антикоагулянты, аминокислоты», «ЛВ и ЛС, полученные на основе рекомбинантных м/о: гормоны», «Вакцины. Цитокины. Иммунобиотехнология».

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: закрепление и систематизация знаний у студентов по изученным за модуль темам.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЗАНЯТИЯ (в академических часах) – 4.

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ: 527 аудитория, 2 корпус.

ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ И БЮДЖЕТ УЧЕБНОГО ВРЕМЕНИ:

1. Организационный момент 5 мин.
2. Тестовый контроль входного уровня знания 15 мин.
3. Опрос, дискуссия, разбор ситуационной задачи на занятии 65 мин.
4. Перерыв 10 мин.
5. Опрос, дискуссия, самостоятельное решение ситуационной задачи 65 мин.
6. Тестовый контроль исходного уровня знания 15 мин.
7. Подведение итогов занятия, задание к следующему занятию 5 мин.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЗАНЯТИЯ:

Контрольные вопросы:

1. Моноклональные антитела.
2. Тромболитики и антикоагулянты.
3. Аминокислоты.
4. L-аскорбиновая кислота.
5. Витамины. Традиционные методы получения.
6. Микробиологический синтез витаминов.
7. Витамин В12, Витамин РР, витамин В2, пантотеновая кислота.

8. Витамин D, эргостерин, витамин А.
9. Инсулин. История открытия и развития технологии. Методы получения различных инсулинов, механизм действия.
10. СТГ.
11. Эритропоэтин.
12. Пептидные факторы роста тканей.
13. Стероидные гормоны: общие сведения.
14. Биотрансформация.
15. Биоконверсия стероидов.
16. Микробиологический синтез преднизолона.
17. Вирусы, их строение. Репликация вирусов.
18. Подходы к разработке вакцин с помощью технологии рекомбинантных ДНК.
19. ДНК – вакцины. Принципы их действия.
20. Противогерпетические и противосальмонеллезные вакцины.
21. Цитокины. Интерфероны. Типы ИФН человека.
22. Получение кДНК из ИФН.
23. Интерлейкины.
24. Препараты ИФН человека.

ЭТАЛОНЫ ТЕСТОВЫХ МОДУЛЬНЫХ ЗАДАНИЙ:

Вариант 1

1. Гормон гликопротеиновой природы, стимулирующий пролиферацию и дифференцировку чувствительных клеток в морфологически распознаваемые эритробласты – это:

- а) эритропоэтин
- б) соматотропный гормон
- в) инсулин

2. Соматотропный гормон состоит из:

- а) 191 аминокислоты
- б) 189 аминокислоты
- в) 101 аминокислоты

3. Производство инсулина, идентичного человеческому, осуществляется:

- а) высокоэффективной очисткой инсулина животного происхождения
- б) превращением свиного инсулина замещением аланина на треонин
- в) химическим синтезом
- г) генно-инженерным методом

4. Отличия препарата генно – инженерного соматотропина от гормона, выделяемого из гипофиза, заключаются в:

- а) разной степени чистоты
- б) разном аминокислотном составе
- в) отсутствии нейротоксических вирусов

5. Промышленным источником препаратов эритропоэтина являются:

- а) моча больных анемией
- б) донорская кровь животных, больных анемией
- в) культура клеток млекопитающих

6. Применение человеческих противовирусных вакцин ограничено:

- а) невозможностью культивирования всех патогенных микроорганизмов
- б) потенциальной опасностью в работе с патогенными микроорганизмами и вирусами
- в) возможностью аттенуированных штаммов к исходному вирулентному штамму
- г) высокой стоимостью производства традиционных вакцин

7. Субъединичные вакцины - это:

- а) вакцины против одного возбудителя
- б) генетически модифицированный патогенный микроорганизм
- в) непатогенные микроорганизмы с клонированным геном, кодирующим антигенные детерминанты патогенного организма

8. Недостатки субъединичных вакцин:

- а) низкая эффективность
- б) высокая стоимость
- в) риск изменения конформации белка (антигенных свойств)
- г) способность проявлять вирулентность

9. Пероральные вакцины, созданные методом двойной делеции, это:

- а) мертвые вакцины, прошедшие двойную стерилизацию
- б) живые вакцины на основе патогенных бактерий с удаленными из генома областями, отвечающими за независимые жизненно важные функции
- в) живые вакцины на основе патогенных бактерий с удаленными из генома областями, отвечающими за вирулентность

10. Большие количества ИФН получают из:

- а) шестидневных однослойных культур клеток куриного эмбриона
- б) культивируемых лейкоцитов крови человека, зараженных определенным видом вируса
- в) генно-инженерным путем

11. Тромболитик прямого действия, являющийся активатором Пг, и относящийся к тромболитикам 1 поколения, м.м. = 40000-50000:

- А стрептокиназа
- Б урокиназа
- В стрептодеказа

12. Фрагмент антитела, состоящий из двух доменов Н-цепи, соединенных между собой дисульфидной связью, обозначается:

- А Fc
- Б Fab
- В Fv

13. К АПг относятся:

- А кабриказа
- Б актилизе
- В стрептаза
- Г гепарин

14. Механизм получения пролекарства на основе моноклональных антител заключается в:

- а) использовании лекарства в неактивной форме
- б) использовании лекарства в активной форме
- в) связывании лекарства в ферментом

- г) заключении антитела в липосомы
- д) связывании фермента с моноклональным антителом

15. Активация лекарственного средства у клетки – мишени происходит за счет:

- а) введения активаторов связывания
- б) локального повышения температуры вблизи клетки - мишени
- в) связывания фермента с моноклональным антителом

Вариант 2

1. Инсулин состоит из:

- а) 3-х пептидных цепей
- б) 2-х пептидных цепей
- в) 2-х дисульфидных мостиков
- г) 3-х дисульфидных мостиков

2. Длительность действия препаратов инсулина зависит от:

- а) количества ионов инсулина
- б) размеров кристаллов инсулина
- в) наличия аморфного инсулина
- г) количества консерванта нипагина и фенола

3. Инсулин образует стойкие комплексы с ионами:

- а) магния
- б) цинка
- в) кальция
- г) натрия

4. Проинсулин – это белок, который состоит из:

- а) 2-х молекул инсулина
- б) 84-х аминокислотных остатков
- в) инсулина и инсулиноподобных белков
- г) 4-х молекул инсулина

5. Преимуществом генно-инженерного инсулина является:

- а) высокая активность
- б) меньшая аллергенность
- в) меньшая токсичность
- г) большая стабильность

6. Период получения вирусных вакцин относится к периоду развития биотехнологии:

- а) дрипастеровскому
- б) послепастеровскому
- в) управляемого биосинтеза
- г) антибиотиков
- д) новой и новейшей биотехнологии

7. По происхождению иммуностимуляторы подразделяют на:

- а) экзогенные
- б) химические
- в) биосинтетические
- г) экстракционные

8. Эндогенные иммуностимуляторы синтезируются:

- а) клетками микроорганизмов
- б) с помощью химических реакций
- в) клетками макроорганизма
- г) половыми клетками

9. ELISA – твердофазный иммуноферментный анализ является :

- а) иммунометрическим
- б) конкурентным
- в) быстрым
- г) гетерогенным

10. Варианты постановки ИФА:

- а) иммунометрический
- б) , конкурентный
- в) люминисцентный
- г) радиоиммунный
- д) флюоресцентный фермента

11. Моноклональные антитела получают в производстве:

- а) фракционированием антител организма
- б) фракционированием лимфоцитов
- в) по гибридомной технологии
- г) очисткой антител методом аффинной хроматографии
- д) химико-ферментативным синтезом

12. Для промышленного получения аскорбиновой кислоты применяют метод Рейхштейна. Согласно данному методу, процесс состоит из 6 стадий, одна из которых является биотехнологической:

- а) получение D-сорбита из D-глюкозы методом каталитического восстановления водородом
- б) получением L-сорбозы из –сорбита методом глубинного аэробного окисления
- в) получение диацетон-L-сорбозы из L-сорбозы путем ее ацетонирования
- г) получение гидрата диацетон-2-кето-L-гулоновой кислоты путем окисления диацетон-L-сорбозы

13. Биотехнологический процесс получения аскорбиновой кислоты может включать:

- а) культивирование трансформированных клеток *Erwiniaherbicola*
- б) микробиологическое расщепление целлюлозы
- в) совместное культивирование микроорганизмов *Corinebacterium* и *Erwiniaherbicola*
- г) последовательное культивирование микроорганизмов *Corinebacterium* и *Erwiniaherbicola*

14. Аминокислоты в свете биотехнологического процесса являются:

- а) первичными метаболитами
- б) вторичными метаболитами
- в) витаминами
- г) внеклеточными целевыми продуктами

15. Периоду развития биотехнологии по производству витаминов соответствует период развития:

- а) допастеровский

- б) послепастеровский
- в) антибиотиков
- г) новой и новейшей биотехнологии
- д) управляемого биосинтеза

Вариант 3

1. Молекула инсулина свиней отличается от молекулы человеческого инсулина следующими параметрами:

- а) тремя аминокислотами
- б) одной аминокислотой
- в) наличием дисульфидных мостиков
- г) количеством полипептидных цепей

2. Метод получения гена инсулина:

- а) химико-ферментативный
- б) ферментативный на основе мРНК
- в) выделение из генома рестриктазой
- г) химический

3. Активность субстанции инсулина определяют:

- а) на людях-добровольцах
- б) на кроликах
- в) на мышах
- г) на кошках

4. Инсулин стандартизируют по:

- а) молекулярной массе
- б) гипогликемическому эффекту
- в) повышению артериального давления
- г) гипергликемическому эффекту

5. Монокомпонентный инсулин получают методом:

- а) гель-хроматографии
- б) ионообменной хроматографии
- в) гидрофобной хроматографии
- г) аффинной хроматографии

6. Вакцины формируют иммунитет:

- а) пассивный
- б) активный
- в) быстрый
- г) медленный

7. Преимущества ИФА перед методом РИА:

- а) меньшая стоимость анализа
- б) легкость освоения персоналом
- в) отсутствие радиоактивных изотопов
- г) возможность визуальной оценки результата

8. «Сендвич» - анализ применим к:

- а) поликлональные иммуноглобулины
- б) иноклональные антитела
- в) поли- и моноклональные антитела

г) аминокислотам

9. В качестве маркера в тесте ИФА установления факта беременности используют:

а) йод-125

б) тритий

в) пероксидазу

г) галактозидазу

10. Гомогенный ИФА основан на:

а) разделении компонентов после проведения реакции

б) изменении активности фермента в процессе реакции

в) адсорбции фермента на носителе

г) подавлении фермента

11. В биотехнологическом производстве никотиновой кислоты (витамина РР) в качестве продуцента НАД используют:

а) E. coli

б) бета-аланин и калия пантонат

в) пекарские дрожжи

г) крахмал

12. Дрожжи-сахаромицеты культивируют в аэробных условиях при избытке углеводов в питательной среде, сниженном количестве азота и оптимальном содержании кислорода для получения:

а) сразу кристаллического витамина D₂

б) рабофлавина

в) аскорбиновой кислоты

г) провитамина D₂

13. Кишечная палочка E. Coli является продуцентом для:

а) витаминов B₁₂ и аскорбиновой кислоты

б) витамина B₁₂ и убихинонов

в) витамина B₁₂ и пантотеновой кислоты

г) витамина B₁₂ и витамина D

14. Перспективно использование в качестве продуцента грибов рода Candida растущих на углеводных средах, Candidamaltose, при культивации которых получения липидная фракция называется «микробный жир» для получения:

а) витаминов B₁₂ и аскорбиновой кислоты

б) витамина B₁₂ и убихинонов

в) эргостерина и пантотеновой кислоты

г) убихинонов и витамина D₂

15. Витамин РР, его продуцент НАД в биотехнологичкой производстве:

а) пекарские дрожжи

б) E. coli

в) бета-аланин и калия пантонат

г) крахмал

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ:

№ варианта	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	А	А	Г	АВ	В	АБВГ	В	БВ	Б	АБ	А	А	АБВ	АВГД	В

2	Б	Б	Б	Б	Б	Г	А	В	Г	А	В	Б	А	А	Г
3	Б	А	Б	Б	Г	Б	Г	В	В	Б	В	Г	В	Г	А

ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАНЯТИЮ ПРЕПОДАВАТЕЛЯМ:

Основная:

1. Биотехнология. Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева – М.: «Академия», 2007. – С. 85-101, 182-191, 204-218.
2. Фармацевтическая биотехнология: Учебное пособие для студентов высших уч. заведений Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л., Михалева Л.К., Белова Л.С. Ростов-на-Дону Феникс Томск Издательство НТЛ Сибирский Государственный медицинский Университет, 2006. – 251 с.
3. Фармацевтическая биотехнология: рук. к практ. занятиям: учеб. пособие / С.Н. Орехов ; под ред. В.А. Быкова, А.В. Катлинского. – м.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – С. 123-142.
4. Фармацевтическая биотехнология: руководство к практическим занятиям: учеб. пособие / . 2-е изд., перераб. и доп. С.Н. Орехов М.: ГЭОТАР- Медиа, 2015. – 432 с.

Дополнительная:

5. Терминологический словарь по биотехнологии
6. Биология: учеб. пособие / Г.Г. Чебышев ; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 416 с.
7. Микробиология, вирусология и иммунология: рук. к лаб. занятиям: учеб. пособие / В.С. Сбойчакова; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 320 с.

Занятие № 12.

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: «Антибиотики. Общая характеристика. Общая схема получения антибиотиков».

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: студенты должны изучить основы биотехнологии антибиотиков, общую технологическую схему, механизмы действия антибиотиков.

ЗНАЧИМОСТЬ: антибиотики – это особая группа ЛС, обладающих высокой физиологической активностью в отношении определенных групп микроорганизмов и злокачественных опухолей. Одним из основных способов получения антибиотиков является биотехнологический метод, состоящий из большого числа технологических стадий. Знания, связанные с особенностями технологии антибиотиков необходимы будущему специалисту для осуществления практической деятельности.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЗАНЯТИЯ (в академических часах) – 4.

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ: 527 аудитория, 2 корпус.

ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ И БЮДЖЕТ УЧЕБНОГО ВРЕМЕНИ:

1. Организационный момент 5 мин.
2. Тестовый контроль входного уровня знания 15 мин.
3. Опрос, дискуссия, разбор ситуационной задачи на занятии 5 мин.
4. Перерыв 10 мин.
5. Опрос, дискуссия, самостоятельное решение ситуационной задачи 65 мин.
6. Тестовый контроль исходного уровня знания 15 мин.
7. Подведение итогов занятия, задание к следующему занятию 5 мин.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЗАНЯТИЯ:

Контрольные вопросы:

1. Общие понятия об антибиотиках (а/б). А/б как вторичные метаболиты.

2. Типы связей между микробиологическими сообществами.
3. Основные этапы развития производства а/б.
4. Причины быстрого роста числа а/б.
5. В чем заключается специфичность а/б.
6. Классификации а/б. Механизмы биосинтеза а/б.
7. Биотехнология а/б. Схема производства а/б по Н.Е. Егорову. Фазы процесса ферментации а/б.
8. Методы выделения и очистки а/б.
9. Механизмы действия а/б.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ВХОДНОГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ:

1. Антибиотики являются:

- А) первичными метаболитами
- Б) вторичными метаболитами

2. Процессы не характерные для тропофазы стадии биосинтеза а/б:

- А) интенсивное накопление биомассы продуцента
- Б) интенсивное накопление а/б
- В) интенсивное поглощение кислорода

3. Процессы характерные для идиофазы стадии биосинтеза а/б:

- А) интенсивное накопление биомассы продуцента
- Б) интенсивное накопление а/б
- В) интенсивное поглощение кислорода

4. Цель стадии предварительной обработки культуральной жидкости в производстве антибиотиков:

- А) освободить культуральную жидкость от кислорода
- Б) освободить культуральную жидкость от продуцента
- В) освободить культуральную жидкость от окислителей
- Г) освободить культуральную жидкость от азотистых соединений

5. Автолиз мицелия продуцента в процессе биосинтеза антибиотиков характерен для стали:

- А) тропофазы
- Б) идиофазы

6. Биотехнология является начальным этапом в процессе производства:

- а) полусинтетических антибиотиков
- б) цианокобаламина
- в) бензилпенициллина
- г) кислоты аскорбиновой

7. Биотехнология является заключительным этапом в процессе производства:

- а) полусинтетических антибиотиков
- б) аминокислот химико-ферментативным методом
- в) кислоты аскорбиновой
- г) рекомбинантного инсулина

8. В развитии биотехнологии период антибиотиков проходил:

- а) 1866-1940 гг.
- б) 1941-1960 гг.

в) 1961-1975 гг.

г) 1975-2001 гг.

9. Практическое значение полусинтетического аминогликозида амикацина обусловлено:

а) активностью против анаэробных патогенов

б) отсутствием нефротоксичности

в) устойчивостью к защитным ферментам у бактерий, инактивирующим другие аминогликозиды

г) активным выделением из клетки

10. Защита продуцентов аминогликозидов от собственного антибиотика:

а) низкое сродство рибосом

б) временная ферментативная инактивация

в) компартментация

г) утолщение клеточной стенки

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5
Правильный вариант ответа	Б	Б	Б	Б	Б
	6	7	8	9	10
	А	Б	Б	В	Б
	11	12	13	14	15
	В	В	Г	Г	Г

РАЗБОР СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ НА ЗАНЯТИИ.

Задача. В настоящее время существует международная программа системы поиска и отбора антимикробных агентов, подавляющих размножение патогена только в инфицированном организме, т.е. система, позволяющая клонировать гены, которые не экспрессируются в искусственных условиях (*in vitro*).

Данная система подразумевает использование определенных методов, реактивов (наборы для клонирования, рестриктазы), тест-объектов и решает такие задачи, как:

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

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

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

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

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

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

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

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

- К этому сдвоенному фрагменту присоединяют лактозный оперон, также лишенный промотора (*lac Z*). Данный оперон необходим для системы окисления лактозы. На этом этапе генные инженеры получают фрагмент, состоящий уже из 3 частей: x-*cat-lac Z*.
- Полученный фрагмент (x-*cat-lac Z*) включают в плазмиду. результате всех манипуляций у генного инженера имеется набор плазмид, отличающихся только по фрагменту x.
- Эти плазмиды с разными частями генома сальмонеллы вводят в клетку *K coli*.
- Далее следует внедрение клеток *E. coli* в организм лабораторного животного (мышь) с одновременным введением ему (ей) хлорамфеникола.
- Через сутки из ткани животного на твердую индикаторную среду с лактозой высевают бактериальную культуру, из которой вырастают колонии красного и белого цвета: колонии красного цвета (окисляющие лактозу и меняющие pH) составляют 90%, а белого (бесцветные) 10%.
- Затем колонии анализируют.

Ход рассуждений следующий: если колония на индикаторной среде с лактозой выросла бесцветной, значит, на искусственной питательной среде данный промотор не работал, и ген во фрагментах «x» не экспрессировался. Вероятно, он нужен только при развитии

инфекционного процесса и принадлежит к генам ш (генам вирулентности). В случае колоний красного цвета экспрессируется ген, кодирующий образование фермента, расщепляющего лактозу, в результате цвет индикатора изменяется, вызывая окрашивание колоний в красный цвет. Таким путем из клеток *Salmonella typhimurium* было выделено около 100 ш-генов, из которых 50 были абсолютно новыми (не описанными ранее). Они представляли интерес как потенциальные мишени для отбора антимикробных агентов.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА. РЕШЕНИЕ СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ.

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

Проанализируйте данную ситуацию с точки зрения:

- возможных механизмов антибиотикорезистентности у микроорганизмов и генетических аспектов явления «инфекционной резистентности» или «госпитальной инфекции»;
- возможных механизмов индукции β -лактамаз (PBP_s-2 и PBP_s-3) и их ингибирования;
- разрешения данной ситуации.

Эталон ответа. Причины появления изоферментов с р-лактамазной активностью в том, что микробная клетка защищает себя от антибиотика за счет мутаций в гене, кодирующем последовательность аминокислот в ферменте-мишени, т.е. в «структурном» гене. Происходит расщепление β -лактамного кольца, и антибиотик теряет свою активность. Особенно опасны плазмидные (внехромосомные) мутации. Плазмиды - генетические элементы микробной клетки, представляющие собой кольцевые молекулы ДНК размером в сотни раз меньшим, чем размер хромосомы. Опасность плазмидной резистентности в генетическом плане выражается в том, что плазмиды передаются из клетки в клетку путем конъюгации (аналог полового процесса), т.е. без деления клетки, однако плазида при этом реплицируется. Таким образом, одна клетка может очень быстро передать резистентность огромному количеству клеток. Этому активно способствует и то, что некоторые типы плазмид существуют в клетке в виде нескольких единиц, а иногда и десятков копий (многокопийны). Возник даже термин «инфекционная резистентность» - «заражение резистентностью» одних клеток от других. Особенно часто плазмидная локализация генов резистентности встречается при ферментативной инактивации антибиотиков. Иногда в одной плазмиде оказываются локализованы несколько генов, кодирующих ферменты, воздействующие на антибиотики разных групп. Отсюда возникло понятие полирезистентности микроорганизмов. Такие полирезистентные штаммы возбудителей инфекции представляют серьезную проблему в инфекционной клинике, вызывая так называемую госпитальную инфекцию, когда к тем антибиотикам, которые используют в инфекционной клинике на тот момент, возникает устойчивая резистентность возбудителей различных инфекционных заболеваний, и соответственно антибиотик теряет свою активность. На лечебных (терапевтических) свойствах р-

лактамных антибиотиков отражается степень сродства различных р-лактамов к разным транспептидазам, получившим название «пенициллинсвязывающие белки» (Penicillin bounding proteins): РВР-1, РВР-2, РВР-3 и т.д. В этом неодинаковом (различном) средстве заложен сам антибиотический эффект, его продолжительность, переносимость определенными категориями больных. Так, если в рекомендациях по применению присутствует информация о том, что новый антибиотик связывается с РВР-2, то это означает, что клетка микроорганизма будет активно лизироваться, и освобождающиеся полисахариды в большом количестве начнут поступать в кровь, вызывая у больного кратковременный пирогенный эффект. Такие антибиотики рекомендуют больным с невысоким уровнем иммунитета (например, больным СПИДом). Если есть информация о связывании с РВР-3, то это означает, что в результате действия такого антибиотика бактериальная клетка только перестает делиться, оставаясь живой, и при отмене антибиотика начинает свое деление с большей активностью и опасностью возникновения новой инфекции. Такие антибиотики можно рекомендовать только больным с сильным иммунитетом. Разрешение данной ситуации заключается в том, что информационные материалы по механизму действия антибиотика обязательно должны принимать во внимание лечащие врачи и фармацевты.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ИСХОДЯЩЕГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ:

1. Цефалоспорин четвертого поколения, устойчивый к бета-лактамазам грамположительных бактерий:

- а) цефазолин
- б) цефтриаксон
- в) цефепим
- г) цефпролекс

2. Пенициллиназа используется при:

- а) проверке заводских серий пенициллина на стерильность
- б) оценке эффективности пенициллиновых структур против резистентных бактерий
- в) получении полусинтетических пенициллинов
- г) снятии аллергических реакций на пенициллин

3. Свойство бета-лактамов, из-за которого их следует, согласно GMP, нарабатывать в отдельных помещениях:

- а) общая токсичность
- б) хроническая токсичность
- в) эмбриотоксичность
- г) аллергенность

4. Биосинтез антибиотиков, используемых как лекарственные вещества, усиливается и наступает раньше на средах:

- а) богатых источниками азота
- б) богатых источниками углерода
- в) богатых источниками фосфора
- г) бедных питательными веществами

5. С точки зрения биотехнологии антибиотики являются:

- а) первичными метаболитами

- б) аминокислотами
- в) ферментами
- г) вторичными метаболитами

6. Какая цель не преследуется при перемешивании среды в реакторе:

- А) удаление с поверхности клеток продуктов обмена и лизиса клеток
- Б) распыление воздуха, выходящего из барботера
- В) равномерное распределение питательных веществ
- Г) отделение культуральной среды от продуцента

7. При биосинтезе какого антибиотика необходим источник хлора:

- А) ампициллина
- Б) стрептомицина
- В) левомицетина
- Г) грамицидина С.

8. Токсичность плохо очищенных препаратов стрептомицина связана:

- А) с наличием в препаратах гистаминоподобных веществ
- Б) с образованием токсичных веществ из стрептомицина
- В) с повышенной скоростью проникновения стрептомицина в ткани организма
- Г) с пониженной скоростью проникновения стрептомицина в ткани организма и, таким образом, повышенным его содержанием в крови.

Номер теста	1	2	3	4	5	6	7	8
Правильный вариант ответа	В	В	Г	Г	Г	А	Г	А

ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАНЯТИЮ ПРЕПОДАВАТЕЛЯМ:

Основная:

1. Биотехнология. Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева – М.: «Академия», 2007. – С. 85-101, 182-191, 204-218.
2. Фармацевтическая биотехнология: Учебное пособие для студентов высших уч. заведений Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л., Михалева Л.К., Белова Л.С. Ростов-на-Дону Феникс Томск Издательство НТЛ Сибирский Государственный медицинский Университет, 2006. – 251 с.
3. Фармацевтическая биотехнология: рук. к практ. занятиям: учеб. пособие / С.Н. Орехов ; под ред. В.А. Быкова, А.В. Катлинского. – м.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – С. 123-142.
4. Фармацевтическая биотехнология: руководство к практическим занятиям: учеб. пособие / 2-е изд., перераб. и доп. С.Н. Орехов М.: ГЭОТАР- Медиа, 2015. – 432 с.

Дополнительная:

5. Терминологический словарь по биотехнологии
6. Биология: учеб. пособие / Г.Г. Чебышев ; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 416 с.

7. Микробиология, вирусология и иммунология: рук. к лаб. занятиям: учеб. пособие / В.С. Сбойчакова; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 320 с.

8. Микробиология: учебник для студентов фармацевтических ВУЗов / А.А. Воробьев и др.; – М.: «Медицина», 2003. – 336 с.

Занятие № 13.

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: «Антибиотики: частная технология антибиотиков».

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: студенты должны изучить частную биотехнологию антибиотиков: пенициллинов, стрептомицинов и др. ЛП, номенклатуру антибиотиков.

ЗНАЧИМОСТЬ: частная биотехнология антибиотиков является тонким аспектом фармацевтической биотехнологии. Это очень сложный многогранный процесс, имеющий большое количество экзогенных и эндогенных факторов, влияющих на процесс получения и качество антибиотиков. Будущий специалист должен хорошо ориентироваться и проводить сравнительный анализ различных методов получения антибиотиков разных групп.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЗАНЯТИЯ (в академических часах) – 4.

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ: 527 аудитория, 2 корпус.

ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ И БЮДЖЕТ УЧЕБНОГО ВРЕМЕНИ:

1. Организационный момент 5 мин.
2. Тестовый контроль входного уровня знания 15 мин.
3. Опрос, дискуссия, разбор ситуационной задачи на занятии 65 мин.
4. Перерыв 10 мин.
5. Опрос, дискуссия, самостоятельное решение ситуационной задачи 65 мин.
6. Тестовый контроль исходного уровня знания 15 мин.
7. Подведение итогов занятия, задание к следующему занятию 5 мин.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЗАНЯТИЯ:

Контрольные вопросы:

1. Антибиотикорезистентность.
2. Пути борьбы с антибиотикорезистентностью.

3. Поиск новых природных а/б.
4. Биотехнология антибиотиков.
5. Частная технология а/б: пенициллины и цефалоспорины.

ТТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ВХОДНОГО УКОНРОЛЯ ЗНАНИЙ.

Выберите правильные ответы.

В производстве а/б при культивировании микроорганизмов используется:

- А) поверхностное культивирование
- Б) глубинное культивирование

2. В производстве а/б при культивировании микроорганизмов используются питательные среды:

- А) твердые
- Б) жидкие
- В) газообразные

3. Какая цель не преследуется при перемешивании среды в реакторе:

- А) удаление с поверхности клеток продуктов обмена и лизиса клеток
- Б) распыление воздуха, выходящего из барботера
- В) равномерное распределение питательных веществ
- Г) отделение культуральной среды от продуцента

4. При биосинтезе какого антибиотика необходим источник хлора:

- А) ампициллина
- Б) стрептомицина
- В) левомицетина
- Г) грамицидина С.

5. Токсичность плохо очищенных препаратов стрептомицина связана:

- А) с наличием в препаратах гистаминоподобных веществ
- Б) с образованием токсичных веществ из стрептомицина
- В) с повышенной скоростью проникновения стрептомицина в ткани организма
- Г) с пониженной скоростью проникновения стрептомицина в ткани организма и, таким образом, повышенным его содержанием в крови.

6. От собственного антибиотика продуценты аминогликозидов защищаются с помощью:

- а) низкого сродства рибосом
- б) временная ферментативная инактивация
- в) компартментация
- г) утолщение клеточной стенки

7. Что такое активное выделение антибиотика из бактериальной клетки – это:

- а) экранирование рибосомы
- б) эффлюкс
- в) снижение проницаемости внешних клеточных структур
- г) ремиссия

8. Местами естественного обитания продуцентов антибиотиков:

- а) почва
- б) воздух
- в) деревья

г) проточная вода

9. Плесневые грибы как продуценты антибиотиков:

- а) одноклеточные эукариоты
- б) многоклеточные эукариоты
- в) одноклеточные прокариоты
- г) многоклеточные прокариоты

10. Клеточная стенка актиномицетов состоит из:

- а) хитина
- б) пептидогликана
- в) липоолисахаридов
- г) липопротеинов

11. Актиномицеты продуцируют:

- а) стрептомицины
- б) витамины
- в) аминокислоты
- г) ферменты

12. Оптимальная температура для синтеза антибиотиков:

- а) выше 30° С
- б) 24-29° С
- в) 15-18° С
- г) 18-22° С

13. Интенсивному биосинтезу антибиотиков способствует:

- а) уменьшение в питательной среде источников углерода
- б) увеличение в питательной среде источников азота
- в) увеличение в питательной среде глюкозы
- г) увеличение в питательной среде источников фосфора

14. Побочные эффекты антибиотикотерапии:

- а) дисбактериоз
- б) ОРВИ
- в) переломы
- г) авитаминоз

15. Мишень для антибактериальных веществ в микробной клетке иначе называют:

- а) таргет
- б) промотор
- в) сайт
- г) экзон

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5
Правильный вариант ответа	А Б	Б	А	Г	А
	6	7	8	9	10
	Б	Б	А	Б	Б
	11	12	13	14	15
	А	Б	А	А	А

Разбор ситуационной задачи на занятии.

В процессе биосинтеза антибиотика из группы аминогликозидов при культивировании продуцента состав питательной среды включал соевую муку, кукурузный экстракт, повышающий эффективность ферментации и соли. Подача газового потока, источники фосфатов и азота соответствовали требованиям. При добавлении в среду некоторого количества глюкозы биосинтез был ослаблен.

1. В результате чего добавление в среду глюкозы снизило эффективность биосинтеза антибиотика? Какое название носит данный эффект, его сущность?
2. Какие общие закономерности необходимо учитывать при культивировании большинства продуцентов вторичных метаболитов?
3. Какие углеводороды наиболее благоприятны для биосинтеза антибиотиков?

Самостоятельная работа. Решение ситуационной задачи.

Задача 1. Определите лекарственную субстанцию по описанию технологического процесса, назовите продуцент и метод его совершенствования, методы выделения и очистки, способ сушки лекарственной субстанции:

«...родуцент *Bacillus polymyxa* обработан многократно рентгеновскими и ультрафиолетовыми лучами, а также азотсодержащими веществами с селекцией на каждом этапе. Сверхпродуцент помещен в ферментатор на жидкую питательную среду, содержащую крахмал, соевую муку, кукурузный экстракт, минеральные соли. После завершения процесса культивирования целевой продукт извлечен из культуральной жидкости и очищен методом ионообменной хроматографии. Целевой продукт высушен распылительной сушкой. Выпускается в таблетках по 500 000 ЕД..»

1. Для чего стремятся получить сверхпродуцент?
2. Их свойства, особенности хранения.
3. Необходимо ли учитывать требования GMP при биосинтезе антибиотиков?

Ответ к задаче 2. Полимиксин В — антибиотик пептидной структуры для терапии грамм (-) инфекции, преимущественно, с поражением ЖКТ.

Продуцент и метод его совершенствования: почвенная споровая бактерия *Bacillus polymyxa* обработан многократно рентгеновскими и ультрафиолетовыми лучами, а также азотсодержащими веществами с селекцией на каждом этапе, получен сверхпродуцент.

Методы выделения и очистки: Сверхпродуцент помещен в ферментатор на жидкую питательную среду, содержащую крахмал, соевую муку, кукурузный экстракт, минеральные соли. После завершения процесса культивирования целевой продукт извлечен из культуральной жидкости и очищен методом ионообменной хроматографии.

Способ сушки лекарственной субстанции: Целевой продукт высушен распылительной сушкой.

1. Для чего стремятся получить сверхпродуцент? Штаммы продуцентов антибиотиков, полученные в результате скрининга и совершенствованные методом индуцированного мутагенеза или слиянием протопластов, приобретают способность синтезировать метаболит в огромном количестве. Такие промышленные мутантные штаммы носят название «суперпродуценты» или «сверхпродуценты». Экономически более выгодно использовать его по сравнению с продуцентом.
2. Свойства сверхпродуцентов: нестабильность высокой продуктивности и сложный цикл развития.

Особенности хранения сверхпродуцентов: Сверхпродуценты антибиотиков, созданные любым из описанных выше методов, требуют особых условий хранения и периодической проверки активности в связи с тем, что свойство образовывать избыточные количества антибиотика достаточно нестойко и легко утрачивается полностью или частично.

3. Необходимо ли учитывать требования GMP при биосинтезе антибиотиков? - да.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ИСХОДЯЩЕГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ.

Выберите правильные ответы:

1. Антибиотики являются:

- А – первичными метаболитами;
- Б – вторичными метаболитами.

2. Биологическая роль антибиотиков:

- А – они необходимы для деления клеток;
- Б – это одна из форм микробного антагонизма;
- В – являются кофакторами ферментов, принимающих участие в синтезе клеточной мембраны;
- Г – являются кофакторами ферментов, принимающих участие в формировании клеточной стенки.

3. Цель стадии предварительной обработки культуральной жидкости в производстве антибиотиков:

- А – освободить культуральную жидкость от кислорода;
- Б – освободить культуральную жидкость от продуцента;
- В – освободить культуральную жидкость от окислителей;
- Г – освободить культуральную жидкость от азотистых соединений.

4. Процессы, характерные для стадии трофофазы биосинтеза антибиотиков:

- А- интенсивное накопление биомассы продуцента;
- Б – интенсивное поглощение кислорода;
- В – снижение уровня pH;
- Г – интенсивное образование антибиотика.

5. При биосинтезе какого антибиотика необходим источник хлора:

- А – ампициллина;
- Б – стрептомицина;
- В – левомицитина;
- Г – грамицидина С.

6. При использовании в качестве источника азота аммония сульфата в присутствии ионов кальция субстрат будет:

- А – подщелачиваться;
- Б – подкисляться;
- В – среда остается нейтральной.

7. Антибиотик, к которому медленно развивается у микроорганизмов вторичная резистентность:

- А – эритромицин;
- Б – стрептомицин;
- В – хлорамфеникол;
- Г – канамицин.

- 8. В производстве антибиотиков при культивировании микроорганизмов используются:**
А – поверхностное культивирование;
Б – глубинное культивирование.
- 9. В производстве антибиотиков при культивировании микроорганизмов используются питательные среды:**
А – твердые;
Б – жидкие;
В – мягкие;
Г – газообразные.
- 10. Микроорганизмы, которые НЕ используются в процессе биосинтеза антибиотиков:**
А – вирусы;
Б – бактерии;
В – актиномицеты;
Г – грибы.
- 11. Широкое применение для промышленного выделения и очистки антибиотиков находит:**
А – хроматография в тонких слоях;
Б – ионообменная хроматография;
В – высокоэффективная жидкостная хроматография;
Г – бумажная хроматография.
- 12. Требование, неприемлемое для кормовых антибиотиков:**
А – не должны всасываться из желудочно-кишечного тракта;
Б – не должны загрязнять продукты животного происхождения;
В – должны использоваться в медицине;
Г – не должны обладать способностью образовывать у микроорганизмов множественную резистентность.
- 13. Грамицидин С из культуральной жидкости осаждают:**
А – кислотой хлороводородной;
Б – сернокислым аммонием;
В – этанолом.
- 14. При промышленном производстве стрептомицина используются штаммы, хорошо развивающиеся на средах:**
А – кукурузных;
Б – гороховых;
В – хлопковых;
Г – соевых.
- 15. Токсичность плохо очищенных препаратов стрептомицина связана:**
А – с наличием в препаратах гистаминоподобных веществ;
Б – с образованием токсичных веществ из стрептомицина;
В – с повышенной скоростью проникновения стрептомицина в ткани организма;
Г – с пониженной скоростью проникновения стрептомицина в ткани организма и, таким образом, повышенным его содержанием в крови.

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5
Правильный вариант ответа	Б	Б	Б	А	Г
	6	7	8	9	10
	Б	Б	Б	Б	В
	11	12	13	14	15
	БВ	Г	А	Г	А

ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАНЯТИЮ ПРЕПОДАВАТЕЛЯМ:

Основная:

1. Биотехнология. Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева – М.: «Академия», 2007. – С. 85-101, 182-191, 204-218.
2. Фармацевтическая биотехнология: Учебное пособие для студентов высших уч. заведений Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л., Михалева Л.К., Белова Л.С. Ростов-на-Дону Феникс Томск Издательство НТЛ Сибирский Государственный медицинский Университет, 2006. – 251 с.
3. Фармацевтическая биотехнология: рук. к практ. занятиям: учеб. пособие / С.Н. Орехов ; под ред. В.А. Быкова, А.В. Катлинского. – м.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – С. 123-142.
4. Фармацевтическая биотехнология: руководство к практическим занятиям: учеб. пособие /. 2-е изд., перераб. и доп. С.Н. Орехов М.: ГЭОТАР- Медиа, 2015. – 432 с.

Дополнительная:

5. Терминологический словарь по биотехнологии
6. Биология: учеб. пособие / Г.Г. Чебышев ; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 416 с.
7. Микробиология, вирусология и иммунология: рук. к лаб. занятиям: учеб. пособие / В.С. Сбойчакова; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 320 с.
8. Микробиология: учебник для студентов фармацевтических ВУЗов / А.А. Воробьев и др.; – М.: «Медицина», 2003. – 336 с.

Занятие № 14.

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: «Ферменты. Имобилизованные ферменты».

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: студенты должны изучить ферменты, биотехнологические методы их получения, иммобилизация ферментов, номенклатуру ферментных ЛС.

ЗНАЧИМОСТЬ: биотехнология с момента зарождения основана на ферментных процессах. В настоящее время ферментные препараты широко используются для лечения и профилактики различных патологий. Будущий провизор должен знать данные ЛС, их получение и сравнительную характеристику.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЗАНЯТИЯ (в академических часах) – 4.

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ: 527 аудитория, 2 корпус.

ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ И БЮДЖЕТ УЧЕБНОГО ВРЕМЕНИ:

1. Организационный момент 5 мин.
2. Тестовый контроль входного уровня знания 15 мин.
3. Опрос, дискуссия, разбор ситуационной задачи на занятии 65 мин.
4. Перерыв 10 мин.
5. Опрос, дискуссия, самостоятельное решение ситуационной задачи 65 мин.
6. Тестовый контроль исходного уровня знания 15 мин.
7. Подведение итогов занятия, задание к следующему занятию 5 мин.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЗАНЯТИЯ:

Контрольные вопросы:

1. Общее понятие о ферментах.
2. Общая технологическая схема получения ферментов биотехнологическим методом. Промышленное получение ферментов.

3. Основные направления медицинской энзимологии. Классификация энзимов. Что характерно для ферментативной реакции?
4. В чем заключаются особенности культивирования продуцентов ферментов? Какие среды и какого состава могут быть использованы для этого процесса?
5. Как осуществляется процесс выделения и очистки ферментов, получаемых биотехнологическим методом? Как осуществляется процесс фильтрации? Как осуществляется процесс дезинтеграции биомассы? Какие хроматографические методы применяются для фракционирования? Особенности аффинной хроматографии.
6. Что такое иммобилизация? Какие методы иммобилизации ферментов вы знаете? Какие материалы используются для адсорбции ферментов? В чем заключается этот метод иммобилизации ферментов? Как осуществляется метод иммобилизации ферментов с помощью ковалентных связей? Каковы особенности данного метода? В чем заключается металлохелатный метод иммобилизации и метод включения ферментов в гель?
7. Использование микрокапсул и липосом для получения ферментных препаратов.
8. Иммобилизованные растительные клетки.
9. Номенклатура некоторых ферментных ЛП.
10. Опишите технологию получения террилитина и стрептокиназы.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ВХОДНОГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ.

1. Регулирует процесс пищеварения:

- А α -амилаза
- Б ораза
- В стрептодеказа

2. Верно ли утверждение: «Полиакриламидный гель не обладает ионно-обменными свойствами, поэтому при иммобилизации рН - профиль активности фермента не изменяется»:

- А Верно
- Б Неверно

3. В процессе выделения из культуральной среды ферментов и их очистки не используется:

- А экстракция
- Б сорбционные процессы
- В осаждение (высаливание)
- Г перегонка с водяным паром

4. Фермент лигаза, используемый в генетической инженерии:

- А скрепляет вектор с оболочкой клетки хозяина
- Б катализирует включение вектора в хромосому клеток хозяина
- В катализирует ковалентное связывание углеводно – фосфорной цепи ДНК – гена с ДНК – вектора
- Г катализирует замыкание пептидных мостиков в пептидогликане клеточной стенки

5. Целями иммобилизации ферментов в биотехнологическом производстве являются:

- А повышение удельной активности
- Б повышение стабильности
- В расширение субстратного спектра
- Г многократное использование

6. Противоопухолевым ферментным препаратом является:

- а) аспарагиназа
- б) стептокиназа
- в) пенициллиназа
- г) урокиназа

7. Лактоза под действием лактазы расщепляется с образованием:

- а) глюкозы и фруктозы
- б) глюкозы и галактозы
- в) двух молекул сахарозы
- г) двух молекул фруктозы

8. Фермент лактаза относится к классу:

- а) липаз
- б) трансфераз
- в) изомераз
- г) гидролаз

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5	6	7	8
Правильный вариант ответа	А	А	Б В	В	Б	А	Б	Г

РАЗБОР СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ НА ЗАНЯТИИ.

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

Проанализируйте ситуацию с обоснованием:

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

Эталон ответа. Сравнительно недавно (несколько десятков лет назад) четко определились пути преодоления вышеуказанных трудностей. Эти пути связаны с получением иммобилизованных ферментов из клеток микроорганизмов. Сама иммобилизация представляет собой физическое разделение биообъекта (клетка, фермент) и растворителя, т.е. биообъект закреплен на нерастворимом носителе, а субстрат и продукты метаболизма свободно обмениваются между биообъектом и растворителем. Биообъект в этом случае работает многократно (недели, месяцы).

Иными словами, иммобилизация ферментов - это перевод их в нерастворимое состояние с частичным или полным сохранением каталитической активности.

При совершенствовании биотехнологического процесса обычно используют следующие методы иммобилизации ферментов:

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

В результате иммобилизации ферменты получают преимущества гетерогенных катализаторов: их можно удалять из реакционной смеси и отделять от субстрата и продуктов ферментативной реакции простой фильтрацией. Кроме того, появляется возможность перевода многих периодических ферментативных процессов на непрерывный режим с использованием проточных аппаратов или колонн с иммобилизованными ферментами. Что касается широко используемой иммобилизации целых клеток, то ее проводят аналогично, предотвращая размножение клеток, увеличивая их сохранность и срок работы в качестве катализатора. Примеры носителей органической природы: желатин, фибрин, альгинат натрия, целлюлоза, ПААГ. Неорганические: термический песок, активированный уголь, окись алюминия, бентонит. Носитель не должен быть токсичным для биообъекта. Ограничения использования иммобилизации возможны в 2 случаях: если целевой продукт не выходит в среду и, если у фермента есть прочно с ним связанный кофермент, без которого этот фермент не работает. Каждый из методов иммобилизации имеет свои ограничения, связанные с недостаточной прочностью получаемых связей. Особенно это касается микрокапсулирования (инкапсулирования). Ячейки геля не должны быть слишком маленькими (иначе возникнут трудности контакта фермента с субстратом и недостаточная аэрация). Однако и слишком большого размера ячейки геля быть не должны. В этом случае связь с гелем образуется слабая, и биообъект может вымываться. Функции биообъекта связаны с технологической операцией определенным образом. Так, например, очищенный фермент, фермент в клетке с коферментом, фермент в пермеабелизированной клетке выполняют только отдельную реакцию: одноступенчатую трансформацию. Интактная клетка (клетка-производитель) осуществляет полный биосинтез целевого продукта посредством цепочки реакций. Система, открытая для усложнения, - это клетка-производитель какого-либо предшественника целевого продукта + первый фермент + второй фермент + третий фермент и т.д., т.е. биосинтез предпродукта и его биотрансформация осуществляются в одном биореакторе. Таким путем можно, в частности, одновременно получать 6-АПК, ампициллин и т.д.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА. РЕШЕНИЕ СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ.

Задача. Какие два основных метода иммобилизации ферментов Вы знаете? Какие два основных способа для иммобилизации ферментов в геле вам известны? В чем заключается принцип иммобилизации ферментов с использованием мембран? Микрокапсулирование. Включение в волокна и включение в липосомы. Метод иммобилизации ферментов с использованием систем двухфазного типа. Методы химической иммобилизации, отличия от физической иммобилизации.

Эталон ответа. Для иммобилизации ферментов в геле существует два основных способа. При одном из них фермент помещают в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате чего образуется полимерный гель с включенными в него

молекулами фермента. В реакционную смесь часто добавляют также бифункциональные (содержащие в молекуле две двойные связи) сшивающие агенты, которые придают образуемому полимеру структуру трехмерной сетки. В другом случае фермент вносят в раствор готового полимера, который затем каким-либо образом переводят в гелеобразное состояние. Способ иммобилизации ферментов путем включения в полимерный гель позволяет создавать препараты любой геометрической конфигурации, обеспечивая при этом равномерное распределение биокатализатора в объеме носителя. Метод универсален, применим для иммобилизации практически любых ферментов, полиферментных систем, клеточных фрагментов и клеток. Фермент, включенный в гель, стабилен, надежно защищен от инактивации вследствие бактериального заражения, так как крупные клетки бактерий не могут проникнуть в мелкопористую полимерную матрицу. В то же время, эта матрица может создавать значительные препятствия для диффузии субстрата к ферменту, снижая каталитическую эффективность иммобилизованного препарата, поэтому для высокомолекулярных субстратов данный метод иммобилизации не применим вообще. Общий принцип иммобилизации ферментов с использованием мембран заключается в том, что водный раствор фермента отделяется от водного раствора субстрата полупроницаемой перегородкой. Полупроницаемая мембрана легко пропускает небольшие молекулы субстрата, но непреодолима для крупных молекул фермента. Существующие модификации этого метода различаются лишь способами получения полупроницаемой мембраны и ее природой. Водный раствор фермента можно включать внутрь микрокапсул, представляющих собой замкнутые сферические пузырьки с тонкой полимерной стенкой (микрокапсулирование). При двойном эмульгировании получается водная эмульсия из капель органического раствора полимера, содержащих, в свою очередь, еще более мелкие капли водного раствора фермента. Через некоторое время растворитель затвердевает, образуя сферические полимерные частицы с иммобилизованным в них ферментом. Если вместо водонерастворимого отвердевающего полимера используются жидкие углеводороды с высокой молекулярной массой, метод называется иммобилизацией путем включения в жидкие мембраны. К модификациям метода иммобилизации ферментов с использованием полупроницаемых оболочек относятся также включение в волокна (при этом вместо капель, содержащих ферменты, получают нити) и включение в липосомы. Применение систем мембранного типа позволяет получать иммобилизованные препараты с высоким содержанием фермента. Благодаря высокому отношению поверхности к объему и малой толщине мембраны удается избежать значительных диффузионных ограничений скорости ферментативных реакций. Основным недостатком мембранных систем - невозможность ферментативного превращения высокомолекулярных субстратов.

При иммобилизации ферментов с использованием систем двухфазного типа ограничение свободы перемещения фермента в объеме системы достигается благодаря его способности растворяться только в одной из фаз. Природа фаз подбирается таким образом, что продукт накапливается в той из них, где фермент отсутствует. После завершения реакции эту фазу отделяют и извлекают из нее продукт, а фазу, содержащую фермент, вновь используют для проведения очередного процесса. Одним из важнейших преимуществ систем двухфазного типа является то, что они позволяют осуществлять ферментативные превращения макромолекулярных субстратов, которые невозможны при применении жестких носителей с ограниченным размером пор.

Главным отличительным признаком химических методов иммобилизации является то, что путем химического взаимодействия на структуру фермента в его молекуле создаются новые ковалентные связи, в частности между белком и носителем. Препараты иммобилизованных ферментов, полученные с применением химических методов, обладают по крайней мере двумя важными достоинствами. Во-первых, ковалентная связь фермента с носителем обеспечивает высокую прочность образующегося конъюгата. При широком варьировании таких условий, как pH и температура, фермент не десорбируется с носителя и не загрязняет целевых продуктов катализируемой им реакции. Это особенно важно при реализации процессов медицинского и пищевого назначения, а также для обеспечения устойчивых, воспроизводимых результатов в аналитических системах. Во-вторых, химическая модификация ферментов способна приводить к существенным изменениям их свойств, таких как субстратная специфичность, каталитическая активность и стабильность. При химической модификации фермента его активный центр желательно защищать. При сопоставлении различных приемов иммобилизации химические методы для крупномасштабных биотехнологических процессов кажутся малопривлекательными из-за сложности и дороговизны, поэтому в промышленных процессах обычно используются методы физической иммобилизации.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ИСХОДЯЩЕГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ.

1. Фермент амилазу для производственных процессов получают из культуры:

- а) *Aspergillus niger*
- б) *Bacillus subtilis*
- в) *Bacillus coagulans*
- г) *Arthrobacter simplex*

2. Фермент амилоглюкозидазу, осуществляющий гидролиз олигосахаридов до глюкозы, для производственных процессов получают из культуры:

- а) *Aspergillus niger*
- б) *Bacillus subtilis*
- в) *Bacillus coagulans*
- г) *Arthrobacter simplex*

3. Мультиферментный комплекс – это:

- а) комплекс ферментных белков, выделяемый из клетки путем экстракции и осаждения
- б) комплекс ферментов клеточной мембраны
- в) комплекс экзо- и эндопротеаз
- г) комплекс ферментов, катализирующих синтез первичного или вторичного метаболита

4. Лизоимадаза применяется для:

- а) улучшения процесса пищеварения
- б) очистки ран от гнойно-некротических масс
- в) лечения тромбозов
- г) снятия анафилактического шока

5. Методы иммобилизации:

- а) внутриклеточные
- б) физико-химические
- в) ферментативные
- г) химические

6. Препараты протеолитических ферментов:

- а) террилитин
- б) солизим
- в) стрептолиаза
- г) аспарагиназа

7. Пенициллинназа применяется с целью:

- а) лечения лейкемии
- б) лизиса некротических масс в ткани
- в) снятия анафилактического шока
- г) лечения гиперурикемии

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5	6	7
Правильный вариант ответа	Б	А	Г	Б	Г	А	В

Занятие № 15.

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: «Препараты нормофлоры. Производство пробиотиков»

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: студенты должны изучить биотехнологию препаратов нормофлоры, пробиотиков, пребиотиков, их номенклатуру, а также изучить биотехнологические методы получения ЛС из растений.

ЗНАЧИМОСТЬ: большое количество препаратов нормофлоры получают биотехнологическими методами. На сегодняшний день данные технологии являются перспективными и экономичными, в связи с чем будущий провизор должен знать биотехнологический процесс получения данных препаратов.

ЛС, полученные на основе каллусных и суспензионных культур растительных клеток, широко используются в клинической практике. Знание биотехнологии ЛС растительного происхождения необходимы будущему специалисту для аргументированного способа их получения, а также для участия в получении высококачественного готового продукта.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЗАНЯТИЯ (в академических часах) – 4.

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ: 527 аудитория, 2 корпус.

ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ И БЮДЖЕТ УЧЕБНОГО ВРЕМЕНИ:

1. Организационный момент 5 мин.
2. Тестовый контроль входного уровня знания 15 мин.
3. Опрос, дискуссия, разбор ситуационной задачи на занятии 65 мин.
4. Перерыв 10 мин.
5. Опрос, дискуссия, самостоятельное решение ситуационной задачи 65 мин.
6. Тестовый контроль исходного уровня знания 15 мин.
7. Подведение итогов занятия, задание к следующему занятию 5 мин.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЗАНЯТИЯ:

Контрольные вопросы:

1. Понятия: пробиотики. симбиоз, симбионты.
2. Содержание микрофлоры кишечника человека.
3. Лакто- и бифидобактерии.
4. Дисбактериоз. Причины возникновения, профилактика и лечение.
5. Производство препаратов нормофлоры.
6. Частная технология препаратов нормофлоры.
7. Номенклатура препаратов нормофлоры: бактисубтил, бифидумбактерин в порошке, бификол сухой, бифилиз, бифилонг сухой, биовестин, лактобактерин в порошке, аципол сухой, линекс, колибактерин сухой, споробактерин сухой, энтерол 250, концентрат «Наринэ», пребиотики.
8. Культура изолированных клеток, тканей и органов растений.
9. Особенности культивирования изолированных клеток и тканей растений.
10. Методы культивирования изолированных клеток и тканей.
11. Культура растительных клеток как источник ЛВ.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ВХОДЯЩЕГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ.

1. Пребиотики это:

- а) живые ослабленные штаммы нормальной микрофлоры кишечника
- б) это пищевые вещества, которые питают полезные микроорганизмы и способствуют их развитию
- в) комплекс живых микроорганизмов разных видов и вещества, стимулирующие их колонизирующую способность и размножение

2. К поликомпонентным пробиотикам относятся:

- А) бифидумбактерин
- Б) бифилак
- В) бифиформ

3. Микроорганизмы, используемые для создания эубиотиков, должны обладать:

- А) устойчивостью к антибиотикам
- Б) антагонистической активностью
- В) адгезивными свойствами
- Г) достаточной скоростью роста

4. К препаратам пробиотиков, не содержащих лактобактерии, относят:

- а) гастрофарм
- б) бифилиз
- в) линекс
- г) лактобактерин сухой

5. Рост одного микроорганизма подавляется в присутствии другого – это:

- а) нейтрализм
- б) аменсализм
- в) комменсализм
- г) симбиоз

Эталон ответа: б

6. Механизмы мутуализма:

- а) обмен питательными веществами
- б) синтез токсических веществ
- в) поглощение незаменимых питательных веществ
- г) секреция ферментов, разрушающих полимеры клеточной стенки

7. Состояние системы, когда ни один из организмов не оказывает влияния на скорость роста другого микроорганизма, называется:

- а) нейтрализм
- б) мутуализм
- в) комменсализм
- г) аменсализм

8. Bacillus входит в состав препарата:

- а) Флонивин БС
- б) Нормофлор
- в) Энтерол
- г) Бификол

9. Симбиотики это:

- а) живые ослабленные штаммы нормальной микрофлоры кишечника
- б) это пищевые вещества, которые питают полезные микроорганизмы и способствуют их развитию
- в) комплекс живых микроорганизмов разных видов и вещества, стимулирующие их колонизирующую способность и размножение

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5
Правильный вариант ответа	Б	Б,В	А,Б,В	Б	Б
	б	7	8	9	
	А	А	А	В	

РАЗБОР СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ НА ЗАНЯТИИ.

Задача 1. Предложите посетителю аптеки лекарственные препараты на основе пробиотиков и пребиотиков, прием которых можно совмещать с приемом пероральных препаратов антибиотиков.

Эталон ответа. При любой антибактериальной терапии должны проводиться мероприятия по защите нормальной кишечной микрофлоры с использованием пробиотиков, устойчивых к антимикробным агентам (лактосодержащие препараты: линекс, лактобактерин, препараты транзитной микрофлоры: бактисубтил, препараты метаболизма: хилак-форте).

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА. РЕШЕНИЕ СИТУАЦИОННЫХ ЗАДАЧ.

Задача 1. Факторы, вызывающие нарушения ЖКТ. Представители резидентной микрофлоры ЖКТ человека. Кто преобладает? Принципы пробиотикотерапии. Опеределение. Что представляет препарат Хилак-форте? Является ли он пробиотиком?

Эталон ответа. Возникновению дисбактериоза способствуют: применение антибиотиков; применение консервантов в пищевых продуктах; особенности питания человека (употребление рафинированной пищи, много углеводов, недостаток белков и клетчатки),

несоответствие количества потребляемой пищи уровню энергетических затрат; кишечные инфекции; различные ферментопатии с врожденными или приобретенными дефектами слизистой оболочки кишечника; хронические заболевания и нарушения функций ЖКТ; нарушения иммунного статуса; нарушения экологии и радиация; физические и психические стрессы.

2. Бифидобактерии, лактобактерии, бактероиды, непатогенная кишечная палочка, энтерококки. Преобладают бифидобактерии.

3. Принципы пробиотикотерапии. Пробиотикотерапия - применение препаратов пробиотиков с целью восстановления нормобиоценоза. При терапии дисбактериоза необходимо учитывать причины и степень развития синдрома, выраженность клинических проявлений, состав высеваемой микрофлоры. Бифидопрепаратам уделяется важная роль в лечении дисбактериоза. Целесообразно сочетание в препаратах пробиотиков нескольких видов и штаммов бактерий, введение компонентов, повышающих резистентность макроорганизма или оказывающих иммуномодулирующее действие (лизозим, иммуноглобулины, интерфероны). Пробиотикотерапия должна комплексно сочетаться с применением пребиотиков, ферментных препаратов, иммуномодулирующих лекарственных средств, энтеросорбентов, витаминов, рациональной фитотерапией, функциональным питанием.

Пробиотикотерапия необходима: для коррекции микробиоценоза у детей с первого года жизни, находящихся на искусственном вскармливании или принимающих антибактериальные препараты; при лечении вирусных и бактериальных инфекций респираторного тракта, бронхолегочной патологии, особенно с частыми рецидивами; с целью предупреждения дисбактериоза на фоне применения антибиотиков, гормональных и химиотерапевтических средств, лучевой терапии с пролонгированием курса лечения после отмены терапии; в комплексе профилактических мероприятий у лиц, пребывающих

длительное время в неблагоприятных климатических и экологических условиях, контактирующих в процессе производства с токсичными веществами и промышленными отходами.

4. Хилак-форте - стерильный концентрат продуктов метаболизма нормальных кишечных симбионтов, образующих молочную кислоту, а также ряд дополнительных компонентов. Препарат эффективен при одновременном приеме с антибактериальными средствами. Выпускается во флаконах по 30 и >100 мл, прием по 40-60 капель 3 раза в день. Является пребиотиком.

Задача 2. Технология производства препаратов бифидо- и лактобактерии аналогична технологии колибактерина. Различия относятся к составу питательных сред и условиям культивирования в соответствии с физиологическими особенностями бактерий.

- Какими преимуществами обладают бифидо- и лактобактерии для производства и применения в качестве лекарственных препаратов по сравнению с кишечной палочкой?
- Какие стадии присутствуют в технологическом процессе производства препаратов пробиотиков?
- По каким показателям проводят контроль готового лекарственного препарата *Bifidobacterium bifidum*?
- Какой способ производственного культивирования в биореакторе предпочтительнее

для накопления биомассы молочнокислых бактерий.

- По каким показателям осуществляют контроль лекарственного препарата «Лактобактерин»?

Ответ к задаче. Бифидо - и лактобактерии обладают рядом преимуществ по сравнению с кишечной палочкой: являются симбионтами макроорганизма с первых дней жизни; молочнокислые бактерии являются кислоторезистентными микроорганизмами, что обеспечивает их высокую выживаемость при пероральном приеме; лактобактерии устойчивы к антибиотикам, что позволяет применять их в курсе антибиотикотерапии.

Технологический процесс производства препаратов пробиотиков включает:

- восстановление клеток из состояния анабиоза путем многократных посевов на твердых питательных средах с оценкой антагонистической активности;
- культивирование клеток с целью получения биомассы;
- отделение клеток и концентрирование культуральной жидкости (проводится только при получении препаратов метаболитов пробиотиков)
- сублимационная сушка культуральной суспензии;
- оценка качества (контроль);
- получение готовых лекарственных форм.

Контроль готового лекарственного препарата *Bifidobacterium bifidum* проводят по следующим показателям:

- а. содержание живых микробных клеток, которых в дозе сухогубифидумбактерина должно быть не менее 10¹⁰ живых бифидобактерий;
- б. отсутствие посторонних микроорганизмов;
- в. антагонистическая активность по отношению к дизентерийным тест-штаммам Флекснера и Зонне.

Производственные штаммы молочнокислых бактерий (*Lactobacillus fermenti* и *Lactobacillus plantarum*) выращивают на питательных средах, приготовленных на основе гидролизата молока, накопление биомассы молочнокислых бактерий осуществляется глубинным методом с перемешиванием, но без аэрации, при температуре 37 С.

Контроль лекарственного препарата «Лактобактерин» осуществляют по следующим показателям:

- содержание живых лактобактерий;
- отсутствие посторонних микроорганизмов;
- остаточная влажность не более 4 %;
- антагонистическая активность в отношении возбудителей дизентерии, патогенных энтеробактерий и условно-патогенных микроорганизмов (гемолитического стафилококка и протей).

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ИСХОДЯЩЕГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ.

1. Микроорганизмы, с которыми человек встречается в течении жизни:

- А) транзиторные, не способные к длительному пребыванию в организме
- Б) приносящие несомненную пользу
- В) условно-патогенные
- Г) возбудители инфекционных заболеваний

2. К положительным функциям нормофлоры кишечника человека относится все, кроме:

- А) межмикробного антогонизма и активации иммунной системы
- Б) синтетической и детоксикационной
- В) обменной
- Г) концентрирования и задержки в организме ксенобиотиков

3. К причинам, вызывающим дисбактериоз, относятся:

- А) использование в рационе пищевых волокон
- Б) иммунные нарушения, соматические и инфекционные болезни
- В) нарушение питания и медикаментозное воздействие
- Г) использование в пищу молочнокислых микроорганизмов

4. Для препаратов нормофлоры общим является:

- А) способ изготовления
- Б) парентеральный способ введения
- В) условия производства
- Г) биологическая активность

5. Лиофильная сушка – это:

- А) сушка из замороженного состояния под вакуумом
- Б) сушка при атмосферном давлении
- В) сушка с помощью адсорбентов

6. Что не является БАДом:

- А) Бифидум – мульти 2
- Б) Нормоспектрум
- В) Нормофлорин-Л
- Г) Халак-форте

7. К иммобилизованным на сорбенте пробиотикам относят:

- А) кипацид
- Б) биофлор жидкий
- В) бифидумбактерин форте
- Г) бифилакт

8. Для производства лактобактерина применяют штамм:

- А) *Lactobacterium acidophilus*
- Б) *Lactobacillus plantarum*

Ответы на тестовые задания:

Номер теста	1	2	3	4	5
Правильный вариант ответа	Все верно	Б,Г	Б,В	В	А
	б	7	8		
	Г	В	Б		

ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАНЯТИЮ ПРЕПОДАВАТЕЛЯМ:

Основная:

1. Биотехнология. Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева – М.: «Академия», 2007. – С. 85-101, 182-191, 204-218.

2. Фармацевтическая биотехнология: Учебное пособие для студентов высших уч. заведений Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л., Михалева Л.К., Белова Л.С. Ростов-на-Дону Феникс Томск Издательство НТЛ Сибирский Государственный медицинский Университет, 2006. – 251 с.
 3. Фармацевтическая биотехнология: рук. к практ. занятиям: учеб. пособие / С.Н. Орехов ; под ред. В.А. Быкова, А.В. Катлинского. – м.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – С. 123-142.
 4. Фармацевтическая биотехнология: руководство к практическим занятиям: учеб. пособие / . 2-е изд., перераб. и доп. С.Н. Орехов М.: ГЭОТАР- Медиа, 2015. – 432 с.
- Дополнительная:
5. Терминологический словарь по биотехнологии
 6. Биология: учеб. пособие / Г.Г. Чебышев ; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 416 с.
 7. Микробиология, вирусология и иммунология: рук. к лаб. занятиям: учеб. пособие / В.С. Сбойчакова; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 320 с.
 8. Микробиология: учебник для студентов фармацевтических ВУЗов / А.А. Воробьев и др.; – М.: «Медицина», 2003. – 336 с.

Занятие № 16.

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: «Биопрепараты растительного происхождения»

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: студенты должны изучить биотехнологические методы получения ЛС из растений.

ЗНАЧИМОСТЬ: ЛС, полученные на основе каллусных и суспензионных культур растительных клеток, широко используются в клинической практике. Знание биотехнологии ЛС растительного происхождения необходимы будущему специалисту для аргументированного способа их получения, а также для участия в получении высококачественного готового продукта.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЗАНЯТИЯ (в академических часах) – 4.

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ: 527 аудитория, 2 корпус.

ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ И БЮДЖЕТ УЧЕБНОГО ВРЕМЕНИ:

1. Организационный момент 5 мин.
2. Тестовый контроль входного уровнязнания 15 мин.
3. Опрос, дискуссия, разбор ситуационной задачи на занятии 65 мин.
4. Перерыв 10 мин.
5. Опрос, дискуссия, самостоятельное решение ситуационной задачи 65 мин.
6. Тестовый контроль исходного уровнязнания 15 мин.
7. Подведение итогов занятия, задание к следующему занятию 5 мин.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЗАНЯТИЯ:

Контрольные вопросы:

1. Культура изолированных клеток, тканей и органов растений.
2. Особенности культивирования изолированных клеток и тканей растений.
3. Методы культивирования изолированных клеток и тканей.
4. Культура растительных клеток как источник ЛВ.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ВХОДЯЩЕГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ.

1. Индукторами реализации тотипотентности клеток и тканей растений являются:

- а) УФ-облучение
- б) витамины
- в) аминокислоты
- г) фитогормоны

2. Эксплант – это:

- а) изолированные из растений фрагменты ткани
- б) фрагменты каллуса для субкультивирования
- в) часть суспензионной культуры для субкультивирования
- г) культура, возникающая из одной клетки

3. Тип питания культуры тканей растений:

- а) ауксотрофный
- б) хемогетеротрофный
- в) фотоавтотрофный
- г) хемолитотрофный

4. Из культуры какой клетки выделяют шиконин:

- а) Воробейника краснокорневого
- б) Табака курительного
- в) Женьшеня
- г) Родиолы розовой

5. Из культуры какой клетки выделяют убихинон:

- а) Воробейника краснокорневого
- б) Табака курительного
- в) Женьшеня
- г) Родиолы розовой

6. Из культуры какой клетки выделяют синтез панаксозидов:

- а) Воробейника краснокорневого
- б) Табака курительного
- в) Женьшеня
- г) Родиолы розовой

Ответы на тестовые задания:

	1	2	3	4	5
	Г	А	Б	А	Б
	б				
	В				

РАЗБОР СИТУАЦИОННОЙ ЗАДАЧИ НА ЗАНЯТИИ.

Задача 1. Биотехнологические методы получения ЛС на основе культур клеток растений имеют широкое распространение, поскольку по сравнению с получением биомасс растительных культур из дикой природы или с плантаций эти методы отличаются высокой рентабельностью, экологичностью, независимостью от географии и климата произрастания того или иного растения, а также обеспечивают высокое качество целевого продукта, стабильность производства и возможность управления процессами (автоматизацию). Все вышеперечисленное указывает на высокую перспективность дальнейшего развития данных методов. Анализируя данную ситуацию:

- представьте технологии получения лекарственных препаратов растительного происхождения с конкретными примерами, обращая внимание на специфику растительных клеток, фазы роста, питательные среды, условия ферментации и типы биореакторов;
- сопоставьте стабильность процесса по выходу вторичных метаболитов с дифференцировкой клеток и со стадией культивирования (фазы роста клеток);
- предложите метод использования ферментов для превращения дигитоксина в дигоксин (последний менее токсичен и поэтому его применяют в качестве сердечного препарата - карденолида).

Эталон ответа. Метод биотехнологии получения ЛС на основе культур клеток растений начинается с процесса получения культуры каллусной ткани или каллуса. Каллус - ткань, возникающая при неорганизованной пролиферации клеток растения (дедифференцированное деление клеток). Метод реализует способность любой клетки образовывать полноценное растение в соответствии с ее генетическим и физиологическим потенциалом (естественными возможностями). Эта способность называется «тотипотентность». Стабильность по выходу целевого продукта (вторичных метаболитов) обычно связывают с дифференцировкой клеток и со стадией культивирования (конец экспоненциальной стадии с переходом на постоянную фазу роста и деления клеток). Примером влияния дифференцировки клеток на выход целевого продукта служит дифференцированный корневой каллус *Atropa belladonna*, синтезирующий тропановые алкалоиды (в отличие от недифференцированного). Другой пример: только недифференцированные клетки *Rauwolfia serpentina* синтезируют индолиловые алкалоиды. Технология получения каллуса требует наличия молодых и здоровых клеток, стерильности, определенной температуры (+24-26 °С) и влажности (65-70%), аэрации, соответствующего оборудования (специальные ферментеры). В питательную среду, помимо микро- и макроэлементов, источников углерода, витаминов, нужно вносить регуляторы роста растений - ауксины (индолилтриуксусная кислота и др.) и цитокинины (6-бензиламинопурины и др.). Также весьма существенную роль для синтеза метаболитов играют предшественники. Так, добавление фенилаланина увеличивает выход диосгенина на 100%. Накопление вторичных метаболитов зависит от того, на каких средах (жидких или твердых) проводят культивирование. Суспензионное культивирование осуществляют в аэрлифтных ферментерах без механической мешалки (с турбинным перемешиванием, с внешней циркуляционной петлей). Растительные клетки в отличие от клеток микроорганизмов имеют большие размеры, вакуоль, целлюлозную клеточную оболочку, клеточные агрегаты. Все это требует системы перемешивания восходящими потоками воздуха (встряхиванием без механических

повреждений). Как правило, для этого используют следующие режимы культивирования: периодический (чаще), циклический и непрерывный (нарастание биомассы коррелирует с синтезом вторичных метаболитов). Для повышения выхода продуктов вторичного метаболизма применяют иммобилизацию растительных клеток. Иногда конечный продукт биосинтеза необходимо частично преобразовать. В этом случае применяют биотрансформацию - метод, использующий ферменты клеток растения, способные менять функциональные группы добавленных извне химических соединений. Примером применения биотрансформации служит превращение дигитоксина в дигоксин в реакции 1, 2-гидроксилирования, катализируемой ферментом, продуцируемым недифференцированными клетками *Digitalis Lanata*.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА. РЕШЕНИЕ СИТУАЦИОННЫХ ЗАДАЧ.

Задача 1. Культуры клеток и тканей для массового размножения растений и оздоровления посадочного материала, в том числе лекарственных растений, нашли широкое применение в растениеводстве.

1. С какой целью при выращивании каллусной ткани проводят пассирование или субкультивирование?
2. Понятие и сущность дифференциации меристематической клетки.
3. Может ли у растений процесс дифференциации быть обратимым, при каких условиях

Эталон ответа. 1. В цикле выращивания каллусной ткани клетки после ряда делений приступают к росту растяжением, дифференцируются как зрелая каллусная ткань и деградируют. Для того, чтобы не произошло старения, утраты способности к делению и дальнейшему росту, а также отмирания каллусных клеток, первичный каллус переносят на свежую питательную среду через 28 -30 дней, то есть проводят пассирование или субкультивирование каллусной ткани.

2. Возникновение физиологических и структурных различий между клетками и тканями растений, связанное с их функциональной специализацией, называют процессом дифференциации. Понятие «дифференциация» отражает превращение эмбриональной, меристематической клетки в специализированную. Меристематические клетки, однотипные по структуре и функции, начинают развиваться различными путями, создавая ткани разных органов.

3. У растений почти всякая дифференциация обратима при условии, если дифференцированная клетка живая, в протопласте сохранилось ядро и не образовалась вторичная оболочка. Даже такие высокоспециализированные клетки, как микроспоры, с помощью ряда экспериментальных процедур можно заставить пролиферировать и дать начало целому растению. Итак, в определенных условиях многие из зрелых растительных клеток сохраняют способность делиться, а в некоторых случаях даже вступить на новый путь развития.

Задача 2. Культивируемые клетки высших растений могут рассматриваться как типичные микрообъекты. В основе культивирования растительных клеток лежит свойство, благодаря которому соматические клетки растения способны полностью реализовать наследственную информацию, то есть обеспечить развитие всего растения.

1. Какое название носит данное свойство растительных клеток?
2. Какие циклы развития проходит каллусная клетка за весь период своей жизнедеятельности? Кривая роста и фазы роста каллусной ткани.
3. Протопласт - это клетка, лишенная оболочки. Способна ли она к

делению?

4. При получении каллусных культур сначала готовят маленькие (2— 4мм) кусочки растительной ткани, не утратившие способность к репродукции. Их название. Этапы получения первичного каллуса.

Эталон ответа. 1. Свойство тотипотентности растительных клеток.

2. Каллусная клетка развивается аналогично другим клеткам, проходя соответственно такие циклы, как деление, растяжение, дифференцировка, старение и отмирание. Кривая роста каллусной ткани имеет S-образный характер и включает пять фаз разной длительности у разных растений:

1 — латентная (лаг-фаза — клетки адаптируются и готовятся к делению);

2 — линейная (рост каллусной ткани идет с постоянной скоростью);

3 — экспоненциальная (время максимальной митотической активности; рост клетки ускорен, масса каллуса увеличивается);

4 — стационарная (интенсивность деления резко снижается); 5 — отмирания

3. Да, протопласт- «голая» клетка потенциально способна восстанавливать новую оболочку, делиться, образовывать клеточные агрегаты, из которых можно получить клеточную культуру с новыми свойствами, а затем новое растение - регенерант.

4. При получении каллусных культур сначала готовят эксплант — маленькие (2— 4 мм) кусочки растительной ткани, не утратившие способность к репродукции. Этот растительный материал тщательно моют, стерилизуют 96% спиртом или 0,1 % сулемой, а затем снова тщательно промывают дистиллированной водой и помещают на синтетическую агаризованную питательную среду. Сосуды закрывают ватно-марлевыми тампонами. Для образования каллуса и роста ткани сосуды переносят в темное помещение, где поддерживают определенную температуру (24—26 °С) и влажность (65—70%), при этом через 2 — 3 нед на раневой поверхности образуется первичный каллус.

Задача 3. Культуры клеток и тканей для массового размножения растений и оздоровления посадочного материала, в том числе лекарственных растений, нашли широкое применение в растениеводстве.

1. Какой метод позволяет от одной меристемы получить (регенерировать) достаточно большое количество новых растений, в том числе и в культуре *in vitro*? Для осуществления данного метода более подходят слабо дифференцированные или высоко дифференцированные ткани

растения?

2. Каллусная ткань, определение, биологическая роль.

3. В качестве чего при культивировании растительных клеток используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), альфа-нафтилуксусную кислоту (НУК)?

4. Какими в зависимости от происхождения и условий выращивания каллусные ткани бывают по степени плотности?

Эталон ответа. 1. Этот метод, названный микрклональным размножением, позволяет от одной меристемы получить (регенерировать) достаточно большое количество новых растений, в том числе и в культуре *in vitro*. Обязательным условием для микрклонального размножения является идентичность полученного растительного материала исходному материнскому растению.

Для обеспечения максимальной генетической стабильности клонируемого материала в качестве исходного экспланта используют молодые слабо дифференцированные ткани, в частности кончики молодых стеблей и корней, пазушные почки, зародыши, части молодых проростков и другие меристематические ткани.

2. Каллусная ткань - один из видов клеточной дифференцировки, возникает путем

неорганизованной пролиферации дедифференцированных клеточных органов растения. У растений в природе каллусная ткань возникает в исключительных обстоятельствах (например, при травмах) и функционирует непродолжительное время. Эта ткань защищает место поранения, может накапливать питательные вещества для анатомической регенерации или регенерации утраченного органа.

3. 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), а-нафтилуксусную кислоту (НУК) используют в качестве ауксинов.

4. В зависимости от происхождения и условий выращивания каллусные ткани бывают:

- рыхлые, сильно опухшие, легко распадающиеся на отдельные клетки;
- средней плотности, с хорошо выраженными меристематическими очагами;
- плотные, с зонами редуцированного камбия и сосудов.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ИСХОДЯЩЕГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ.

1. Оптимальные условия культивирования изолированных тканей и клеток растений:

А) $t = 10 - 15$ °С, относительная влажность воздуха 30 – 40 %.

Б) $t = 25 - 27$ °С, влажность 60 -70 %.

В) $t = 35 - 40$ °С, влажность 80 -90 %.

2. «Голые» протопласты – это:

А) каллусная культура.

Б) клеточная суспензия в жидкой питательной среде.

В) эубактерий.

Г) зародыши.

3. Гибриды, образованные при слиянии протопластов разных материнских клеток, называются:

А) гомокарионы.

Б) гетерокарионы.

В) зиготы.

Г) мутанты.

4. Полиэтиленгликоль, вносимый в суспензию протопластов:

А) предотвращает их слияние.

Б) способствует их слиянию.

В) предотвращает микробную контаминацию.

Г) исполняет роль консерванта.

5. Как достигается высокая стабильность протопластов при хранении в:

а) холоде

б) среде с добавлением антиоксидантов

в) гипертонической среде

г) анаэробных условиях

д) среде полиэтиленгликоля

6. Лизоцим обеспечивает получение протопластов:

а) клеток растений

б) клеток грибов

в) клеток животных

г) актиномицетов

Ответы на тестовые задания:

	1	2	3	4	5
--	---	---	---	---	---

	Б	В	Б	Б	В
					б
					Д

ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАНЯТИЮ ПРЕПОДАВАТЕЛЯМ:

Основная:

1. Биотехнология. Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева – М.: «Академия», 2007. – С. 85-101, 182-191, 204-218.
2. Фармацевтическая биотехнология: Учебное пособие для студентов высших уч. заведений Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л., Михалева Л.К., Белова Л.С. Ростов-на-Дону Феникс Томск Издательство НТЛ Сибирский Государственный медицинский Университет, 2006. – 251 с.
3. Фармацевтическая биотехнология: рук. к практ. занятиям: учеб. пособие / С.Н. Орехов ; под ред. В.А. Быкова, А.В. Катлинского. – м.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – С. 123-142.
4. Фармацевтическая биотехнология: руководство к практическим занятиям: учеб. пособие /. 2-е изд., перераб. и доп. С.Н. Орехов М.: ГЭОТАР- Медиа, 2015. – 432 с.

Дополнительная:

5. Терминологический словарь по биотехнологии
6. Биология: учеб. пособие / Г.Г. Чебышев ; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 416 с.
7. Микробиология, вирусология и иммунология: рук. к лаб. занятиям: учеб. пособие / В.С. Сбойчакова; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 320 с.
8. Микробиология: учебник для студентов фармацевтических ВУЗов / А.А. Воробьев и др.; – М.: «Медицина», 2003. – 336 с.

Занятие № 17.

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Модуль № 4 по темам:
«Антибиотики. Частная биотехнология антибиотиков. Препараты нормофлоры. Пребиотики. Биопрепараты растительного происхождения».

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: закрепление и систематизация знаний у студентов по изученным за модуль темам.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЗАНЯТИЯ (в академических часах) – 4.

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ: 527 аудитория, 2 корпус.

ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ И БЮДЖЕТ УЧЕБНОГО ВРЕМЕНИ:

1. Организационный момент 5 мин.
2. Тестовый контроль входного уровня знания 15 мин.
3. Опрос, дискуссия, разбор ситуационной задачи на занятии 65 мин.
4. Перерыв 10 мин.
5. Опрос, дискуссия, самостоятельное решение ситуационной задачи 65 мин.
6. Тестовый контроль исходного уровня знания 15 мин.
7. Подведение итогов занятия, задание к следующему занятию 5 мин.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЗАНЯТИЯ:

Контрольные вопросы:

1. Общие понятия об антибиотиках (а/б). А/б как вторичные метаболиты.
2. Типы связей между микробиологическими сообществами.
6. Классификации а/б. Механизмы биосинтеза а/б.
7. Биотехнология а/б. Схема производства а/б по Н.Е. Егорову. Фазы процесса ферментации а/б.
8. Методы выделения и очистки а/б.
9. Механизмы действия а/б.
10. Антибиотикорезистентность. Пути борьбы с антибиотикорезистентностью. Поиск новых природных а/б.
11. Биотехнология антибиотиков.
12. Частная технология а/б: пенициллины и цефалоспорины.
13. Общее понятие о ферментах.
14. Общая технологическая схема получения ферментов биотехнологическим методом. Промышленное получение ферментов.
15. Основные направления медицинской энзимологии. Классификация энзимов. Что характерно для ферментативной реакции?
17. В чем заключаются особенности культивирования продуцентов ферментов? Какие среды и какого состава могут быть использованы для этого процесса?
18. Как осуществляется процесс выделения и очистки ферментов, получаемых биотехнологическим методом? Как осуществляется процесс фильтрации? Как осуществляется процесс дезинтеграции биомассы? Какие хроматографические методы применяются для фракционирования? Особенности аффинной хроматографии.
19. Что такое иммобилизация? Какие методы иммобилизации ферментов вы знаете? Какие материалы используются для адсорбции ферментов? В чем заключается этот метод иммобилизации ферментов? Как осуществляется метод иммобилизации ферментов с помощью ковалентных связей? Каковы особенности данного метода? В чем заключается металлохелатный метод иммобилизации и метод включения ферментов в гель?
20. Использование микрокапсул и липосом для получения ферментных препаратов.
21. Иммобилизованные растительные клетки.
22. Номенклатура некоторых ферментных ЛП.
23. Опишите технологию получения террилитина и стрептокиназы.
24. Понятия: пробиотики. симбиоз, симбионты.
25. Содержание микрофлоры кишечника человека.
26. Лакто- и бифидобактерии.
27. Дисбактериоз. Причины возникновения, профилактика и лечение.
28. Производство препаратов нормофлоры.
29. Частная технология препаратов нормофлоры.
30. Номенклатура препаратов нормофлоры: бактисубтил, бифидумбактерин в порошке, бификол сухой, бифилиз, бифилонг сухой, биовестин, лактобактерин в порошке, аципол сухой, линекс, колибактерин сухой, споробактерин сухой, энтерол 250, концентрат «Наринэ», пребиотики.
31. Культура изолированных клеток, тканей и органов растений.
32. Особенности культивирования изолированных клеток и тканей растений.
33. Методы культивирования изолированных клеток и тканей.
34. Культура растительных клеток как источник ЛВ.

ЭТАЛОНЫ ТЕСТОВЫХ ЗАДАНИЙ:

Вариант 1

1. Пробиотики это:

- А) биопрепараты нормальной микрофлоры кишечника;
- Б) пищевые БАД, состоящие из углеводов

2. К монокомпонентным пробиотикам относятся:

- А) бифидумбактерин
- Б) бифилак
- В) бифиформ

3. К поликомпонентным пробиотикам относятся:

- А) бифидумбактерин
- Б) бифилак
- В) бифиформ

4. Микроорганизмы, используемые для создания эубиотиков, должны обладать:

- А) устойчивостью к антибиотикам
- Б) антагонистической активностью
- В) адгезивными свойствами
- Г) достаточной скоростью роста

5. Длительность (в сутках) процесса производства лактобактерина в ампулах составляет:

- А) 2
- Б) 5
- В) 7
- Г) 42

6. Культуры клеток и тканей лекарственных растений впервые получены:

- А) в начале XX в.
- Б) в середине XX в.
- В) в конце XX в.

7. Оптимальные условия культивирования изолированных тканей и клеток растений:

- А) $t = 10 - 15$ °С, относительная влажность воздуха 30 – 40 %.
- Б) $t = 25 - 27$ °С, влажность 60 -70 %.
- В) $t = 35 - 40$ °С, влажность 80 -90 %.

8. «Голые» протопласты – это:

- А) каллусная культура.
- Б) клеточная суспензия в жидкой питательной среде.
- В) эубактерий.
- Г) зародыши.

9. Гибриды, образованные при слиянии протопластов разных материнских клеток, называются:

- А) гомокарионы.
- Б) гетерокарионы.
- В) зиготы.

Г) мутанты.

10. Полиэтиленгликоль, вносимый в суспензию протопластов:

- А) предотвращает их слияние.
- Б) способствует их слиянию.
- В) предотвращает микробную контаминацию.
- Г) исполняет роль консерванта.

11. Для сбраживания субстрата при производстве этанола целесообразнее использовать:

- А) *S. cerevisiae*.
- Б) *Zygomonas mobilis*.
- В) *E. coli*.
- Г) *C. albicans*.

12. Феромоны, вызывающие немедленные поведенческие эффекты:

- А) феромоны – релизеры.
- Б) феромоны – праймеры.

13. Мицелий продуцента после его отделения от культуральной жидкости представляет собой:

- А) жидкие отходы.
- Б) твердые отходы.
- В) газообразные отходы.

14. Какие основные виды микроорганизмов присутствуют в «активном иле»:

- А) рода *Staphylococcus*
- Б) рода *Pseudomonas*
- В) рода *Streptococcus*
- Г) рода *Bacterium*

15. Препарат «Phenobac» используют:

- А) для утилизации углеводов
- Б) для окисления полисахаридов
- В) для освобождения от синтетических детергентов.

16. Антибиотики являются:

- А) первичными метаболитами
- Б) вторичными метаболитами

17. Процессы не характерные для тропофазы стадии биосинтеза а/б:

- А) интенсивное накопление биомассы продуцента
- Б) интенсивное накопление а/б
- В) интенсивное поглощение кислорода

18. Процессы характерные для идиофазы стадии биосинтеза а/б:

- А) интенсивное накопление биомассы продуцента
- Б) интенсивное накопление а/б
- В) интенсивное поглощение кислорода

19. Цель стадии предварительной обработки культуральной жидкости в производстве антибиотиков:

- А) освободить культуральную жидкость от кислорода
- Б) освободить культуральную жидкость от продуцента
- В) освободить культуральную жидкость от окислителей

Г) освободить культуральную жидкость от азотистых соединений

20. Автолиз мицелия продуцента в процессе биосинтеза антибиотиков характерен для стали:

А) тропофазы

Б) идиофазы

В) клеточной стенки

21. Регулирует процесс пищеварения:

А α -амилаза

Б ораза

В стрептодеказа

22. Верно ли утверждение: «Полиакриламидный гель не обладает ионно-обменными свойствами, поэтому при иммобилизации рН - профиль активности фермента не изменяется»:

А Верно

Б Неверно

23. В процессе выделения из культуральной среды ферментов и их очистки не используется:

А экстракция

Б сорбционные процессы

В осаждение (высаливание)

Г перегонка с водяным паром

24. Фермент лигаза, используемый в генетической инженерии:

А скрепляет вектор с оболочкой клетки хозяина

Б катализирует включение вектора в хромосому клеток хозяина

В катализирует ковалентное связывание углеводно – фосфорной цепи ДНК – гена с ДНК – вектора

Г катализирует замыкание пептидных мостиков в пептидогликане клеточной стенки

25. Целями иммобилизации ферментов в биотехнологической промышленности являются:

А повышение удельной активности

Б повышение стабильности

В расширение субстратного спектра

Г многократное использование

26. В производстве а/б при культивировании микроорганизмов используется:

А) поверхностное культивирование

Б) глубинное культивирование

27. В производстве а/б при культивировании микроорганизмов используются питательные среды:

А) твердые

Б) жидкие

В) газообразные

28. Какая цель не преследуется при перемешивании среды в реакторе:

А) удаление с поверхности клеток продуктов обмена и лизиса клеток

Б) распыление воздуха, выходящего из барботера

В) равномерное распределение питательных веществ

Г) отделение культуральной среды от продуцента

29. При биосинтезе какого антибиотика необходим источник хлора:

- А) ампициллина
- Б) стрептомицина
- В) левомицетина
- Г) грамицидина С.

30. Токсичность плохо очищенных препаратов стрептомицина связана:

- А) с наличием в препаратах гистаминоподобных веществ
- Б) с образованием токсичных веществ из стрептомицина
- В) с повышенной скоростью проникновения стрептомицина в ткани организма
- Г) с пониженной скоростью проникновения стрептомицина в ткани организма и, таким образом, повышенным его содержанием в крови.

Вариант 2

1. К препаратам пробиотиков, не содержащих бифидобактерии, относят:

- а) пробифор
- б) нормофлор
- в) бификол
- г) бифилиз

2. К препаратам пробиотиков, не содержащих лактобактерии, относят :

- а) гастрофарм
- б) бифилиз
- в) линекс
- г) лактобактерин сухой

3. Если оба штамма в смешанной культуре растут быстрее, чем в соответствующих чистых культурах, явление носит название:

- а) нейтрализм
- б) мутуализм
- в) аменсализм
- г) комменсализм

4. Рост одного микроорганизма подавляется в присутствии другого – это:

- а) нейтрализм
- б) аменсализм
- в) комменсализм
- г) симбиоз

5. Культивирование молочнокислых бактерий осуществляют при рН:

- а) 5,5-6,0
- б) 8,0-8,2
- в) 6,0-7,0
- г) 7,2-8,0

6. Как достигается высокая стабильность протопластов при хранении в:

- а) холоде
- б) среде с добавлением антиоксидантов
- в) гипертонической среде

- г) анаэробных условиях
- д) среде полиэтиленгликоля

7. Лизоцим обеспечивает получение протопластов:

- а) клеток растений
- б) клеток грибов
- в) клеток животных
- г) актиномицетов

8. Культура тканей растений – это:

- а) выращивание лекарственных растений на опытном поле
- б) культивирование микроорганизмов, усвоивших ген растения, ответственный за синтез определенного БАВ
- в) выращивание в стерильных искусственных условиях изолированных клеток, тканей, органов растений на твердых или жидких питательных средах
- г) сбор растений на естественных средах обитания

9. Основное преимущество растительного сырья, получаемого при выращивании культур клеток перед сырьем, получаемым из плантационных или дикорастущих растений:

- а) большая концентрация целевого продукта
- б) меньшая стоимость
- в) стандартность
- г) более простое извлечение целевого продукта

10. Индукторами реализации тотипотентности клеток и тканей растений являются:

- а) УФ-облучение
- б) витамины
- в) аминокислоты
- г) фитогормоны

11. Функцией феромонов является:

- а) антимикробная активность
- б) противовирусная активность
- в) изменение поведения организма со специфическим рецептором
- г) терморегулирующая активность
- д) противоопухолевая активность

12. Значение алломонов как сигнально-коммуникативных веществ для секретирующего организма:

- а) адаптивно выгодное
- б) органические популяции
- в) узнавание на территории
- г) половые аттрактанты

13. Значение крайромонов в природе:

- а) антимикробная активность
- б) регуляция численности популяции
- в) привлечение особей своего вида
- г) отпугивание особей других видов

14. В состав активного ила входят:

- а) вирусы

- б) бактериофаги
- в) бактерии
- г) сине-зеленые водоросли

15. При очистке стоков биотехнологических производств применяют активный ил – это:

- а) природный комплекс микроорганизмов
- б) сорбент
- в) смесь сорбентов
- г) смесь микроорганизмов

16. Биотехнология является начальным этапом в процессе производства:

- а) полусинтетических антибиотиков
- б) цианокобаламина
- в) бензилпенициллина
- г) кислоты аскорбиновой

17. Биотехнология является заключительным этапом в процессе производства:

- а) полусинтетических антибиотиков
- б) аминокислот химико-ферментативным методом
- в) кислоты аскорбиновой
- г) рекомбинантного инсулина

18. В развитии биотехнологии период антибиотиков проходил:

- а) 1866-1940 гг.
- б) 1941-1960 гг.
- в) 1961-1975 гг.
- г) 1975-2001 гг.

19. Практическое значение полусинтетического аминогликозида амикацина обусловлено:

- а) активностью против анаэробных патогенов
- б) отсутствием нефротоксичности
- в) устойчивостью к защитным ферментам у бактерий, инактивирующим другие аминогликозиды
- г) активным выделением из клетки

20. Защита продуцентов аминогликозидов от собственного антибиотика:

- а) низкое сродство рибосом
- б) временная ферментативная инактивация
- в) компартментация
- г) утолщение

21. Противоопухолевым ферментным препаратом является:

- а) аспарагиназа
- б) стептокиназа
- в) пенициллиназа
- г) урокиназа

22. Лактоза под действием лактазы расщепляется с образованием:

- а) глюкозы и фруктозы
- б) глюкозы и галактозы
- в) двух молекул сахарозы

г) двух молекул фруктозы

23. Фермент лактаза относится к классу:

- а) липаз
- б) трансфераз
- в) изомераз
- г) гидролаз

24. Фермент амилазу для производственных процессов получают из культуры:

- а) *Aspergillus niger*
- б) *Bacillus subtilis*
- в) *Bacillus coagulans*
- г) *Arthrobacter simplex*

25. Фермент амилоглюкозидазу, осуществляющий гидролиз олигосахаридов до глюкозы, для производственных процессов получают из культуры:

- а) *Aspergillus niger*
- б) *Bacillus subtilis*
- в) *Bacillus coagulans*
- г) *Arthrobacter simplex*

26. От собственного антибиотика продуценты аминогликозидов защищаются с помощью:

- а) низкого сродства рибосом
- б) временная ферментативная инактивация
- в) компартментация
- г) утолщение клеточной стенки

27. Что такое активное выделение антибиотика из бактериальной клетки – это:

- а) экранирование рибосомы
- б) эффлюкс
- в) снижение проницаемости внешних клеточных структур
- г) ремиссия

28. Местами естественного обитания продуцентов антибиотиков:

- а) почва
- б) воздух
- в) деревья
- г) проточная вода

29. Плесневые грибы как продуценты антибиотиков:

- а) одноклеточные эукариоты
- б) многоклеточные эукариоты
- в) одноклеточные прокариоты
- г) многоклеточные прокариоты

30. Клеточная стенка актиномицетов состоит из:

- а) хитина
- б) пептидогликана
- в) липоолисахаридов
- г) липопротеинов

Вариант 3

1. Механизмы мутуализма:

- а) обмен питательными веществами
- б) синтез токсических веществ
- в) поглощение незаменимых питательных веществ
- г) секреция ферментов, разрушающих полимеры клеточной стенки

2. Состояние системы, когда ни один из организмов не оказывает влияния на скорость роста другого микроорганизма, называется:

- а) нейтрализм
- б) мутуализм
- в) комменсализм
- г) аменсализм

3. Рост одного микроорганизма подавляется в присутствии другого – это:

- а) нейтрализм
- б) аменсализм
- в) комменсализм
- г) симбиоз

4. Bacillus входит в состав препарата:

- а) Флонивин БС
- б) Нормофлор
- в) Энтерол
- г) Бификол

5. Накопление биомассы культур Lactobacillus проводят на питательных средах на основе:

- а) казеина и желатина
- б) печеночного бульона, пептона и лактозы
- в) гидролизата молока, солодового экстракта, глюкозы
- г) мелассы и хлорида натрия

6. Эксплант – это:

- а) изолированные из растений фрагменты ткани
- б) фрагменты каллуса для субкультивирования
- в) часть суспензионной культуры для субкультивирования
- г) культура, возникающая из одной клетки

7. Тип питания культуры тканей растений:

- а) ауксотрофный
- б) хемогетеротрофный
- в) фотоавтотрофный
- г) хемолитотрофный

8. Из культуры какой клетки выделяют шиконин:

- а) Воробейника краснокорневого
- б) Табака курительного
- в) Женьшеня
- г) Родиолы розовой

9. Из культуры какой клетки выделяют убихинон:

- а) Воробейника краснокорневого

- б) Табака курительного
- в) Женьшеня
- г) Родиолы розовой

10. Из культуры какой клетки выделяют синтез панаксозидов:

- а) Воробейника краснокорневого
- б) Табака курительного
- в) Женьшеня
- г) Родиолы розовой

11. Биологическая очистка сточных вод основана на:

- а) способности микроорганизмов к минерализации органических веществ
- б) химическом окислении органических веществ
- в) сжигании органических веществ в токе кислорода
- г) окислении органических веществ под действием хлора

12. Аппараты, в которых осуществляется деструкция органических загрязнений сточных вод, называется:

- а) усреднители
- б) отстойники
- в) аэротенки
- г) регенераторы

13. Правила GMP предусматривают производство в отдельных помещениях и на отдельном оборудовании:

- а) пенициллинов
- б) аминогликозидов
- в) тетрациклинов
- г) макролидов
- д) полиенов

14. GLP регламентируют:

- а) лабораторные исследования
- б) планирование поисковых работ
- в) набор тестов при предклинических испытаниях
- г) методы математической обработки данных
- д) проведение валидации

15. При очистке промышленных стоков в «часы пик» применяют штаммы-деструкторы:

- а) природные микроорганизмы
- б) постоянные компоненты активного ила
- в) стабильные генно-инженерные штаммы
- г) не стабильные генно-инженерные штаммы

16. Цефалоспорин четвертого поколения, устойчивый к бета-лактамазам грамположительных бактерий:

- а) цефазолин
- б) цефтриаксон
- в) цефепим
- г) цефролекс

17. Пенициллиназа используется при:

- а) проверке заводских серий пеницилина на стерильность
- б) оценке эффективности пенициллиновых структур против резистентных бактерий
- в) получении полусинтетических пенициллинов
- г) снятии аллергических реакций на пенициллин

18 Свойство бета-лактамов, из-за которого их следует, согласно GMP, нарабатывать в отдельных помещениях:

- а) общая токсичность
- б) хроническая токсичность
- в) эмбриотоксичность
- г) аллергенность

19. Биосинтез антибиотиков, используемых как лекарственные вещества, усиливается и наступает раньше на средах:

- а) богатых источниками азота
- б) богатых источниками углерода
- в) богатых источниками фосфора
- г) бедных питательными веществами

20. С точки зрения биотехнологии антибиотики являются:

- а) первичными метаболитами
- б) аминокислотами
- в) ферментами
- г) вторичными метаболитами

21. Мультиферментный комплекс – это:

- а) комплекс ферментных белков, выделяемый из клетки путем экстракции и осаждения
- б) комплекс ферментов клеточной мембраны
- в) комплекс экзо- и эндопротеаз
- г) комплекс ферментов, катализирующих синтез первичного или вторичного метаболита

22. Лизоимадаза применяется для:

- а) улучшения процесса пищеварения
- б) очистки ран от гнойно-некротических масс
- в) лечения тромбозов
- г) снятия анафилактического шока

23. Методы иммобилизации:

- а) внутриклеточные
- б) физико-химические
- в) ферментативные
- г) химические

24. Препараты протеолитических ферментов:

- а) террилитин
- б) солизим
- в) стрептолиаза
- г) аспарагиназа

25. Пенициллинназа применяется с целью:

- а) лечения лейкемии
- б) лизиса некротических масс в ткани
- в) снятия анафилактического шока

г) лечения гиперурекимии

26. Актиномицеты продуцируют:

- а) стрептомицины
- б) витамины
- в) аминокислоты
- г) ферменты

27. Оптимальная температура для синтеза антибиотиков:

- а) выше 30° С
- б) 24-29° С
- в) 15-18° С
- г) 18-22° С

28. Интенсивному биосинтезу антибиотиков способствует:

- а) уменьшение в питательной среде источников углерода
- б) увеличение в питательной среде источников азота
- в) увеличение в питательной среде глюкозы
- г) увеличение в питательной среде источников фосфора

29. Побочные эффекты антибиотикотерапии:

- а) дисбактериоз
- б) ОРВИ
- в) переломы
- г) авитаминоз

30. Мишень для антибактериальных веществ в микробной клетке иначе называют:

- а) таргет
- б) промотор
- в) сайт
- г) экзон

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ:

№ варианта	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	А	А	БВ	АБВ	Г	А	Б	В	Б	Б	Б	А	Б	БГ	А
2	Б	Б	Б	Б	Г	В	Д	В	В	Г	В	А	Б	В	А
3	А	А	Б	А	В	А	Б	А	Б	В	А	В	А	В	Г
№ варианта	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1	Б	Б	Б	Б	Б	А	А	БВ	В	Б	АБ	Б	А	Г	А
2	А	Б	Б	В	Б	А	Б	Г	Б	А	Б	Б	А	Б	Б
3	В	В	Г	Г	Г	Г	Б	Г	А	В	А	Б	А	А	А

ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАНЯТИЮ ПРЕПОДАВАТЕЛЯМ:

Основная:

1. Биотехнология. Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева – М.: «Академия», 2007. – С. 85-101, 182-191, 204-218.
2. Фармацевтическая биотехнология: Учебное пособие для студентов высших уч. заведений Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л., Михалева Л.К., Белова Л.С. Ростов-

на-Дону Феникс Томск Издательство НТЛ Сибирский Государственный медицинский Университет, 2006. – 251 с.

3. Фармацевтическая биотехнология: рук. к практ. занятиям: учеб. пособие / С.Н. Орехов ; под ред. В.А. Быкова, А.В. Катлинского. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – С. 123-142.

4. Фармацевтическая биотехнология: руководство к практическим занятиям: учеб. пособие /. 2-е изд., перераб. и доп. С.Н. Орехов М.: ГЭОТАР- Медиа, 2015. – 432 с.

Дополнительная:

5. Терминологический словарь по биотехнологии

6. Биология: учеб. пособие / Г.Г. Чебышев ; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 416 с.

7. Микробиология, вирусология и иммунология: рук. к лаб. занятиям: учеб. пособие / В.С. Сбойчакова; – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 320 с.

8. Микробиология: учебник для студентов фармацевтических ВУЗов / А.А. Воробьев и др.; – М.: «Медицина», 2003. – 336 с.

Занятие № 18.

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Модуль № 4 по ПРАКТИЧЕСКИМ НАВЫКАМ

Задача. В процессе биотехнологического процесса из ядра клетки патогенного для человека микроорганизма выделен геном, в котором был выбран определенный ген (участок нуклеиновой кислоты микроорганизма). Данный ген размножается с применением ПЦР. В базе антимикробных агентов выбран один, взаимодействие с которым подавило активность гена наиболее эффективно. Затем выбранный антимикробный агент был опробован в действии на целую микробную клетку исходного микроорганизма, вызвав выраженное подавление ее жизнедеятельности.

1. Определите вид скрининга антимикробной структуры для конкретного патогенна.
2. Выделите основные этапы скрининга, определите их значение в ходе скрининга.
3. Для чего применяется данный вид скрининга антимикробной структуры.
4. Что служит продолжением указанного процесса?

Задача. Генная инженерия появилась благодаря работам многих исследователей в разных отраслях биохимии и молекулярной генетики. Генная инженерия – совокупность методов, позволяющих в пробирке переносить генетическую информацию из одного организма в другой. Перенос генов дает возможность преодолевать межвидовые барьеры и предавать отдельные наследственные признаки одних организмов другим. Цель – получение клеток, в промышленных масштабах нарабатывать некоторые белки.

1. Что представляют из себя плазмиды, их роль в генной инженерии?
2. Для чего бактериальные клетки вырабатывают рестриктазы?
3. Сущность процесса клонирования для получения рекомбинантной ДНК с применением плазмид и рестриктаз
4. Основные продуценты, используемые в построении рекомбинантных белков

5. Понятие вектора в генной инженерии

Задача. Важной составной частью биотехнологии является генетическая инженерия. Методы генной инженерии преобразуют клетки бактерий, дрожжей и млекопитающих в «фабрики» для масштабного производства любого рекомбинантного белка.

1. Какие вы знаете ферменты, применяемые при конструировании рекомбинантных ДНК
2. Особенности контроля качества генно-инженерных препаратов, показатели качества
3. Роль вектора в генной инженерии
4. Характеристика векторных систем, важные для переноса необходимых генов в клетки млекопитающих

Задача. Поверхностный метод культивирования продуцентов ферментов.

А. при поверхностном методе культура растет на поверхности твердой или жидкой питательной среде? За счет чего обеспечивается аэрация при этом способе?

Б. основные преимущества поверхностной культуры.

В. виды посевного материала при поверхностном культивировании продуцентов ферментов.

Г. схема очистки при поверхностном культивировании продуцентов ферментов.

Задача. Стадия ферментации – центральная среди этапов промышленного производства. Под ферментацией понимают совокупность последовательных операций от внесения в заранее приготовленную и термостатированную среду инокулята до завершения процессов роста, биосинтеза или биотрансформации

1. Какие два вида ферментации вам известны?
2. С помощью какого технологического оборудования осуществляется ферментации?
3. Как технологическое оформление процессов промышленной биотехнологии зависит от отношения микроорганизма-продуцента к кислороду? Три группы биореакторов.
4. Способы управления процессом ферментации

Задача. Важное значение среди гормонов поджелудочной железы играет инсулин. В настоящий момент расширяются возможности создания рекомбинантного инсулина.

1. биологические функции инсулина в организме человека.
2. строение инсулина.
3. биосинтез молекулы инсулина в организме человека из проинсулина.
4. какие недостатки производства и применения инсулинов из животного сырья вы знаете?

Задача. Определите лекарственную субстанцию по описанию технологического процесса: Штамм сконструирован методом генной инженерии. Отбор высокопродуктивных клонов

проведен по устойчивой к аналогу целевого продукта. В качестве аналога использован розеофлавин. Сверхпродуцент культивируют на питательной среде с мелассой и дрожжевым экстрактом в течении 25-35 ч. При температуре 37⁰С в условиях аэрации. Целевой продукт секретируется в культуральную жидкость в количестве 3,4-4,0 г/л целевого продукта. Лекарственную субстанцию выделяют из культуральной жидкости по растворимости в щелочах и кислотах и низкой растворимости в органических жидкостях.

1. составьте технологическую схему получения данного соединения.
2. метод совершенствования выбранного продуцента и отбора сверхпродуцента.
3. какие еще продуценты данного вещества вам известны, их достоинства и недостатки.

Задача. Создание и производство рекомбинантных человеческих инсулинов существенно повысило эффективность лечения сахарного диабета и обеспечило повышение качества жизни больных.

1. какие два подхода для получения инсулина использованием методов генетической инженерии вы знаете?
2. какой из подходов применяется в биотехнологическом производстве инсулина по технологии фирмы «Elililly» (США)
3. какой продуцент применяется в биотехнологическом производстве инсулина по технологии фирмы «Elililly».
4. процесс ферментации при биотехнологическом производстве инсулина по технологии фирмы «Elililly».

Для чего применима дезинтеграция клеток продуцента при биотехнологическом производстве инсулина по технологии фирмы «Elililly».

Задача. «Из плазмы крови или сыворотки крови доноров-добровольцев, иммунизированных вакциной против клещевого энцефалита, выделяют фракцию Ig фракционированием этанолом при температуре ниже 0⁰С глобулиновой части белков крови. Далее проводят лиофилизацию, изготовление 10% раствора, стерилизующую фильтрацию и ампулирование по 1 мл (1 доза)».

Проанализируйте описание технологического процесса по следующей схеме:

- Название иммуотропного лекарственного средства;
- Класс и группа препаратов, к которым относится данное средство;
- Достоинства и недостатки данного иммуотропного средства;
- Основные этапы получения;
- Показатели качества;
- Условия хранения и транспортирования;
- Влияние на иммунитет и применение.

Задача. Главным препятствием, стоящим на пути развития промышленного микробиологического гидроксирования стероидов является низкая ферментация, несмотря на высокий процентный выход по субстрату.

1. причины низкой производительности ферментации при микробиологическом гидроксировании стероидов.
2. актинобактерии, роль в процессах биоконверсии стероидов.
3. род *Corynebacterium*, роль в биоконверсии стероидов.

Задача. В процессе микробиологического синтеза с применением кишечной палочки получают аминокислоту треонин.

1. Биообъект, его особенности при регуляции биосинтеза аминокислот.

Строение регулярной области.

2. Методы совершенствования биообъекта.

3. Метод отбора сверхпродуцента.

Задача. Иммунная система, совместно с эндокринной, нервной, сердечнососудистой и другими системами, постоянно поддерживает внутреннюю среду организма, или гомеостаз.

1. активирующие агенты иммунной системой (определение).

2. какие компоненты иммунной системы вы знаете?

3. к какому из компонентов иммунной системы относятся иммуноглобулины? Какие клетки в организме вырабатывают иммуноглобулины? Классы иммуноглобулинов.

Задача. Определите лекарственную субстанцию по описанию технологического процесса: Штамм сконструирован методом геной инженерии. Отбор высокопродуктивных клонов проведен по устойчивой к аналогу целевого продукта. В качестве аналога использован розеофлавин. Сверхпродуцент культивируют на питательной среде с мелассой и дрожжевым экстрактом в течении 25-35 ч. При температуре 37⁰С в условиях аэрации. Целевой продукт секретируется в культуральную жидкость в количестве 3,4-4,0 г/л целевого продукта. Лекарственную субстанцию выделяют из культуральной жидкости по растворимости в щелочах и кислотах и низкой растворимости в органических жидкостях.

1. 1. составьте технологическую схему получения данного соединения.

2. 2. метод совершенствования выбранного продуцента и отбора сверхпродуцента.

3. 3. какие еще продуценты данного вещества вам известны, их достоинства и недостатки.

Задача. Известно, что витамин D₂ (эргостерин) продуцируют дрожжи-сахаромицеты в аэробных условиях при избытке углеводов в питательной среде, сниженном количестве азота и оптимальном содержании кислорода (максимум 2%).

1. назовите промышленный продуцент для провитамина D₂

2. необходим ли УФ-свет для процесса образования целевого продукта? Если да, то для чего и на каком этапе технологического процесса.

3. для чего в промышленном производстве витамина D₂ применяют гидролиз? Как используют полученный гидролизат?

4. как используют грибы *Candida* в качестве продуцента D₂?

5. какие коферменты можно получить с использованием грибов рода *Candida* в качестве продуцента D₂? Роль в организме данных веществ.

Задача. Стероидные гормоны (кортикостероиды, прогестероны, половые гормоны) участвуют во многих жизненно важных функциях организма. В основе получения стероидных гормонов лежат методы биотрансформации (биоконверсии).

1. сущность процесса биотрансформации.
2. каким образом осуществляется синтез молекулы стероида в процессе биоконверсии?
3. основные процессы микробиологической биотрансформации.
4. преимущества биотехнологических методов производства стероидов перед методами химического синтеза.
5. что используется в качестве исходного сырья для производства стероидных препаратов в биотехнологическом производстве?
6. какой тип ферментации применяют при биотрансформации стероидов?

Задача. Эритромицин, являющийся "золотым стандартом" среди антибиотиков класса макролидов, обладает высокой активностью прежде всего против грамположительных кокков, таких как -гемолитический стрептококк группы А (*S.pyogenes*), пневмококк (*S.pneumoniae*), золотистый стафилококк (*S.aureus*), исключая метициллинорезистентные штаммы последнего. Кроме того, он хорошо действует на возбудителя коклюша (*B.pertussis*), дифтерийную палочку (*C.diphtheriae*), моракселлу (*M.catarrhalis*), легионеллы (*Legionella spp.*), кампилобактеры (*Campylobacter spp.*), листерии (*Listeria spp.*), хламидии (*C.trachomatis*, *C.pneumoniae*), микоплазмы (*M.pneumoniae*), уреоплазмы (*U.urealyticum*).

Эритромицин умеренно активен против гемофильной палочки (*H.influenzae*), боррелий (*B.burgdorferi*) и некоторых бактериоидов, включая *B.fragilis*. В то же время он практически не действует на грамотрицательные бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.* и *Acinetobacter spp.*, поскольку не проникает через оболочку клеток данных микроорганизмов.

1. Механизм и характер антимикробного действия макролидов.
2. Каков характер антимикробного действия макролидов.
3. Для каких еще групп антибиотиков характерно также связывание с 50S-субъединицами рибосом микроорганизма? Возможно ли их совместное назначение?
4. Какие методы определения чувствительности микроорганизмов к макролидам Вы знаете?

Задача. В процессе биосинтеза антибиотика из группы аминогликозидов при культивировании продуцента состав питательной среды включал соевую муку, кукурузный экстракт, повышающий эффективность ферментации и соли. Подача газового потока, источники фосфатов и азота соответствовали требованиям. При добавлении в среду некоторого количества глюкозы биосинтез был ослаблен.

1. В результате чего добавление в среду глюкозы снизило эффективность биосинтеза антибиотика? Какое название носит данный эффект, его сущность?
2. Какие общие закономерности необходимо учитывать при культивировании большинства продуцентов вторичных метаболитов?
3. Какие углеводороды наиболее благоприятны для биосинтеза антибиотиков?