



АКАДЕМИЯ
ПОСТДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ФГБУ ФНКЦ ФМБА РОССИИ

Кафедра клинической лабораторной
диагностики и патологической анатомии с
курсом лабораторной микробиологии

Основы медицинской биотехнологии и генетической инженерии

Миронов Андрей Юрьевич, профессор, д.м.н., доцент

Версия 2024г., г.Москва

Биотехнология (от греч. *bios* - жизнь, *tesen* - искусство, *logos* - наука) представляет собой область знаний, которая возникла и оформилась на стыке микробиологии, молекулярной биологии, генетической инженерии, иммунологии, химической технологии, ряда других наук. Рождение биотехнологии обусловлено потребностями общества в **новых, более дешевых продуктах для народного хозяйства, в том числе для медицины и ветеринарии, а также принципиально новых технологиях.**

Цель биотехнологии

- получение продуктов из биологических объектов;
- получение продуктов с применением биологических объектов;
- воспроизведение биологических эффектов, не встречающихся в природе.

В качестве биологических объектов чаще всего используются одноклеточные микроорганизмы, животные и растительные клетки, а также организм животных, человека, растений.

Почему клетки?

- Клетки являются «биофабриками», вырабатывающими в процессе жизнедеятельности разнообразные ценные продукты: белки, жиры, углеводы, витамины, аминокислоты, антибиотики, гормоны, антитела, антигены, ферменты, спирты и т. д. Многие из этих продуктов, крайне необходимых в жизни человека, недоступны для получения «небиотехнологическими» способами.
- Клетки быстро воспроизводятся. Бактериальная клетка, делится через каждые 20-60 мин, дрожжевая - через 1,5-2 ч, животная - через 24 ч, что позволяет за короткое время нарастить на дешёвых и недефицитных питательных средах в промышленных масштабах огромные количества биомассы микробных, животных, растительных клеток.
- Биосинтез сложных веществ (белки, антибиотики, антигены, антитела и др.) экономичнее и технологически доступнее, чем химический синтез. Сырьё для биосинтеза проще, дешевле и доступнее, чем сырьё для других видов синтеза. Используются отходы сельскохозяйственной, рыбной продукции, пищевой промышленности, растительное сырьё, например рыбная мука, меласса, дрожжи, древесина и др.
- Возможность проведения биотехнологического процесса в промышленных масштабах, т. е. наличие соответствующего технологического оборудования, доступность сырья, технология переработки и т. д.

Биотехнология использует продукты клеток:

- **Клетки** как источник целевого продукта;
- **Макромолекулы**, которые синтезируются клетками в процессе выращивания: ферменты, токсины, антигены, антитела, пептидогликаны и др.;
- **Первичные метаболиты** - низкомолекулярные вещества (мол. масса менее 1500 Да), необходимые для роста клеток (аминокислоты, витамины, нуклеотиды, органические кислоты и др.);
- **Вторичные метаболиты** (идиолиты) - низкомолекулярные и макромолекулярные соединения, не требующиеся для роста клеток: антибиотики, алкалоиды, токсины, гормоны и др.

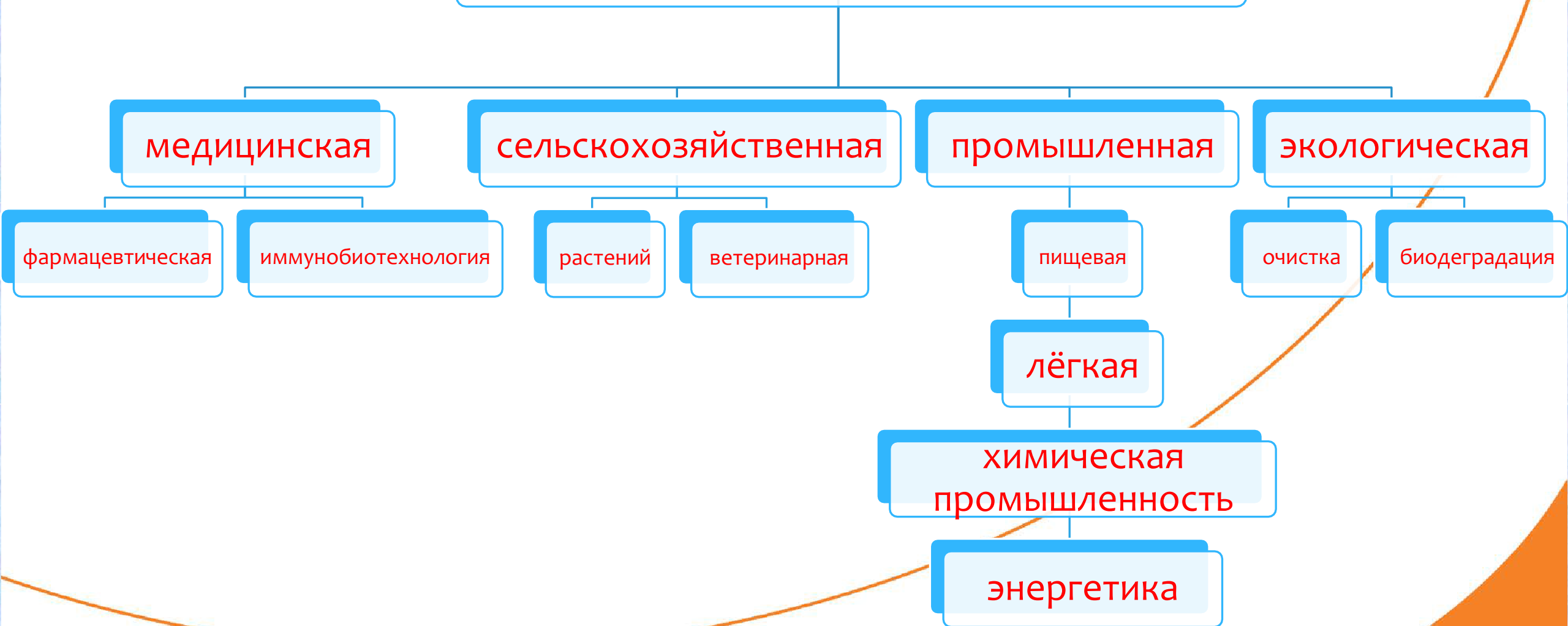
Биотехнология - наука, которая на основе изучения процессов жизнедеятельности живых организмов, главным образом микроорганизмов, животных и растительных клеток, использует эти биологические процессы, а также сами биологические объекты для промышленного производства продуктов, необходимых для жизни человека или воспроизведения биологических эффектов, не проявляющихся в естественных условиях.

Приоритетные направления биотехнологии

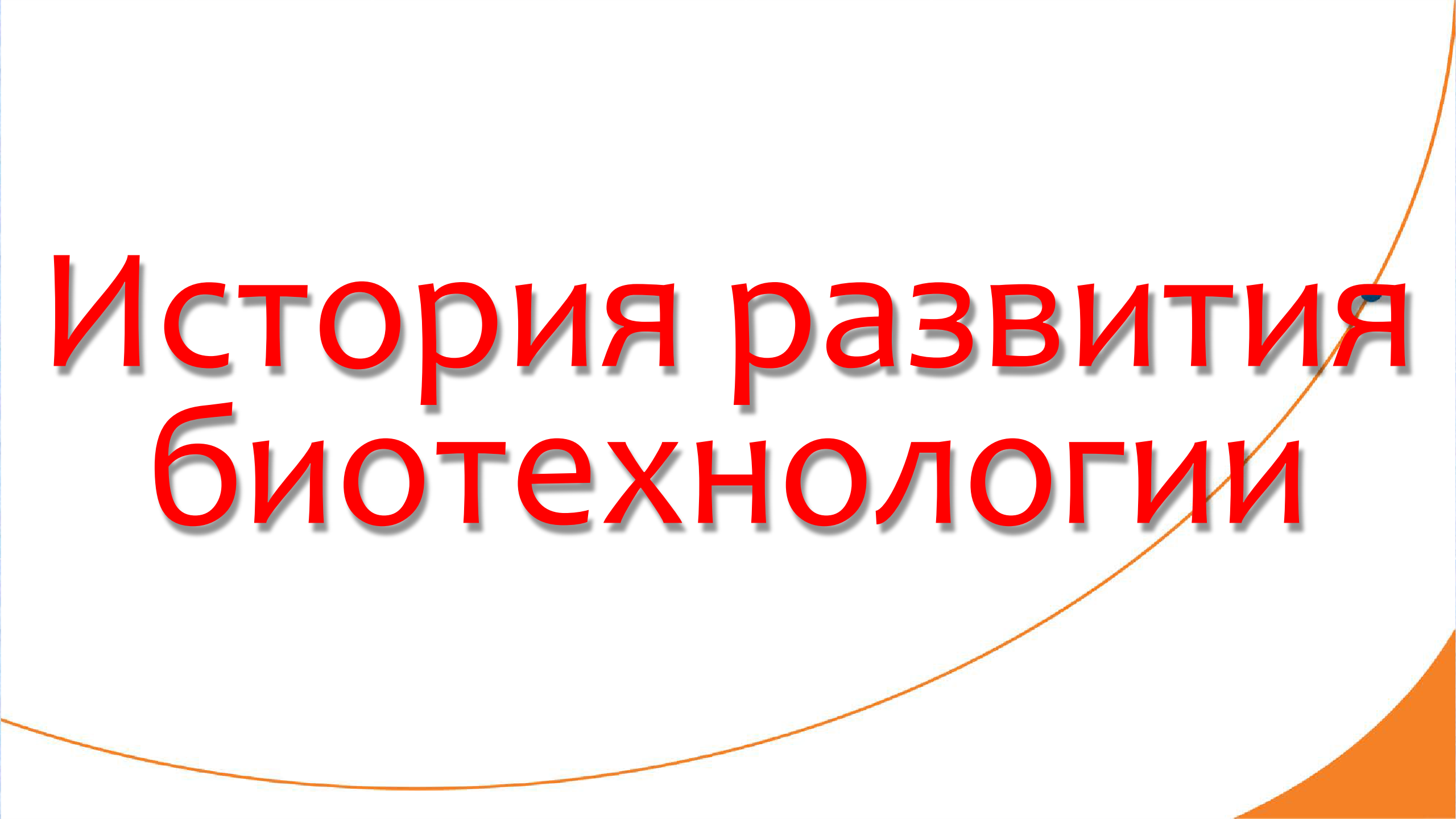
- медико-фармацевтическое;
 - продовольственное;
 - сельскохозяйственное;
 - экологическое.
- 
- A decorative orange curve starts from the bottom left, rises towards the top right, and then curves back down towards the bottom right corner, where it meets a solid orange shape.

Структура биотехнологии

Биотехнология



История развития биотехнологии

A decorative orange curved line starts from the bottom left, arcs upwards and to the right, and then curves downwards towards the bottom right corner. A solid orange shape is located in the bottom right corner.

Развитие биотехнологии

Старая биотехнология

Новая биотехнология

Эмпирический этап

Научный этап

Молекулярно-
генетический
этап

7-6 тыс. лет до н. э.

70-е годы XIX века

70-е годы XX века

Эмпирический этап

Старая биотехнология возникла в древности, примерно 6000-5000 лет до н. э., когда люди научились выпекать хлеб, варить пиво, готовить сыр, кисломолочные продукты, вино. Этот этап биотехнологии был сугубо эмпирический и продолжал оставаться таким, несмотря на совершенствование технологических процессов и расширение сфер использования биотехнологических приёмов.

Научный этап

Открытие Луи Пастером в XIX в. ферментативной природы брожения - научный этап традиционной биотехнологии. В этот период получены и выделены ферменты, открыты многие микроорганизмы; разработаны способы их выращивания и получения в массовых количествах; получены культуры животных и растительных клеток и разработаны способы искусственного культивирования; в результате изучения физиологии, биохимии, генетики микробных и животных клеток намечены пути получения многих продуктов микробиологического синтеза, необходимых для медицины, сельского хозяйства, промышленности.



Луи Пастер
1822-1895

Открытия Луи Пастера как источник формирования наук

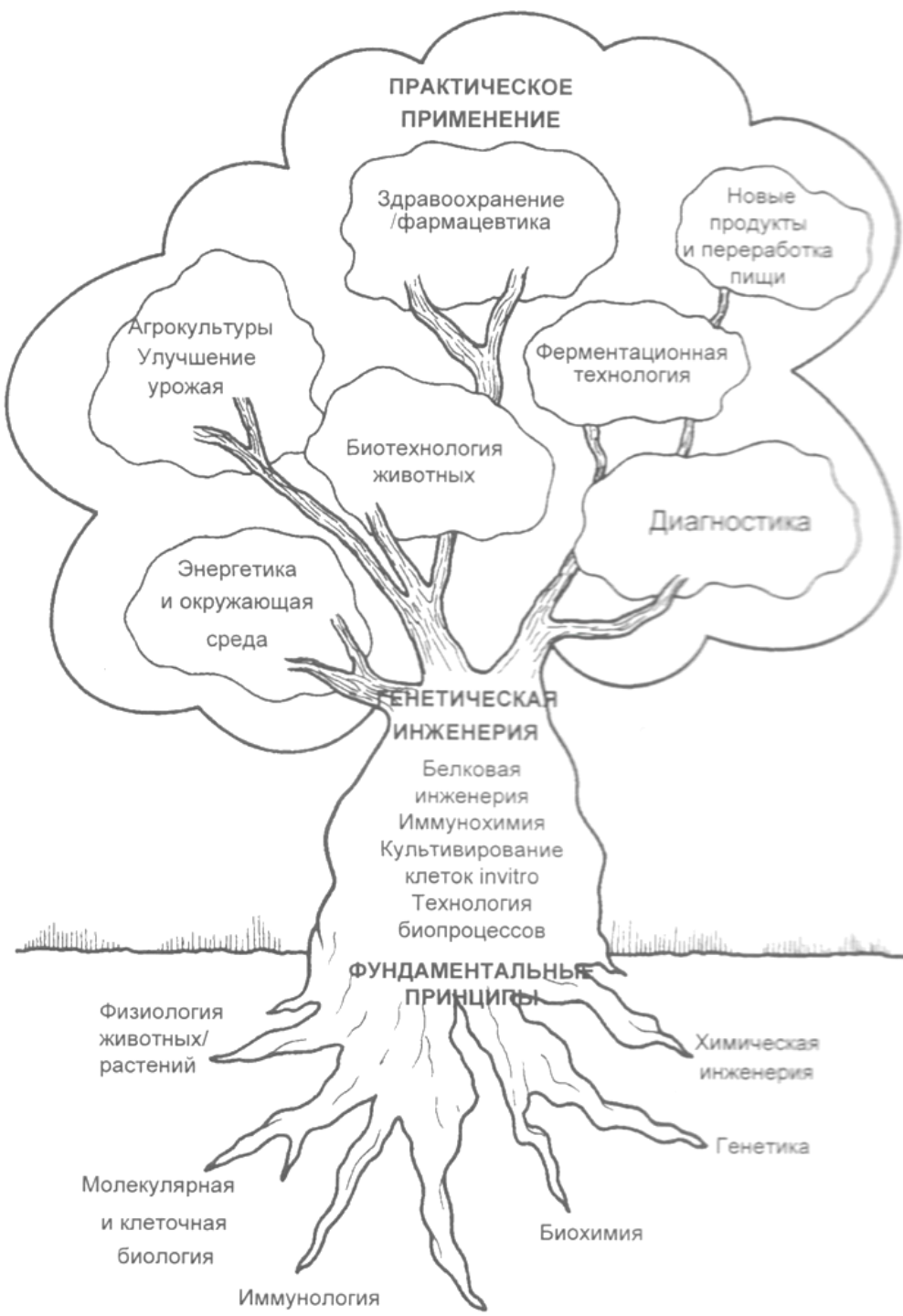
Открытия	Науки
Опровержение самозарождения	Происхождение жизни. Гнотобиология
Стереоизомерия	Стереохимия
Анаэробизм	Учение об анаэробах
Микробы – возбудители болезней	Микробиология. Инфектология
Болезни пива и вина	Асептика. Антисептика. Дезинфектология
Брожение	Биотехнология
Принцип вакцинации	Иммунология
Способ приготовления вакцин	Иммунобиотехнология

Новая биотехнология

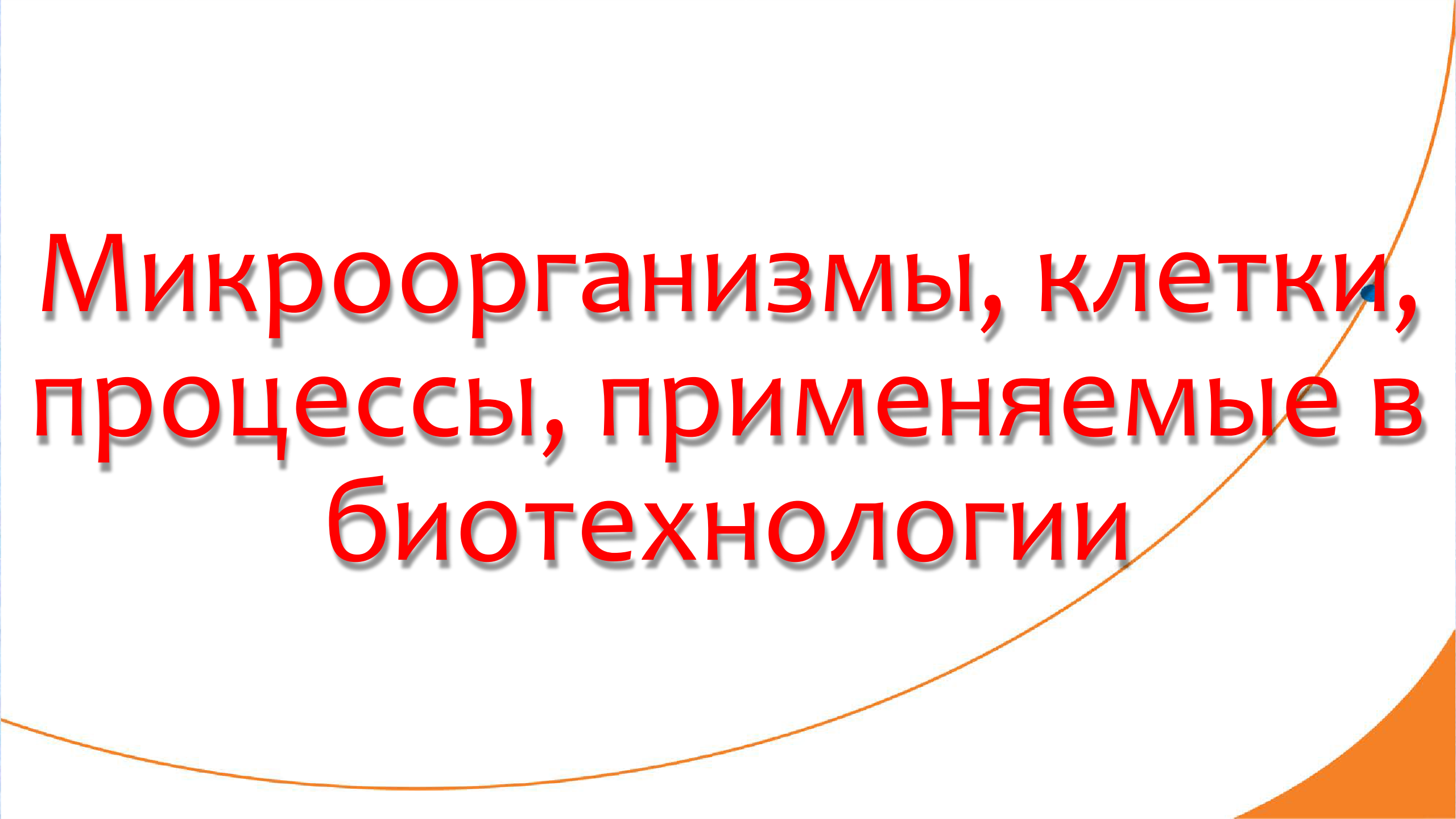
На смену старой, традиционной биотехнологии пришла новая биотехнология, основанная на применении искусственно получаемых штаммов-суперпродуцентов бактерий, клеток животных и растений, на использовании иммобилизованных ферментов, применении культур животных и растительных клеток, широком использовании генно-инженерных работ для получения клеток-рекомбинантов, моноклональных антител и других биологически активных веществ.

Рождение новой биотехнологии обусловлено рядом принципиальных открытий и достижений в науке, таких как доказательство двухнитевой структуры ДНК, расшифровка генетического кода и доказательство его универсальности для человека, животных, растений, бактерий и т. д.; искусственный синтез биологически активных веществ, открытие ферментов обмена нуклеиновых кислот, получение рекомбинантных ДНК, рекомбинантных вирусов, бактерий, способных синтезировать несвойственные им продукты; искусственный синтез генов и их экспрессия в биологических объектах; получение трансгенных животных и растений, генодиагностика и генотерапия и др.

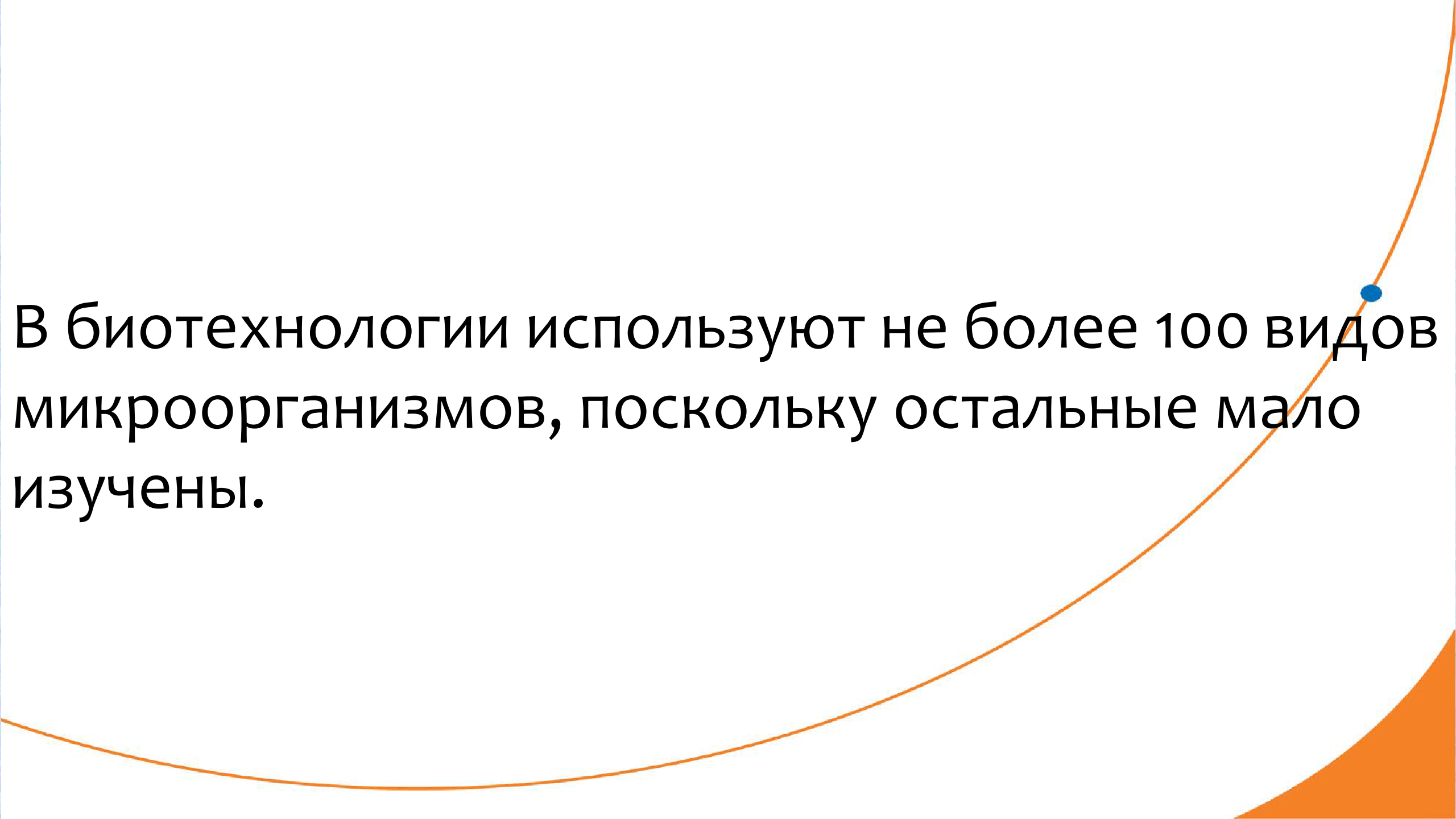
Древо биотехнологии



Микроорганизмы, клетки, процессы, применяемые в биотехнологии



В биотехнологии используют не более 100 видов микроорганизмов, поскольку остальные мало изучены.

A decorative orange curve starts from the bottom left, rises towards the right, and then curves upwards and to the right, ending near the top right corner. A small blue dot is placed on this curve, just above the end of the text.

Из грибов в биотехнологии для получения разнообразных антибиотиков применяют род *Streptomices*, *Penicilium chrysogenum*, *Cefalosporum acremonium*, *Streptomyces spp.* и др. Дрожжи используют в хлебопечении, пивоварении, виноделии, получении соков, кормового белка, питательных сред для выращивания бактерий и культур животных клеток.

Из бактерий в биотехнологии чаще всего используются: род *Acetobacter* - для превращение этанола в уксусную кислоту, в углекислый газ и воду; род *Bacillus* - для получения ферментов (*B. subtilis*), средств защиты растений (*B. thuringiensis*); род *Clostridium* - для сбраживания сахаров в ацетон, этанол, бутанол; молочнокислые бактерии (*Lactobacillus* и др.); псевдомонады (*P. denitrificans*) - для получения витамина B₁₂; *Corinebacterium gentamicum* - для получения аминокислот, и др.

Многие бактерии, дрожжи, вирусы используются в качестве реципиентов чужеродного генетического материала для получения рекомбинантных штаммов - продуцентов биотехнологической продукции. Получены рекомбинантные штаммы *E. coli*, продуцирующие интерфероны, инсулин, гормоны роста, разнообразные антигены; штаммы *B. subtilis*, вырабатывающие интерферон; дрожжи, продуцирующие интерлейкины, антигены вируса гепатита В, рекомбинантные вирусы осповакцины, синтезирующие антигены вируса гепатита В, вируса клещевого энцефалита - ВИЧ и другие антигены.

Широкое применение в получении диагностикумов, вакцин, иммуноглобулинов, пробиотиков, фагов, других микробных препаратов находят патогенные и вакцинные штаммы болезнетворных микробов, а также условно-патогенные микроорганизмы.

Широкое применение в биотехнологии нашли культуры животных и растительных клеток. Строение, физиология, биохимия животных и растительных клеток более сложны, чем бактерий. Хотя из животных и растительных клеток можно извлекать более широкий ассортимент сложных и ценных веществ, однако их трудно культивировать. Из культур клеток растений, так же как и из растений, можно получать разнообразные соединения, используемые в медицине (алкалоиды, противовоспалительные вещества, противолейкозные и противоопухолевые, противобактериальные, сердечные и мочегонные средства, ферменты, опиаты, витамины и др.), в сельском хозяйстве, в химической и других отраслях промышленности. Разработано и освоено в крупномасштабном производстве выращивание клеток женьшеня, обладающего биологическим действием, присущим природному женьшеню.

Животные клетки используют для получения продукции, синтезируемой клетками, и для культивирования вирусов с целью получения из них вакцин и диагностических препаратов. Для этого используют перевиваемые и первично-трипсинизированные клетки человека и животных, полученные из различных нормальных органов (лёгких, кожи, почки, костного мозга, соединительной ткани) или опухолевых тканей. Штаммы животных и растительных клеток поддерживаются в специальных сложных условиях (замороженные в жидком азоте) и как можно реже подвергаются пересевам, так как они могут претерпевать генетические изменения.

Типы культур клеток

- 
- A microscopic image showing a dense culture of cells. The cells are mostly rounded and have a yellowish, granular appearance. They are arranged in clusters and are separated by a network of red, fibrous structures, likely representing the extracellular matrix or a feeder layer of cells. The overall texture is somewhat irregular and porous.
- первично-трипсинизированные
 - диплоидные (полуперевиваемые)
 - гетероплоидные (перевиваемые)

Принципы промышленного производства в биотехнологии:

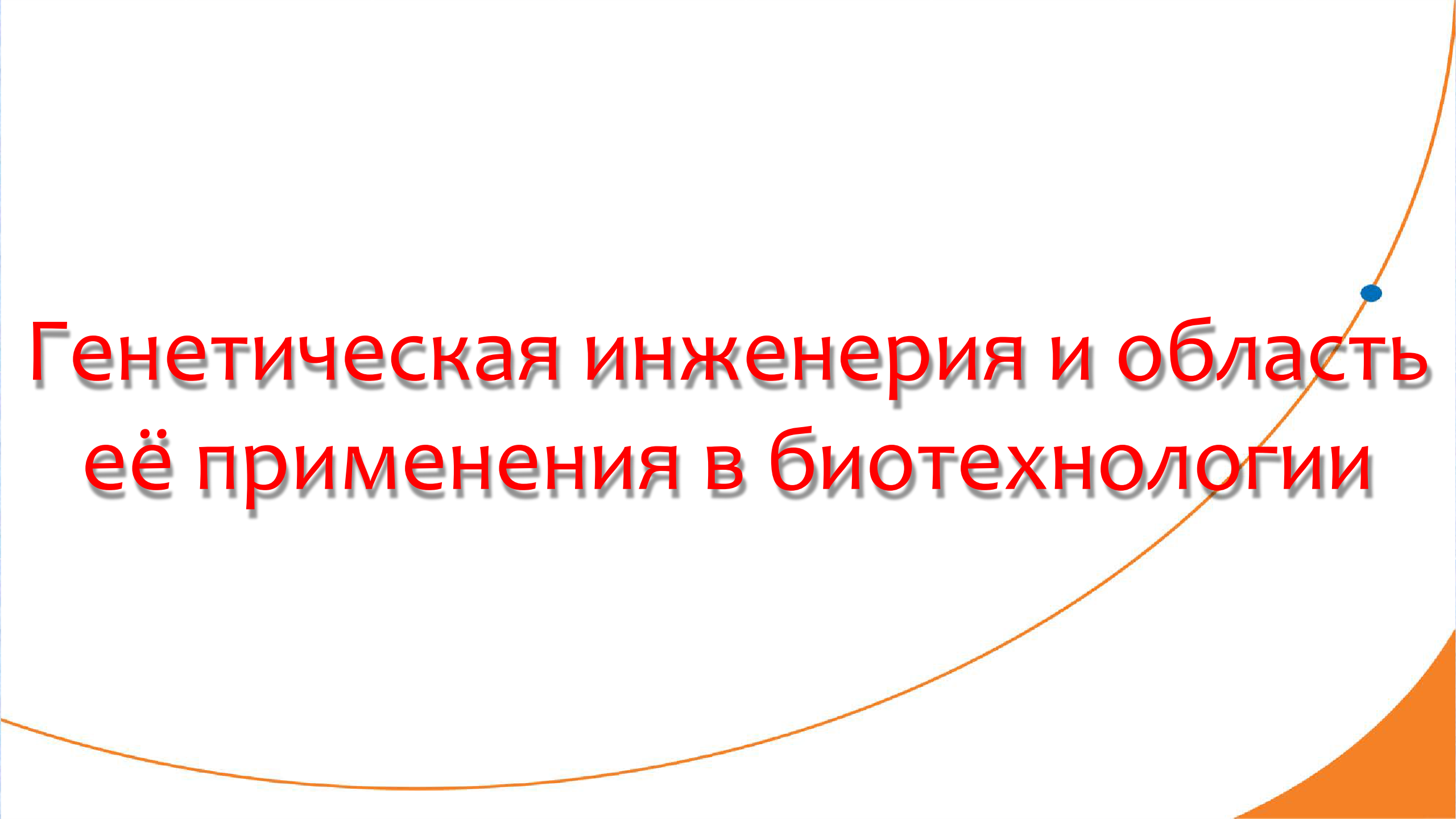
1. брожение (ферментация);
2. биоконверсия (превращении одного вещества в другое);
3. культивирование растительных и животных клеток, бактерий и вирусов;
4. генетические манипуляции, в том числе генно-инженерные процедуры.

Технология получения продуктов микробного и клеточного синтеза

- выбор продуктивного штамма;
- подбор оптимальной для роста экономичной питательной среды;
- культивирование;
- выделение целевого продукта;
- стандартизация целевого продукта;
- придание готовой лекарственной формы препарату.



Генетическая инженерия и область её применения в биотехнологии

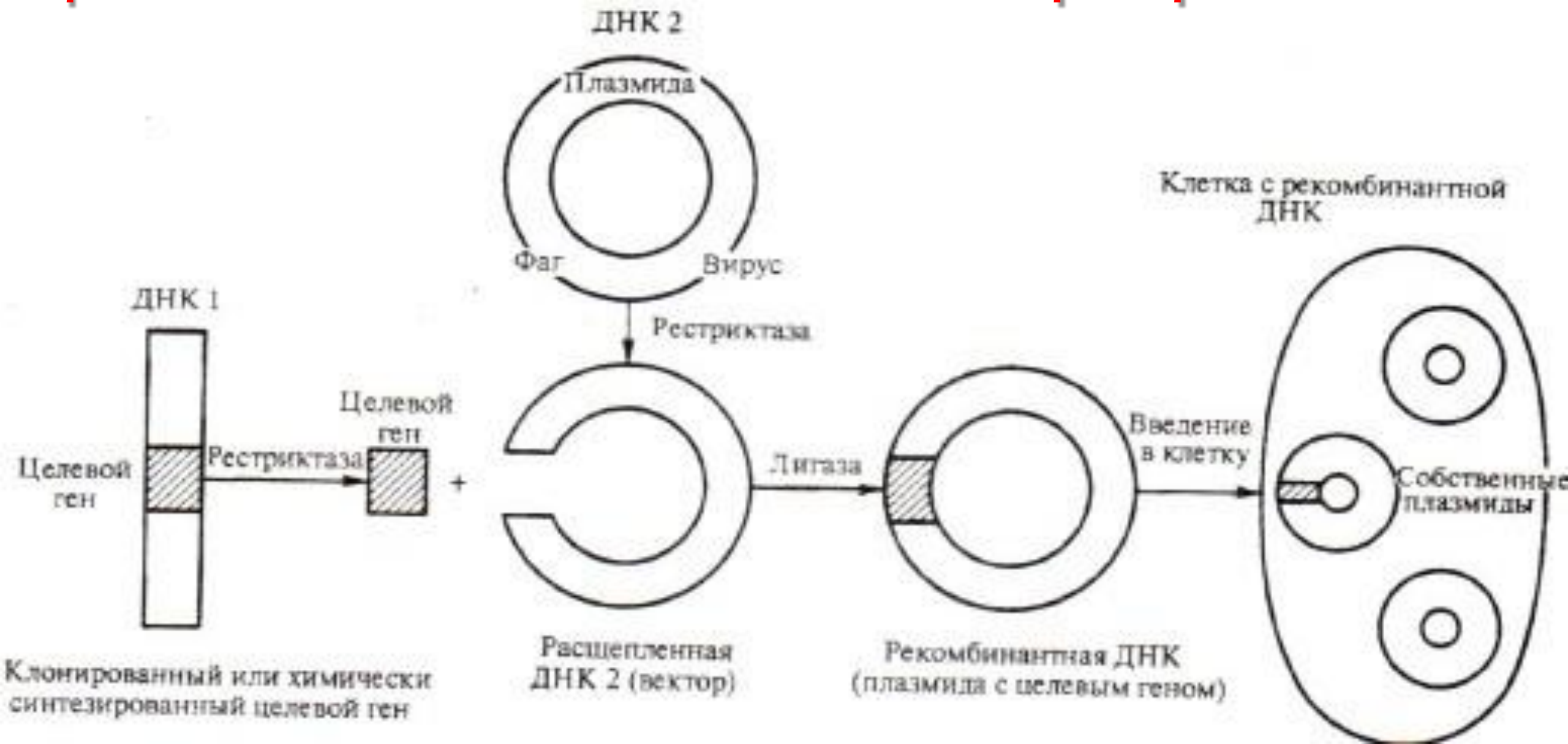
A decorative orange curved line starts from the bottom left, curves upwards and to the right, ending near the top right corner. A small blue dot is located on this line, positioned above the word "область" in the title.

Генетическая инженерия является сердцевиной биотехнологии. Она сводится к генетической рекомбинации, т. е. обмену генами между двумя хромосомами, которая ведёт к возникновению клеток или организмов с двумя и более наследственными детерминантами (генами), по которым родители различались между собой.

Сущность метода генетической инженерии (рекомбинации *in vitro*)

- выделение или синтез ДНК из отличающихся друг от друга организмов или клеток;
- получение гибридных молекул ДНК;
- введение рекомбинатных (гибридных) молекул в живые клетки;
- создание условий для экспрессии и секреции продуктов, кодируемых генами.

Получение рекомбинантных молекул ДНК и рекомбинантных штаммов микроорганизмов



Гены, кодирующие те или иные структуры, или выделяют (**клонировать**) как таковые (**хромосомы, плазмиды**), или прицельно выщепляют из этих генетических образований с помощью ферментов рестрикции. Набор этих ферментов (**их известно более тысячи**) способны резать ДНК по многим определённым связям, что является важным инструментом генной инженерии.

Небольшие гены могут быть получены с помощью химического синтеза. Вначале расшифровывают число и последовательность аминокислот в белковой молекуле вещества. По этим данным узнают очередность нуклеотидов в гене, поскольку каждой аминокислоте соответствуют три нуклеотида (**кодон**). С помощью синтезатора создают химическим путём ген, аналогичный природному гену.

Полученный одним из способов целевой ген с помощью ферментов лигаз сшивают с другим геном, который используется в качестве вектора, для встраивания гибридного гена в клетку. Вектором служат плазмиды, бактериофаги, вирусы человека, животных и растений.

Для РНК-вирусов передача генетической информации возможна с помощью обратной транскриптазы, которая передает информацию о структуре белка от РНК к ДНК, которая является комплементарной информационной РНК.

Экспрессируемый ген в виде рекомбинантной ДНК (**плазмида, фаг, вирусная ДНК**) встраивается в бактериальную или животную клетку, которая приобретает новое свойство - продуцировать несвойственное этой клетке вещество, кодируемое экспрессируемым геном.

В качестве реципиентов экспрессируемого гена чаще всего используют *E. coli*, *B. subtilis*, псевдомонады, дрожжи, вирусы. Некоторые штаммы рекомбинантных бактерий способны переключать на синтез чужеродного вещества, экспрессируемого геном, до 50% своей синтетической возможности. Такие штаммы-суперпродуценты целевых продуктов получены и применяются в биотехнологической промышленности (штаммы-суперпродуценты триптофана, интерферона и др.).

Критерии подбора реципиента

- возможность встройки чужеродного гена,
- уровень выраженности (экспрессии) синтеза вещества, кодируемого геном,
- возможность секреции вещества в окружающую среду,
- лёгкость и доступность массового культивирования,
- экологическая безопасность.

Некоторые штаммы микроорганизмов хорошо экспрессируют чужеродные гены, но плохо секретируют продукт в окружающую среду. В таких случаях приходится прибегать к дезинтеграции клетки с целью высвобождения из неё синтезированного продукта. Иногда, несмотря на наличие экспрессии и секреции продукта клеткой, его не удастся собрать, из-за разрушения в процессе синтеза или после него протеазами и другими ингибиторами. В некоторых случаях с целью повышения уровня секреции целевого белка к гену целевого белка присоединяют ген-индикатор, т. е. ген, кодирующий легко узнаваемый белок, в результате этой манипуляции получают химерный белок, а из него - целевой белок. В качестве индикатора может быть, например, β -галактозидаза, можно использовать ген интерферона и т. д.

Методом генетической инженерии созданы сотни препаратов медицинского и ветеринарного назначения, получены рекомбинантные штаммы-суперпродуценты, многие из которых нашли практическое применение. В медицине применяются полученные методом генетической инженерии вакцины против гепатита В, интерлейкины-1, -2, -3, -6 и др., инсулин, гормоны роста, интерфероны α , β , γ , фактор некроза опухоли, пептиды тимуса, миелопептиды, тканевой активатор плазминогена, эритропоэтин, антигены ВИЧ, фактор свертываемости крови, моноклональные антитела и многие антигены для диагностических целей. Разработаны и в ближайшие годы будут использованы в практике генно-инженерные вакцины против малярии, ВИЧ-инфекции, сифилиса, клещевого энцефалита, холеры, бруцеллёза, гриппа, бешенства и других инфекций; интерлейкины-6-18, пептиды тимуса, колониестимулирующие факторы, эпидермальный фактор роста, атриальный пептид, фактор тромбоцитов, рекомбинантные антигены многих бактерий и вирусов, нейропептиды и другие поведенческие пептиды, рецепторы клеток, ферменты, метаболиты, тканевые антигены, антигены опухолей и др.

Получение генно-инженерного инсулина человека



Генно-инженерные вакцины (рекомбинантные)

векторные вакцины, полученные генно-инженерным способом представляющие собой вакцинный штамм, несущий ген чужеродного антигена

Принцип получения – синтез протективных антигенов идентифицированным геном, встроенным в микроорганизм.

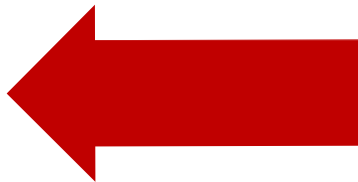
Получение рекомбинантных вакцин

Клонирование гена,
обеспечивающего
синтез необходимых
антигенов

Введение гена в вектор –
умеренный фаг λ или
вирус осповакцины
(гибрида)

Молекулярное клонирование
(избирательное накопление
молекул рекомбинантных
ДНК)

Введение векторов в
клетки-продуценты
(реципиенты):
B. subtilis, *E. coli*, дрожжей



Генно-инженерные вакцины (рекомбинантные)

Рекомбинантная дрожжевая живая вакцина
против гепатита В*

* Вакцины календаря обязательных прививок РФ

Получение генно-инженерной вакцины гепатита В

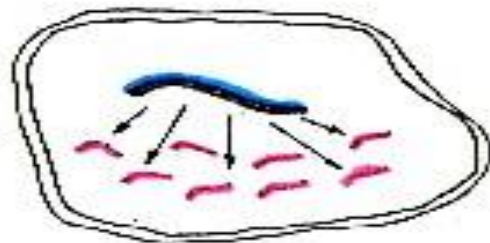
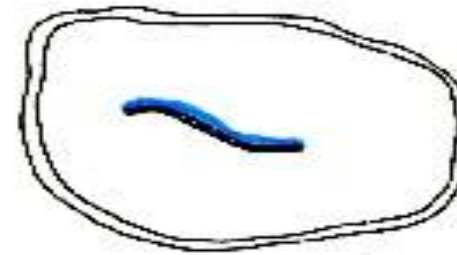
Вирус гепатита В

Структурные
элементы

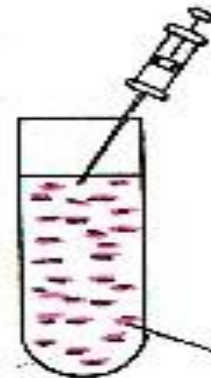
Инфекционный
генетический
материал

Генетическая
информация
о структурных
элементах

Бактериальная клетка содержащая генетическую
информацию об антигенах вируса гепатита В



Бактериальная клетка продуцирующая антигены
вируса гепатита В



Раствор
со структурными
элементами вируса



Вакцина 149

Генно-инженерная
вакцина гепатита В

Искусственная вакцина против ящура

Антигенная детерминанта

Химический синтез

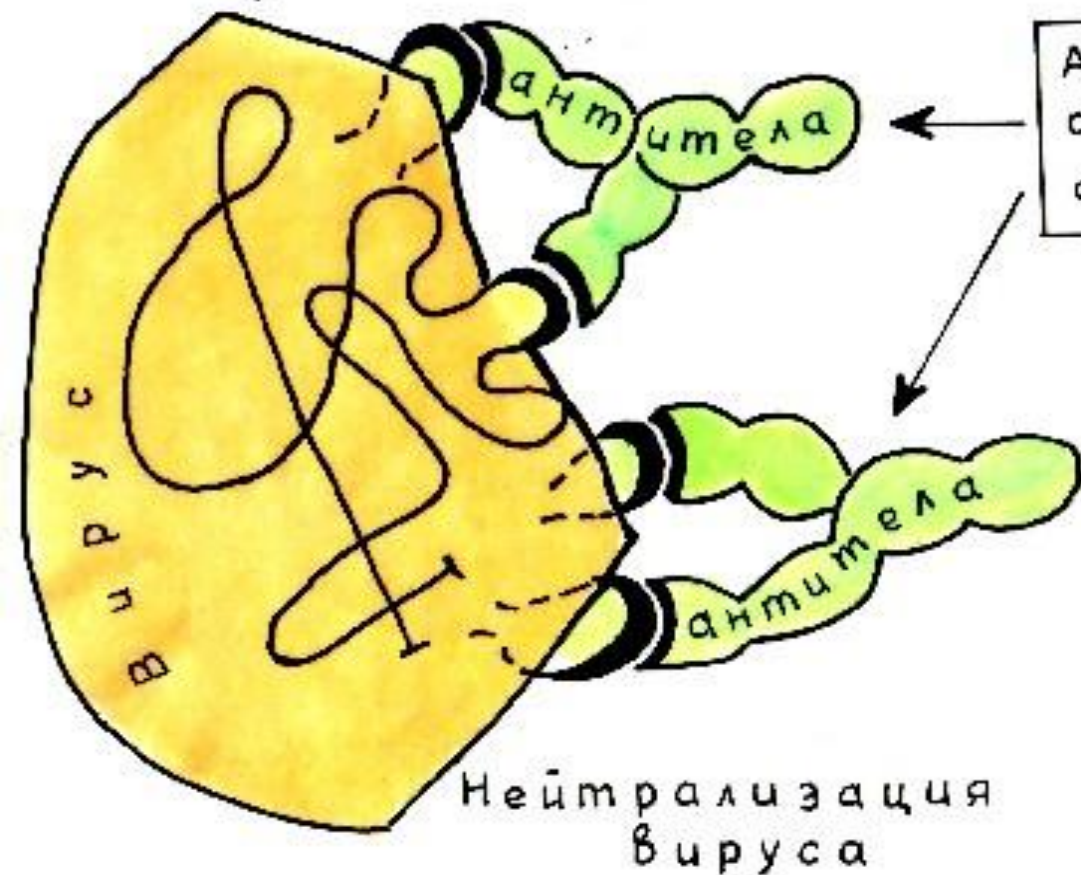
Arg-Gly-Asp-Leu-Gln -
- Val-Leu-Ala-Gln-Lys -
- Val-Ala-Arg-Thr-Leu -
- носитель

Антитела против
синтетического
антигена



Иммунизация

Белок
ответственный
за антигенные
свойства



Нейтрализация
вируса



Получение растительных вакцин

- Структурный ген, кодирующий вирусный или бактериальный антиген
- Растительный вектор, содержащий чужеродный ген
- Интеграция гена в ядерную хромосому
- Трансгенное растение
- Разведение трансгенных растений
- Экстракция или приём в пищу

Препятствия на пути внедрения в практику рекомбинантных препаратов

1. Длительное время к генно-инженерным препаратам и рекомбинантным штаммам микроорганизмов относились настороженно и даже с опаской, боясь, что может произойти неуправляемое распространение экологически опасных рекомбинантных микробов, а в препаратах может содержаться нежелательная для организма генетическая информация. В настоящее время эти опасения сняты, так как доказана безопасность при соблюдении определённых правил самих рекомбинантных штаммов, и препаратов, полученных на их основе.
2. Использование рекомбинантных штаммов-продуцентов предусматривает разработку сложных технологических процессов по получению и выделению целевых продуктов. На разработку технологии обычно затрачивается значительно больше средств, чем на получение штамма.
3. При получении препаратов генно-инженерным способом всегда возникает вопрос об идентичности активного начала, вырабатываемого рекомбинантным штаммом-продуцентом, природному веществу, т. е. требуется проведение исследовательских работ, направленных на доказательство их идентичности, а также иногда для решения дополнительных задач по приданию продукту природного характера.

Уровень разработки эндогенных иммуномодуляторов в России

Иммуномодулятор		НИР	Доклиника	Клиника
Интерфероны	α	+	+	+
	β	+	+	
	γ	+	+	
Интерлейкины	1- β	+	+	+
	2	+	+	
	6	+		
Лимфокин (ИЛ-1, 2, 6)		+	+	
ФНО		+	+	+/-
Пептиды тимуса		+	+	+/-
Миелопептиды		+	+	+/-
КСФ, кейлоны и др.		+		
Слитные белки:				
➤ дифанатоксин+ИЛ-2		+	+	
➤ тимозин (а 1+2)+ФНО		+	+	
Белки-антагонисты рецепторов ИЛ-2, ИФ- α_2		+		

Вклад биотехнологии в обеспечение безопасности



Биосенсоры и другие способы индикации агентов в окружающей среде



Технология дезактивации и дезинфекции



Индивидуальные и коллективные средства защиты от биоагентов



Экспресс-диагностика, экспресс-профилактика поражений биоагнетами



Разработка препаратов для профилактики и лечения инфекций

перспективы биотехнологии

- Функционально-активные белки: поведенческие пептиды, иммуоцитокнины, регуляторные белки для лечения различных болезней;
- Принципиально новые вакцины: синтетические, рекомбинантные, ДНК-овые (ВИЧ, гепатит С, грипп, коклюш, хламидиозы, малярия, противоопухолевые и др.);
- Генетически-модифицированные пищевые продукты;
- Полезные высокоурожайные растения и высокопродуктивные животные;
- Искусственные органы и ткани;
- Штаммы-деграданты веществ, загрязняющих планету;
- Биосенсоры, биодатчики, микрочипы (нанобиотехнология).

Биотехнология проникла во все сферы науки и производства, стала незаменимой в жизни людей. Мы переживаем её бурный расцвет, каждый день приносит новые результаты. Развитие биотехнологии во всех странах порождает конкуренцию на рынках сбыта. За рынки сбыта генно-инженерных продуктов (вакцина против гепатита В, интерферон, интерлейкин и др.) за рубежом конкурируют десятки и сотни фирм. Это определяет темпы развития и служит движущей силой поиска и разработки новых продуктов для медицины, ветеринарии, промышленности.

Будущее за биотехнологией, как наиболее
природной и рациональной сферой в
области производства многих жизненно
ценных продуктов, в том числе
медицинского назначения

*Благодарю за
внимание*

A decorative orange curve starts from the bottom left, curves upwards and to the right, and ends at the top right. A small blue dot is located on this curve in the upper right quadrant. The background is white.



АКАДЕМИЯ
ПОСТДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ФГБУ ФНКЦ ФМБА РОССИИ

Кафедра Клинической лабораторной
диагностики и патологической
анатомии и лабораторной
микробиологии



Денисова



Ольга



Владимировна



Телефон +7-985-644-
80-90 (в том числе
вотсапп)



[email.com](mailto:denisova_ov@inbox.ru)
denisova_ov@inbox.ru
и