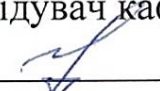


**ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКІВ**

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

 (Борисюк І.Ю.)

“ 27 ” серпня 2021 р

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
з самостійної роботи студентів (СРС)**

Факультет: фармацевтичний

Навчальна дисципліна «Фармацевтична біотехнологія»

Тема №7 **«Фармацевтична біотехнологія отримання антибіотиків»
для аспірантів**

Методичні рекомендації з СРС
розробив:
асистент



_____ (Акішева А.С.)

підпис

Методичні рекомендації з СРС
обговорено на методичній нараді
кафедри
«27» серпня 2021 р.
Протокол № 1

Одеса – 2021

Тема: «Фармацевтична біотехнологія отримання антибіотиків»

Мета: Ознайомитися з фармацевтичною біотехнологією отримання імунобіологічних препаратів.

Основні поняття: Цефалоспорин, стрептоміцин, граміцидін

План

I. Теоретичні питання до заняття:

Цефалоспорин - антибіотик з грибів роду *Cephalosporium*. Основним продуцентом є *C. acremonium*. Вперше повідомлення було зроблено Джузеппе Бротцу в 1948 р культуральної рідини було виявлено кілька цефалоспоринів, основний з яких - цефалоспорин С. На основі цього антибіотика в подальшому були створені численні напівсинтетичні цефалоспорини з цінними властивостями.

За хімічною будовою цефалоспорин належить до β -лактамних з'єднань, але β -лактамні кільце конденсованих ні з п'яти, а з шестичленним гетероциклом. Цефалоспорини на відміну від пеніцилінів стійкі до β -лактамази, пригнічують розвиток і грам позитивних та грам бактерій, але активність цього антибіотика нижче пеніциліну.

Цефалоспорин не інактивується пеніциліназою. Але є аналогічний фермент, гідролізу β -лактамні кільце цефалоспорина - цефалоспориназа.

В процесі розвитку *C. acremonium* поряд з цефалоспорином З синтезується і пеніцилін N. Його освіту йде тим же шляхом, що і освіту ізопеніциліна N в процесі біосинтезу бензілпеніциліном. Через ряд стадій з ізопеніциліна N утворюється цефалоспорин С.

Все пеніциліни і цефалоспорини є селективними інгібіторами синтезу клітинної стінки. Перший етап дії препаратів полягає в їх зв'язуванні з клітинними рецепторами; такими рецепторами є пеніцилінсвязиваючі протеїни (ПСП), кількість яких становить від 3 до 6 тис. у різних бактерій. Окремі ПСП можуть мати різний аффінітет до препарату, і кожен з них може опосередковувати різну дію. Так, приєднання пеніциліну до одного ПСП може викликати аномальне збільшення клітини, приєднання до іншого - приводити до дефекту на поверхні клітинної стінки без подальшого лізису клітини. ПСП контролюється хромосомами, мутації можуть змінити їх кількості та аффінітет до окремих β -лактамних препаратів. Після зв'язування β -лактамну препарату з рецепторами ПСП відзначено зниження реакція транспептидірованія і зупиняється синтез пептидоглікану. Наступний етап - усунення або інактивація інгібітору аутолітичних ензимів (гідролаз) в клітинній стінці, що супроводжується активізацією литического ферменту у деяких мікроорганізмів і може привести до лізису клітини.

В останні роки методом змішаного (біологічного та хімічного) синтезу вдалося отримати близько 50 тис. Аналогів цефалоспорина. Приблизно 50 антибіотиків має практичне клінічне значення. Цефалоспорини традиційно

ділять на чотири покоління по спектру дії та антимікробної активності (табл.5)

Таблиця 5. Характеристика цефалоспоринов різних поколінь

покоління	препарати	спектр активності
I	Цефадроксил, цефазолін, цефалексин, цефалотин, цефепірін, цефраділ	Стафілококи, стрептококи, пневмококи, ентеробактерії
II	Цефаклор, Цефамандол, Цефоніцид, Цеоксітин, цефметазол, цефотетан, Цефуроксим, цефпрозил, Лоракарбеф, Цефподоксим	Грамнегативні бактерії, устоїчівість до дії β -лактамаз
III	Цефалперазон, цефотакім, цефазідім, цефтизоксим, цефтриаксон, цефіксим, максалактам	Ентеробактерії, в т.ч. стійкі до інших антибіотиків. Стійкі до дії β -лактамаз, утворених грамнегативними бактеріями.
IV	Цефепім	Низьку спорідненість до β -лактамаз, швидко проникає в перплазматическое

Стрептоміцин належить до групи аміноглікозидних антибіотиків. Актиномицет, що синтезує стрептоміцин *Streptomyces griseus* вперше був виділений в лабораторії мікробіології Ратжерського університету в 1943 р з появою стрептоміцину медицина отримала потужна зброя для боротьби з таким важкими і досить широко поширеним захворюванням, як туберкульоз. Тому детально розроблялися питання застосування стрептоміцину в терапії різних інфекційних захворювань і його промислового виробництва. Стрептоміцин продукують ряд видів актиномицетів роду *Streptomyces*. Однак основним продуцентом стрептоміцину визнаний *S. griseus*, здатний синтезувати до 10-20 тис мкг / мл антибіотика. Культури актиномицетів вельми варіабельні і кожному штаму повинна відповідати певна середовище та свій режим для розвитку мікроорганізму. На їх мінливість впливають умови культивування та особливо склад середовищ (на багатших за складом середовищах спостерігається і більш швидка мінливість). Мінливість продуцентів стрептоміцину - результат генетичної нестабільності цих мікроорганізмів, обумовлений суттєвими перебудовами ДНК, які зачіпають багато генів, в тому числі і гени біосинтезу антибіотиків і гени стійкості до них.

Для стабілізації ознак, пов'язаних з антибіотикообразованием, при зберіганні і підтримці штаму іноді в середовища додають антимуутагени -

речовини, здатні стабілізувати процеси, що призводять до хромосомних перебудов і регуляції експресії генів. Серед антимуагенів - пуринові нуклеотиди, іони марганцю, L-метіонін, гістидин, поліаміни, кофеїн та інші сполуки. В контролі біосинтезу стрептоміцину *S. griseus* бере участь плазмідна ДНК, в процесі біосинтезу - 20-30 генів.

При промисловому виробництві стрептоміцину використовуються штами, добре розвиваються на соєвих середовищах, їх основними компонентами є соєве борошно, гідрол, амонійні солі. Істотну роль в біосинтезі стрептоміцину грають жири соєвого борошна і її мінеральний склад. Білок сої та його кислотний гідролізат малоприсадибні для біосинтезу антибіотика.

Аерація середовища має істотне значення, так як *S. griseus* - високоаеробний організм і поглинає значну кількість кисню, яке залежить від складу середовища та стадії розвитку продуцента. У ранній період розвитку актиномицета споживання кисню повітря більш інтенсивне, а потім воно падає до нуля. Збільшення ступеня аерації підвищує вихід стрептоміцину. В анаеробних умовах продуцент стрептоміцину розвивається слабо. Міцелій, вирощений в аеробних умовах і перенесений потім в анаеробні, стрептоміцину не утворює. Для максимального накопичення антибіотика культура повинна знаходитися в умовах безперервної аерації.

Оптимальна температура для розвитку антибіотика 27-29 ° С. Підвищення її до 30 ° С і вище різко знижує і навіть припиняє його освіту. Оптимальну температуру змінюють залежно від штаму продуцента і складу середовища.

Кращим початковим рН для розвитку актиномицета є 7,0. Стрептоміцин утворюється при значенні рН від 7,5 до 8,5. У кислих середовищах активність стрептоміцину знижується, в лужних - максимальна. Так, активність стрептоміцину при рН 5,8 в 20-80 разів менше, ніж при рН 8,0. Для прояву максимальної антимикробної активності стрептоміцину оптимальне значення рН 7,5-8,0.

Наявність деяких речовин в середовищі впливає на антибіотичну активність стрептоміцину. Якщо до цього середовища додати 0,5-3% натрію хлориду, калію хлориду або натрію сульфату *E. coli* розвивається в присутності 10 мкг / мл стрептоміцину. Є два пояснення цьому факту: в присутності натрію хлориду зменшується швидкість і ступінь дифузії стрептоміцину або натрію хлорид знижує адсорбцію антибіотика бактеріальною клітиною. При концентрації піровиноградної, фумарової кислот до 1% продуцент розвивається в присутності 10 мкг / мл стрептоміцину, якщо концентрацію солей підвищити до 3%, зростання бактерій спостерігається при концентрації антибіотика 150 мкг / мл. Захисні властивості, цих кислот по-різному проявляються по відношенню до різних

мікроорганізмів. Відносно *E. coli* захисні властивості проявляються в більшій мірі, щодо *Staph. aureus* захисних властивостей не спостерігається. Сильно знижується активність в присутності цистеїну і гідроксиламіну (цистеїн повністю інактивує антибіотик протягом декількох годин).

При розвитку продуцента розрізняють дві основні стадії. На першій стадії йде швидкий ріст і розвиток мікроорганізму з енергійним використанням основних компонентів субстрату, максимальне споживання кисню. У цитоплазмі високий вміст РНК, ДНК спочатку відсутня і виявляється тільки через 12 год розвитку. У середовищі відбувається деяке збільшення амонійного азоту, пов'язане з розкладанням білків соєвого борошна. рН спочатку дещо знижується, потім підвищується з 6,8 до 7,9. Освіта стрептоміцину незначне.

Через 28 год маса міцелію припиняє збільшуватися, починається друга стадія - процес освіти стрептоміцину. На третю добу рН з 7,9 падає до 6,7, а на четверту і п'яту - зростає до 7,7. Друга стадія характеризується повільним споживанням залишилися в середовищі поживних речовин, уповільненням зростання актиномицета, зниженням споживання кисню, автолізом міцелію, максимальним освітою стрептоміцину. Максимальне накопичення стрептоміцину спостерігається, коли автолітичні процеси починають переважати над процесами зростання. Єство амонійного азоту продовжує зростати, що, цілком ймовірно, пов'язано з розкладанням білків соєвого борошна і автолізом міцелію. У культуральній рідині знаходяться мінеральні речовини, білки, нуклеїнові кислоти, амінокислоти, полісахариди, жири, стрептоміцин і інші речовини.

S. griseus при певних умовах розвитку культури утворює ще один антибіотик - маннозідострептоміцин (стрептоміцин В), в чистому вигляді виділений в 1947 р з культури актиномицета методом противоточної хроматографії. Маннозідострептоміцин відрізняється від стрептоміцину наявністю в молекулі манози, він менш активний, ніж стрептоміцин. Культури *S. griseus* містять фермент, що перетворює маннозідострептоміцин в стрептоміцин. При відповідному контролі розвитку культури актиномицета можна домогтися мінімального освіти маннозідострептоміцину.

Основна частина стрептоміцину виділяється в культуральне середовище, але частина його залишається в міцелії і на його поверхні, з метою вилучення стрептоміцину з мікроорганізму культуральну рідину разом з біомасою обробляють мінеральною кислотою, при цьому весь антибіотик переходить в розчин. Міцелій відділяють пресуванням або центрифугуванням, вільну від міцелію культуральну рідину обробляють щавлевою кислотою - цим досягається видалення білків і органічних підстав, іонів металів (кальцію, магнію, заліза), далі ведеться виділення стрептоміцину в чистому вигляді.

Стрептоміцин - сильно полярне з'єднання і його підставу і солі неорганічних кислот добре розчинні у воді. Солі ж органічних кислот стрептоміцину нерозчинні майже у всіх органічних розчинниках. Для виділення стрептоміцину з культуральної рідини в чистому вигляді використовуються методи адсорбції на активованому вугіллі і метод іонообмінної хроматографії.

В основу першого методу покладена адсорбція стрептоміцину на активованому вугіллі при нейтральному або слабо лужному рН середовища. При рН 2-4 стрептоміцин залишається в розчині, в той час як домішки адсорбуються на сорбент. Після видалення домішок на активоване вугілля адсорбує з підлуженою середовища антибіотик, його десорбції здійснюють етанолом, підкисленим кислотою соляної, далі в розчин додається діетиловий ефір - стрептоміцин випадає в осад.

Стабільність стрептоміцину має значення для виробництва і зберігання антибіотика. Вона залежить від чистоти препарату, вологості, температури, рН розчинника. Хімічно чистий стрептоміцин стійкий в сухому стані і у вигляді розчинів. Солі стрептоміцину при зберіганні при кімнатній температурі інактивуються лише в незначній мірі протягом декількох років. Максимальна стабільність розчинів стрептоміцину сульфату і гідрохлориду знаходиться при рН від 3,0 до 7,0 при температурі від 7 до 25 ° С.

По відношенню до стрептоміцину мікроорганізми умовно діляться на 3 групи:

1. Чутливі, зростання яких пригнічується при концентрації стрептоміцину 10 мкг / мл, це пологи *Bacillus*, *Bordetella*, *Brucella*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus* і деякі інші.

2. Помірно чутливі, для придушення яких *in vitro* необхідна концентрація антибіотика від 10 до 100 мкг / мл, сюди відносять багато бактерії з родів *Enterobacter*, *Corinebacterium*, *Diplococcus*, *Proteus*, *Streptococcus*, *Vibrio*.

3. Стійкі, для придушення яких необхідна концентрація стрептоміцину, що перевищує 100 мкг / мл. До цієї групи відносять пологи *Bacteroides*, *Clostridium*, деякі види *Proteus*, багато видів грибів, дріжджів, рикетсії, віруси.

До стрептоміцину легко виникає вторинна резистентність. Підвищення стійкості до нього в 1000 разів виникає у золотистого стафілокока всього лише через три пасажу на бульйоні з зростаючими концентраціями антибіотика, а у *Salmonella typhi* підвищення стійкості після 14 пасажів спостерігається в 22600 разів.

При лікуванні стрептоміцином необхідно враховувати його побічні ефекти, можуть з'явитися глухота, вестибулярні та інші порушення функцій. Їх розвиток визначається тривалістю періоду лікування, дозою антибіотика,

методами введення, ступенем очищення. Токсичність менш очищених препаратів стрептоміцину першого періоду отримання і застосування стрептоміцину була вищою, що пов'язано з наявністю в препаратах гістаміноподібну речовин, які самі досить токсичні.

Граміцидин С. Продуцент *Bacillus brevis* здатний синтезувати поліпептидні антибіотики, до числа яких відносять граміцидини А, В, СD, D, С. Останній іноді позначають як граміцидин S (радянський граміцидин). Всі вони відрізняються як за амінокислотним складом, так і по просторовій структурі молекули. Для виробництва граміцидина С (S) запропоновані середовища на основі м'ясного і дріжджового гідролізату, що містять збалансований набір мінеральних і органічних солей.

У процесі культивування необхідно підібрати збалансоване поєднання інтенсивності аерації середовища (від 0,38 до 4,31 г О₂ л / ч) концентрації входять до неї речовин, температура культивування - 40 ° С. Розвиток продуцента і синтез антибіотика може йти і при температурі 28 ° С, але в цьому випадку максимальний біосинтез антибіотика спостерігається в перші 24 год, в той час, як при температурі 40 ° С - між 24 і 48 год.

При виділенні граміцидина з культуральну рідину подкисляють кислотою соляної до рН 4,5-5,0. В осад випадає діхлоргідрат граміцидина з разом з бактеріальними клітинами продуцента, з осаду антибіотик екстрагують етанолом. Концентрат, що містить 4% граміцидину, використовується в медичній практиці.

Неоміцин. У 1949 р. З. Ваксман і Ж. Лешевальє з культури *Streptomyces fradiae* виділили неоміцин. Надалі було встановлено, що це комплекс, що складається з семи антибіотиків аміноглікозидного будови.

На синтетичному середовищі актиноміцет розвивається краще, ніж на середовищі з соєвим борошном, але біосинтез неоміцина на синтетичному середовищі пошта в 8 разів нижче, ніж на натуральному середовищі невизначеного складу. Деякі речовини сприяють підвищенню виходу неоміцина на 50%, до них відносяться ауксини, α -нафтілукусусная кислота. Найбільш ефективна доза ауксинов - сім частин на мільйон, внесена в середу перед стерилізацією. Стимулюючий ефект ауксинов проявляється при тривалості процесу 138-162 ч, в ранні терміни розвитку культури ефект відсутній.

У процесі освіти антибіотика істотну роль грає цинк. Ступінь аерації культури повинна бути трохи нижче, ніж при виробленні стрептоміцину.

Неоміцин - підстави, добре розчинні у воді і нерозчинні в органічних розчинниках, найбільша їх антибіотична активність проявляється в лужному середовищі. Неоміцинової комплекс не втрачає антимікробних властивостей при тривалому зберіганні (до 2-х років) як у вигляді розчинів, так і в твердому стані.

Методична розробка практичного заняття, ОПП «Фармація, промислова фармація», для докторів філософії III освітньо-наукового рівня, фармацевтичний факультет, Дисципліна: «Фармацевтична біотехнологія» стр. 7

Антимікробний спектр подібний зі спектром стрептоміцину, але неоміцин пригнічує розвиток стійких до стрептоміцину штамів *Mycobacterium tuberculosis*. Він малоактивний відносно більшості видів *Clostridium*, *Streptococcus*, грибів, а також проти вірусів і протозоа.

Чутливі до неоміцину мікроорганізми набувають стійкості до нього в меншій мірі, ніж до стрептоміцину. При використанні неоміцину слід враховувати його токсичність. Для людини неоміцин більш токсичний, ніж стрептоміцин. Ступінь токсичності коливається в залежності від складу неоміцинової комплексу і чистоти препарату.

Питання для самоконтролю

1. Антибіотики як біотехнологічні продукти. Біологіческая роль антибіотиків як вторинних метаболітів.
2. Продуценти антибіотиків, їх характеристика. Особливості будови клітин і циклу розвитку при ферментації.
3. Методи скринінгу продуцентів.
4. Шляхи створення високоактивних продуцентів антибіотиків.
5. Методи збереження штамів суперпродуцентів антибіотиків.
6. Механізми захисту від власних антибіотиків у їх "суперпродуцентів".
7. Біосинтез антибіотиків: Мультиферментний комплекси, збірка вуглецевого скелета молекул антибіотиків, що належать до бета-лактамів.
8. Біосинтез антибіотиків: аміноглікозидів, тетрацикліну, макролідів.
9. Загальні закономірності ферментаційного процесу біосинтезу антибіотиків.

Орієнтовні завдання для опрацювання теоретичного матеріалу

1. Скласти словник основних понять з теми
2. Заповнити орієнтувальну картку для самостійної підготовки

студента з використанням літератури з теми:

Основні завдання	Вказівки	Відповіді
1	2	3
Фармацевтична біотехнологія рослин. Культивування клітин та тканин рослин. Отримання біологічно активних сполук з використанням культур рослинних клітин.	Розкрити питання	Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ / Ю.М. Краснопольский, Н.Ф. Клещев – Харьков: НТУ «ХПИ», Ч.1.2012. – 304с. С. 63

II. Практичні роботи (завдання), які виконуватимуться на занятті

III. Тестові завдання для самоконтролю

Основна перевага напівсинтетичних похідних еритроміцину -азітро-, роксітро-, кларітро-мицин перед природним антибіотиком обумовлено:

- А) меншою токсичністю;
- Б) бактерицидністю;
- В) активністю проти внутрішньоклітинно локалізованих паразитів;
- Г) дією на гриби.

2. Антибіотики з самопромотірованим проникненням в клітку патогена:

- А) бета-лактами;
- Б) аміноглікозиди;
- В) макроліди;
- Г) глікопептиди

3. Захист продуцентів аміноглікозидів від власного антибіотика:

- А) низька спорідненість рибосом;
- Б) активний викид;
- В) тимчасова ферментативна інактивація;
- Г) компартментація.

4. Успіхи генетичної інженерії в області створення рекомбінантних білків більше, ніж у створенні рекомбінантних антибіотиків, що пояснюється:

- А) більш простою структурою білків;
- Б) труднощами підбору клітин господарів для біосинтезу антибіотиків;
- В) великою кількістю структурних генів, включених в біосинтез антибіотиків;
- Г) проблемами безпеки виробничого процесу.

5. Біосинтез антибіотиків, які використовуються як лікарські речовини, посилюється і настає раніше на середовищах:

- А) багатих джерелами азоту;
- Б) багатих джерелами вуглецю;
- В) багатих джерелами фосфору;
- Г) бідних поживними речовинами.

6. Боротьба з фаговою інфекцією в цехах ферментації антибиотической промисловості найбільш раціональна шляхом:

- А) посилення контролю за стерилізацією технологічного повітря;
- Б) посилити контроль за стерилізацією живильного середовища;
- В) отримання і використання фагоустойчивих штамів біооб'єкту;
- Г) посилити контроль за стерилізацією обладнання

7. Причини високої ефективності антибіотичних препаратів «уназин» і «АУГМЕНТИН» полягають:

- А) в невисокій токсичності (у порівнянні з ампіциліном та амоксаціліном);
- Б) в невисокій вартості;

- В) в дії на резистентні до бета-лактамів штами бактерій;
Г) в пролонгації ефекту.
8. Яка властивість нового беталактамого антибіотика найцінніше при лікуванні бактеріальних ускладнень у хворих з ВІЛ-інфекцією?
А) стійкість до беталактамаз;
Б) слабка токсичність;
В) зв'язування з ПСБ 2;
Г) пролонгована циркуляція.
9. Антибіотикотолерантність патогена обумовлена:
А) руйнуванням антибіотика;
Б) активним викидом;
В) низьким вмістом автолізину;
Г) відсутністю мішені для антибіотика
10. Конкретний характер залежності між кількістю застосовуваних антибіотиків і появою бета-лактамаз:
А) прямий
Б) непрямий
В) зворотний
Г) не має значення
д) непрямий

IV. Індивідуальні завдання для студентів з теми заняття

Підготувати презентації із тем:

1. Основні класи антибіотиків нових поколінь в залежності від хімічної природи.
2. Класифікація антибіотиків за механізмом дії.
3. Технології виробництва антибіотиків.
4. Основні шляхи пошуку антибіотиків нових поколінь.
5. Біотехнологія промислового отримання антибіотика.
6. Характеристика вторинних метаболітів.

6. Рекомендована література:

Основна

1. Краснопольский Ю.М., Звягинцева О.В. Фармацевтическая биотехнология. Аспекты фармацевтической химии. Ю.М. Краснопольский, О.В. Звягинцева. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2018. – 248 с.
2. S. Spada. G. Walsh Directory of Approved Biopharmaceutical Products 1st Edition . – CRC Press, 2019. – 336 p.
3. С. Kokare PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY 1st Edition. – Nirali Prakashan, 2017. – 274.
4. Лихач А. В. Промислова біотехнологія / А. В. Лихач. – МНАУ. – 2016. – 116 с.

Методична розробка практичного заняття, ОПП «Фармація, промислова фармація», для докторів філософії III освітньо-наукового рівня, фармацевтичний факультет, Дисципліна: «Фармацевтична біотехнологія» стр. 10

5. Краснопольский Ю.М., Звягинцева О.В. Фармацевтическая биотехнология. Аспекты фармацевтической химии. Ю.М. Краснопольский, О.В. Звягинцева. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2018. – 248 с.
6. Державна фармакопея України : в 3 т. / ДП “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”. –2-е вид. –Харків : Державне підприємство “ Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів ”, 2015. –Т.1.