**Введение**

Интерфероны представляют собой белковые молекулы с молекулярной массой от 15000 до 21000 дальтон, продуцируемые и секретируемые клетками в ответ на вирусную инфекцию или другие возбудители.

Интерфероны (ИФН) — группа аутогенных гликопротеинов, биомеханизм действия которых связан с одновременным противовирусным эффектом - активацией клеточных генов, в результате чего синтезируются белки, ингибирующие синтез вирусной ДНК (РНК) и обладающие иммуномодулирующим эффектом — способностью усиливать экспрессию антигенов на клеточных мембранах и увеличивать активность цитотоксических Т-клеток и естественных киллеров [4].

ИФН подразделяются на два типа. К первому типу, действующему как ингибиторы репликации вируса и оказывающему преимущественно противовирусный эффект, относятся 22 различных подтипа ИФН-б и один подтип ИФН-в. Ко второму типу, проявляющему иммуномодуляторную активность, относятся ИФН-г.

Существует три иммунологически различных класса ИФН: ИФН-б, ИФН-в, ИФН-г.

К ИФН естественного происхождения относятся лимфобластоидный и лейкоцитарный ИФН (ИФН-б), синтезируемые соответственно стимулированными моноцитами и В-лимфоцитами человека, которые затем экстрагируются и очищаются; фибробластный ИФН (ИФН-в), получаемый из культуры фибробластов человека, и Т-лимфоцитарный ИФН (ИФН-г).

К искусственно синтезируемым ИФН относится рекомбинантный ИФН-б, который представляет собой высокоочищенный единственный подтип ИФН-б, получаемый по рекомбинантной молекулярной технологии

**1. Теоретическая часть**

**1.1 История открытия интерферонов**

С инфекционными болезнями, вызываемыми бактериями, медицина уже до известной степени научилась справляться при помощи антибиотиков, сульфонамидов и других препаратов. Но при заболеваниях, вызываемых вирусами, положение иное, хотя уже в то время, когда еще не было и речи ни о бактериях, ни о вирусах, против одного из опаснейших вирусных, как потом выяснилось, заболеваний, а именно оспы, была предложена вполне действенная предохранительная прививка.

Успешная борьба с детским параличом, которая велась в последнее время, показала, что болезни вирусного происхождения не являются непобедимыми. Изучение вирусов привело в последние годы к открытию, которому суждено большое будущее. Речь идет об интерфероне.

Приведем историю интерферона. Еще в 1935 году ученый Маграсси, изучая на кроликах вирус, вызывающий лихорадку, при которой на губах образуются пузырьки (герпес), обратил внимание на одно странное на первый взгляд обстоятельство. Он вводил кроликам в глаз культуру вируса и через несколько дней обнаруживал этот вирус в мозге у подопытных животных. Когда он вводил этим кроликам через 4 дня в мозг культуру вируса, вызывающего во всех ста процентах случаев смертельное воспаление мозга, на кролика с вирусом герпеса это не действовало. Он как бы не допускал вирус в мозг, подавлял его действие и тем предохранял от болезни. Так вот, подавление действия одного вируса другим при смешанной инфекции и было названо интерференцией вирусов. Через 22 года поисков и исследований учеными многих стран двум американцам — Айзексу и Линдеману удалось частично раскрыть это загадочное явление и направить исследования на путь практического эксперимента, который может привести и к лечению вирусных болезней человека. Айзеке и Линдеман сообщили об этом в лондонском медицинском журнале. Эти ученые заражали куриные зародыши вирусами инфлюэнцы, которые размножаются в яйцевых оболочках зародыша. Но для опыта они брали не живые, а умерщвленные, инактивированные вирусы инфлюэнцы. Затем заражали эти куриные зародыши живыми, активными вирусами, но неудачно. Это наблюдается не только при пользовании вирусами инфлюэнцы и яйцевыми оболочками куриного зародыша. Такое же явление можно отметить при свинке, кори, герпесе и не только при использовании яйцевых оболочек куриного зародыша, но и на тканях щитовидной железы, почечных клетках человека и так далее.

Хотя опыт и напоминает нам предохранительную прививку, например, против оспы, все-таки вопрос в целом еще был весьма неясен, и оба исследователя продолжали свою работу. Они доказали, что в жидкую часть культуры, в которой размножаются клетки, переходит какое-то вещество. Оно и вызывает явление интерференции, почему Айзеке и Линдеман и называли его интерфероном.

После того как интерферон появится в жидкой части культуры, можно заставить его действовать и на другие клетки; последние тогда оказываются предохраненными от соответствующей вирусной инфекционной болезни.

Любопытно, что интерферон не специфичен. Полученный, например, при помощи вирусов инфлюэнцы, он действует так же и при оспе, но, по-видимому, особенно хорошо тогда, когда применяется на том же виде животного, на каком был получен.

Можно полагать, открытие интерферона будет особенно ценным для практической медицины. В настоящее время ставится вопрос о возможности получения интерферона в более сильной концентрации. Если в этом направлении будут достигнуты успехи, со временем начнется причинное лечение вирусных заболеваний. [4,15,25]

**1.2 Характеристика и классификация интерферонов**

Интерфероны — общее название, под которым в настоящее время объединяют ряд белков со сходными свойствами, выделяемых клетками организма в ответ на вторжение вируса. Благодаря интерферонам клетки становятся невосприимчивыми по отношению к вирусу. «Определяемый в качестве интерферона фактор должен быть белковой природы, обладать антивирусной активностью по отношению к разным вирусам, по крайней мере, в гомологичных клетках, опосредованной клеточными метаболическими процессами, включающими синтез РНК и белка»

*Эффекты интерферона*

* Обладает активируемым действием – интерферон не действует на внеклеточный вирус, а противодействует вирусной инфекции путем усиления фагоцитоза, активизации естественных киллерных клеток, стимулирует образование интерлейкина-2, увеличивает синтез ферментов.
* Ингибирование клеточного роста – Как противоопухолевое средств – способен подавлять деление онкогенных клеток при сохранении функции актвации всех звеньев иммунной системы.
* Обладает антимикробной активностью
* Оказывает радиозащитное действие
* Интерферон является иммуномодулятором – стимулирует иммунную систему организма.

*Эффекты интерферона (таблица 1)*

1. Обладает антивирусным действием. Самостоятельно интерферон не уничтожает вирусы. После проникновения в клетку вируса начинает синтезироваться интерферон, который выходит за пределы клетки и прикрепляется к поверхности гликозидных рецепторов клеток, пораженных вирусами или клеток, в которых вирус еще не проник. Гликозидные рецепторы способен передавать внутрь клеток сигналы, запускающие механизм синтеза ферментов – эндонуклеазы и протеиназы. Эндонуклиаза способна «разрезать» молекулы нуклеиновых кислот вирусов на уровне трансляции
2. Интерферон вызывает ингибирование клеточного роста (используется как противоопухолевое средство) – способен подавлять деление онкогенных клеток при сохранении функции активации всех звеньев иммунной системы.
3. Интерферон оказывает стимулирующее влияние на фагоцитоз, естественные клетки – киллеры и макрофаги; повышает неспецифическую резастентность клеток; а общая иммунологическая реактивность организма адекватна уровню интерферонообразования.
4. Интерферон обладает антимикробной активностью
5. Оказывает радиозащитное действие
6. Интерерон является иммуномодулятором – т. е. регулирует иммунологические реакции, стимулирует иммунную систему организма.

Интерферон относится к протеинам или гликопротеинам, в состав которых включено 146-166 аминокислотных остатков. Молекулярная масса – 20-80 кДальтон. Вырабатывать интерферон могут клетки позвоночных от рыб до человека. наиболее активными продуцентами интерферона являются лимфоциты и макрофаги. Наиболее активными индукторами среди вирусов являются вирус Ньюкаслской болезни, вирус Сендай, чумы свиней.

*Выделяют три класса интерферона*

1. Лейкоцитарный или б-IFN-получают в культуре лейкоцитов выделенных из крови доноров. Различают 20 рекомбинантных вариантов, отличающихся последовательностью аминокислот в полепептидной цепи и биологической активностью.
2. Фибробластный или в-IFN-для получения используют культуру фибрабластов.
3. Иммунный или г-IFN - его синтезируют сенсебилизированные Т-лимфоциты при повторном контакте с митогенами, а также с бактериальными и вирусными антигенами.

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

Различают следующие виды интерферонизации:

1. Экзогенная – введение готового интерферона в организм, использование мазей, содержащих интерферон.
2. Эндогенная – введение в организм индукторов интерферон, которые стимулируют процесс образования интерферона.

Наиболее активными индукторами интерферона являются синтетические и природные двунитевые РНК.

Таблица 1 – Влияние интерферона на иммунный ответ и функции клеток

|  |  |
| --- | --- |
| Положительный эффект (стимуляция) | Отрицательный эффект (угнетение) |
| Резистентность клеток к вирусному инфицированию | Анафилактическая реакция |
| Фагоцитоз | Гиперчувствительность замедленного типа |
| Активность натуральных киллеров (НК) | Пролиферация лимфоцитов |
| Экспрессия антигенов главного комплекса гистосовместимости (MHC) | Рост клеток (в том числе и опухолевых) |
| Продукция интерферона ("прайминг") | Реакция на трансплантант |
| Чувствительность к токсическому действию поли I: | Реакция трансплантанта против хозяина |
| Активность лимфоцитов, ответственных за зависимую от антител цитотоксичность | Реакция связывания комплемента |
| Активность цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) | Продукция интерферона("блокинг") |
| Сенсибилизация к антигенам |
| Образование антител |

**1.3 Механизм действия интерферонов**

Наиболее изученным свойством интерферона является его способность препятствовать размножению вирусов. Он образуется в клетках млекопитающих и птиц в ответ на вирусную инфекцию.При заражении клетки вирус начинает размножаться. Клетка-хозяин одновременно с этим начинает продукцию интерферона, который выходит из клетки и вступает в контакт с соседними клетками. Хотя интерферон не обладает прямым противовирусным действием, он способен вызывать такие изменения в клетках, которые препятствуют размножению вируса, формированию вирусных частиц и дальнейшему его распространению. Интерферон действует в нескольких направлениях. Во-первых, он оказывает влияние на клетки, соседние с инфицированной, запуская в них цепь событий, приводящих к подавлению синтеза вирусных белков и в некоторых случаях сборки и выхода вирусных частиц (путём активации олигоаденилатциклазы). В ответ на воздействие интерферона клетки вырабатывают большое количество протеинкиназы R. Этот фермент фосфорилирует фактор инициации трансляции eIF-2, фосфорилированный eIF-2 формирует неактивный комплекс с другим фактором, eIF-2B. В результате уровень белкового синтеза в клетке снижается. После протеинкиназы R активируется синтез рибонуклеазы L, которая расщепляет клеточные РНК и ещё больше снижает уровень белкового синтеза. В целом, интерферон-зависимое подавление трансляции является губительным как для вируса, так и для клетки-хозяина. Помимо влияния на трансляцию, интерфероны способны активировать сотни других генов (они известны как гены, стимулируемые интерфероном), играющих роль в защите клетки от вирусов[2][3]. Кроме того, интерферон лимитирует распространение вирусных частиц путём активации белка p53, что ведёт к апоптотической смерти инфицированной клетки.

Вторым направлением действия интерферонов является стимуляция иммунной системы для борьбы с вирусами. Интерферон повышает синтез молекул главного комплекса гистосовместимости I и II классов и активирует иммунопротеасому. Высокий уровень молекул главного комплекса гистосовместимости I класса обеспечивает эффективную презентацию вирусных пептидов цитотоксическим Т-лимфоцитам и натуральным киллерам, а иммунопротеасома осуществляет процессинг вирусных пептидов, предшествующий презентации. Высокий уровень молекул главного комплекса гистосовместимости II класса обеспечивает презентацию вирусных антигенов Т-хелперам. Т-хелперы, в свою очередь, выделяют цитокины, которые координируют активность других клеток иммунной системы. Некоторые виды интерферонов, например интерферон-г, могут прямо стимулировать клетки иммунной системы, такие как макрофаги и натуральные киллеры. Образование интерферона могут стимулировать не только интактные вирусы, но и различные другие агенты, например некоторые инактивированные вирусы, двухцепочечные РНК, синтетические двухцепочечные олигонуклеотиды и бактериальные эндотоксины.

Биологическая активность интерферона очень высока. У мышиного интерферона она составляет 2·109 ед./мг., а одна единица снижает образование вирусов примерно на 50 %. Это означает, что достаточно одной молекулы интерферона, чтобы сделать клетку резистентной к вирусной инфекции. Показано, что молекулы интерферона должны оказывать действие на клетку в течение минимум четырех часов, для того, чтобы в клетке начались процессы борьбы с вирусом, таким образом, многие специалисты не считают эффективным интраназальное применение интерферона для профилактики ОРВИ. Тем не менее, последние исследования показывают, что интерферон, примененный на слизистую оболочку, может действовать в качестве иммунологического адъюванта против вируса гриппа, усиливая специфический ответ иммунной системы. В США проводятся клинические испытания вакцины против гриппа, которая использует интерферон в качестве адъюванта.

Интерферон вызывает и целый ряд других биологических эффектов, в том числе подавляет размножение клеток. Недавние исследования показали, что в определённых условиях он может препятствовать развитию злокачественных новообразований. Установлено также, что интерферон действует на иммунную систему и вызывает изменение клеточных мембран. Таким образом, интерфероновая система, вероятно, может играть важную роль в защите организма от вирусов.

Интерфероны проявляют некоторые виды активности как лимфокины и им-муномодуляторы. Интерфероны I типа, действующие преимущественно как ингибиторы репликации вирусов в клетке, реализуют свой эффект, стимулируя выработку рибосомами клеток хозяина клеточных ферментов, которые тормозят продукцию вирусов, нарушая трансляцию вирусной мРНК и синтез вирусных белков.

Интерфероны вырабатывают большинство видов животных, но проявление их активности видоспецифично, т.е. они действуют только у того вида животных, в которых вырабатываются.

Интерфероны вызывают индукцию трех ферментов:

* протеинкиназы, нарушающей начальный этап построения пептидной цепи;
* олигоизоаденилат синтетазы, активирующей РНК-азу, которая разрушает вирусную РНК;
* фосфодиэстеразы, разрушающей конечные нуклеотиды тРНК, что приводит к нарушению элонгации пептида.

С учетом антивирусного и иммуномоделирующего эффектов интерферонов в НПО «Биомед» предложены и успешно апробированы, суппозитории с интерфероном аn1 и пробиотиками при терапии дисбактериозов вирусной и бактериальной этиологии, кандидозов; в гинекологической практике для лечения эндометритов, кольпитов, вагинитов и гинекологического герпеса. [27, 29, 30]

**1.4 Особенности получения интерферонов**

Известны способы получения лейкоцитарного интерферона человека из лейкоцитов донорской крови человека, индуцированных вирусами и другими индукторами.

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

В настоящее время более перспективным признан способ получения интерферона микробиологическим синтезом, который обеспечивает возможность получения целевого продукта со значительно более высоким выходом из сравнительно недорогого исходного сырья. Используемые при этом подходы позволяют создать оптимальные для бактериальной экспрессии варианты структурного гена, а также регуляторных элементов, контролирующих его экспрессию.

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

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

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

Известно большое количество плазмид и созданных на их основе штаммов Е. coli, экспрессирующих интерферон: штаммы Е. coli ATCC 31633 и 31644 с плазмидами Z-pBR322 (Psti) HclF-11-206 или Z-pBR 322(Pstl)/HclN SN 35-AHL6 (SU 1764515), штамм Е. coli pINF- AP2 (SU 1312961), штамм Е. coli pINF- F-Pa (AU 1312962), штамм E.Coli SG 20050 с плазмидой p280/21FN (Кравченко В.В. и др. Биоорганическая химия, 1987, т.13, №9, с.1186-1193), штамм E.Coli SG 20050 с плазмидой pINF14 (SU 1703691), штамм E.coli SG 20050 с плазмидой pINF16 (RU 2054041) и др. Недостатком технологий, основанных на использовании этих штаммов, является их нестабильность, а также недостаточный уровень экспрессии интерферона.

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

Известен способ получения интерферона, включающий в себя культивирование клеток Ps. putida, разрушение биомассы, обработку полиэтиленимином, фракционирование сернокислым аммонием, гидрофобную хроматографию на фенилсилохроме С-80, рН-фракционирование лизата, его концентрирование и диафильтрацию, ионообменную хроматографию на целлюлозе DE-52, элюирование в градиенте рН, ионообменную хроматографию полученного элюента на целлюлозе СМ-52, концентрирование пропусканием через кассету фильтров и гель-фильтрацию на Сефадексе G-100 (SU 1640996). Недостатком этого способа кроме сложной многостадийной ферментации является многостадийность при получении конечного продукта.

Известен также способ получения интерферона, включающий в себя культивирование штамма E.coli SG 20050/pIF16, в LB-бульоне в колбах в термостатированном шейкере, центрифугирование биомассы, ее промывку буферным раствором и обработку ультразвуком для разрушения клеток. Полученный лизат центрифугируют, промывают 3М раствором мочевины в буфере, растворяют в растворе гуанидин хлорида в буфере, обрабатывают ультразвуком, центрифугируют, проводят окислительный сульфитолиз, диализ против 8 М мочевины, ренатурацию и окончательную двухстадийную хроматографию на СМ-52 целлюлозе и сефадексе G-50 (RU 2054041).

Недостатками этого способа является его относительно невысокая производительность основных этапов процесса выделения и очистки. В особенности это относится к ультразвуковой обработке продукта, диализу и окислительному сульфитолизу, что приводит к нестабильности выхода интерферона, а также к невозможности использования этого метода для промышленного производства интерферона.

В качестве наиболее близкого аналога (прототипа) может быть указан способ получения лейкоцитарного интерферона человека, заключающийся в культивировании рекомбинантного штамма E.coli, замораживании полученной биомассы при температуре не выше -70°С, размораживании, разрушении клеток микроорганизма лизоцимом, удалении ДНК и РНК введением в лизат ДНК-азы и очисткой выделенной нерастворимой формы интерферона отмывкой буферным раствором с детергентами, растворении осадка интерферона в растворе гуанидин гидрохлорида, ренатурации и одностадийной очистке ионообменной хроматографией. В качестве продуцента используют штамм E.coli SS5, полученный с помощью рекомбинантной плазмиды pSS5, содержащей три промотора: Plac, Pt7 и Ptrp, и ген альфа -интерферона с введенными нуклеотидными заменами.

Экспрессия интерферона штаммом E.coli SS5, содержащим эту плазмиду, контролируется тремя промоторами: Plac, Pt7 и Ptrp. Уровень экспрессии интерферона составляет около 800 мг на 1 л клеточной суспензии.

Недостатком способа является низкая технологичность использования ферментативного разрушения клеток, ДНК и РНК микроорганизма и одностадийная хроматографическая очистка интерферона. Это обуславливает нестабильность процесса выделения интерферона, приводит к снижению его качества и ограничивает возможность использования приведенной схемы для промышленного производства интерферона.

Недостатками данной плазмиды и штамма на ее основе являются использование в плазмиде сильного нерегулируемого промотора фага Т7 в штамме Е. coli BL21 (DE3), в котором ген Т7 РНК полимеразы находится под промотором lac оперона и который всегда "течет". Следовательно, в клетке непрерывно происходит синтез интерферона, что приводит к диссоциации плазмиды и снижению жизнеспособности клеток штамма, и в результате - снижение выхода интерферона.

Для получения больших количеств ИФН используют шестидневные однослойные культуры клеток куриного эмбриона или культивируемые лейкоциты крови человека, зараженные определенным видом вируса. Иными словами, для получения ИФН создают определенную систему вирус-клетка.

Из клетки человека изолирован ген, ответственный за биосинтез ИФН. Экзогенный человеческий ИФН получают, используя технологию рекомбинантных ДНК. Процедура выделения кДНК ИФН-ов состоит в следующем:

1. Из лейкоцитов человека выделяют мРНК, фракционируют ее по размерам, проводят обратную транскрипцию, встраивают в сайт модифицированной плазмиды.
2. Полученным продуктом трансформируют Е. соli; образовавшиеся клоны подразделяют на группы, которые идентифицируют.
3. Каждую группу клонов гибридизируют с ИФН - мРНК.
4. Из образовавшихся гибридов, содержащих кДНК и хРНК, выделяют мРНК, проводят ее трансляцию в системе синтеза белка.
5. Определяют интерферонную противовирусную активность каждой смеси, полученной в результате трансляции. Группы, проявившие интерферонную активность, содержат клон с кДНК, гибридизировавшийся с ИФН - мРНК; повторно идентифицируют клон, содержащий полноразмерную ИФН - кДНК человека. [1, 9 , 29]

**1.5 Перспективные исследования в области получения интерферонов**

С развитием методов молекулярной биологии, биохимии и биотехнологии повышаются требования качества к практически важным продуктам, получаемым в данных областях. Одним из примеров подобных тенденций является повышение чистоты фармакологических субстанций, полученных с использованием технологий «рекомбинантных ДНК». Это, в частности, относится к белку, лекарственные препараты которого существуют уже более 20-и лет, - человеческому рекомбинантному интерферону a-2b.

Наиболее выгодным экономически является использование штаммов- продуцентов, в которых уровень биосинтеза целевого белка составляет десятки процентов от суммарных клеточных полипептидов (в этих случаях, как правило, гетерологичный белок накапливается в бактериальной клетке в виде нерастворимых конгломератов - телец включения).

Создание подобных бактериальных штаммов-продуцентов возможно только при соблюдении ряда условий, один из которых - стабильность мРНК при экспрессии целевого гена. Основным фактором стабильности мРНК и эффективности ее трансляции, является кодоновая композиция гетерологичного рекомбинантного гена. При наличии редко встречающихся аминокислотных кодонов, в гене, клонированном в составе мультикопийного экспрессионного вектора, подобная генетическая конструкция будет нежизнеспособна, или же, уровень синтеза целевого белка будет крайне низким. Другим фактором неэффективной экспрессии гетерологичного гена может являться интерференция процесса транскрипции гена (особенно, с сильного бактериального или фагового промотора) с процессом репликации рекомбинантной плазмиды, что возможно даже при наличии теминатора транскрипции в 3’-концевой нетрансли- руемой области целевого гена.

Повышение требований к чистоте препаратов на основе рекомбинантных белков, выделяемых из бактериальных штаммов-продуцентов, потребовало развитие новых биохимических методов анализа белков. Появились такие анализы на чистоту, как анализ ВЭЖХ, тесты на остаточную ДНК и на остаточные белки штамма-хозяина и вектора. Тест на пирогенность постепенно вытесняется тестом на бактериальные эндотоксины (ЛАЛ-тест). Усложнение аналитического контроля привело к принципиальным изменениям технологий производства субстанции рекомбинантных белков, т.к. применение старых технологических путей являлось не удовлетворительным по качеству конечного продукта, или же, экономически невыгодным.

При суперсинтезегетерологичных белков в клетках *E. coli* (в таких количествах, что целевой белок начинает образовывать тельца включения), бактериальные клетки находятся в состоянии стресса. Во многих случаях бактериальная культура практически не растет после индукции синтеза целевого белка. Кроме того, в условиях стресса, накапливающиеся в тельцах включения белки могут иметь нежелательные модификации, начиная с неотщепленногоN- концевого метионина, и заканчивая ацетилированием или окислением некоторых аминокислотных остатков белка. Подобные модифицированные вариантымогут не отделяться от целевого белка при его очистке с помощью различных видов гидрофобной и ионообменной жидкостной хроматографий (не говоря уже про аффинную и гель-фильтрационную), так как при модификации изменение конформации белка не происходит, а изменение массы и заряда ничтожно мало по сравнению немодифицированной молекулой. Но при правильном подборе условий модифицированный белок можно детектировать ОФ-ВЭЖХ, а следовательно, при большом количестве таких молекул в препарате, он не удовлетворяет критериям необходимой чистоты. Было замечено, что количество и характер подобных примесей в препаратах рекомбинантных белков зависит от условий ферментации штамма-продуцента, а не только от использованной технологии выделения и очистки целевого продукта. Таким образом, процесс получения высокоочищенной субстанции рекомбинантного белка для ее дальнейшего практического использования при создании медицинских или ветеринарных препаратов представляет собой комплексную задачу, изменения одного из этапов которой, значительно влияет на остальные этапы. [9, 17, 23]

**1.6 Клинические особенности применения интерферонов**

Объем экспериментального и клинического материала по интерферонам (ИФН), накопленный к настоящему времени, огромен. Многотомные издания и обзорные работы по этой теме исчисляются десятками. В кратком изложении передать всю совокупность материала совершенно невозможно, поэтому остановимся только на наиболее важных данных, которые представляют интерес с клинической точки зрения. Система интерферонов является универсальным фактором как неспецифической резистентности, так и иммунорегуляции, функциональная недостаточность и нарушение синтеза которой обусловливает патогенетическую основу большого числа процессов - воспаления, иммунопатологических реакций, репарации. Активная выработка интерферона - залог устойчивости организма к возникновению инфекционных заболеваний или быстрой локализации очага инфекции в случае его возникновения [5]. Интерфероны относятся к видоспецифическим цитокинам, представляя собой группу биологически активных белков и/или гликопротеидов, синтезируемых клетками в процессе иммунной реакции в ответ на воздействие стимулирующих агентов. Интерфероны - важнейшие факторы естественного иммунитета, первая линия противоинфекционной защиты. Особое место ИФН занимают потому, что индукция их синтеза, прежде всего натуральными киллерами, клетками моноцитарного ряда, а также дендритными клетками, предшествует формированию специфических иммунных реакций, как это четко было показано при ряде вирусных инфекций Подобно другим цитокинам, специфические защитные эффекты ИФН также реализуются через каскады проведения сигналов. Интерферон был открыт в Англии в 1957 г. А. Айзексом и Ш. Линденманном при изучении явления интерференции вирусов. В последующие годы ИФН всегда привлекал внимание вследствие совершенно уникальной способности подавлять репродукцию вирусовкак в иммунокомпетентных, так и в соматических клетках без отрицательного влияния (в физиологичных дозах) на метаболизм. По широте спектра действия, высокой избирательности в отношении вирусоспецифических процессов, отсутствию цитотоксических эффектов ИФН не имеет равных среди других противовирусных препаратов.

Система ИФН состоит из генов ИФН и рецепторов, а также эффекторных молекул трех видов, относящихся к двум типам:

I тип - ИФН-а и ИФН-Р;

II тип - ИФН-у.

Гены ИФН типов I и II расположены на разных хромосомах и имеют разные рецепторы. Радикально различаются они и по механизмам индукции и продукции. ИФН I типа продуцируются всеми ядерными клетками (в том числе малодифференцированными) в ответ на чужеродную генетическую информацию. Самыми сильными их индукторами являются вирусы или двуспиральные РНК, являющиеся одной из стадий репликации вирусного генома. Из продуцируемой лейкоцитами противовирусной активности свыше 90% обусловлено ИНФ-а и менее 10% - ИНФ-у. В культуре фибробластов такой же индуктор, напротив, вызывает синтез только ИНФ-Р. В отличие от ИНФ I типа, ИНФ II типа продуцируется только двумя видами ядерных клеток: Т-лимфоцитами в процессе активации - при взаимодействии с антиген-представляющим макрофагом; естественными киллерны-ми клетками (ЕК) - при взаимодействии с клетками-мишенями. Активными индукторами ИНФ-у являются также митогены Т-лимфоцитов фитогемагглютинин (ФГА), конканавалин А (КонА). В этом случае необходимости в кооперации с макрофагами нет. Функциональное различие в процессах индукции ИФН типов I и II необходимо учитывать в клинической практике. Для организма далеко не безразлично, какой вид ИФН продуцируется в каждый конкретный момент.Известно, что вирус гриппа индуцирует в изолированных лейкоцитах синтез ИФН-а. Взаимодействие ИФН с клеткой осуществляется только через посредство специфического рецептора, пронизывающего цитоплазматическую мембрану. Уровень рецепторов на клеточной мембране - величина динамическая: под воздействием высоких доз экзогенного ИФН их число на клетках снижается в несколько раз. Эти данные служат аргументом для практического врача против ежедневного введения высоких доз ИФН в клинике. Экспрессия рецепторов восстанавливается лишь на 2-3-е сутки, поэтому более целесообразно введение ИФН 2-3 раза в неделю. Под действием ИФН развивается целый каскад реакций, проявляющихся на клеточном, системном и организменном уровнях. Вся их совокупность условно разделяется на три эффекта - противовирусный, антипро-лиферативный и иммуномодулирующий.

*Противовирусное действие интерферонов*

В клетке под действием ИФН активируются так называемые ИФН-зависимые гены. Главными из них являются гены 2',5'-олиго-аденилатсинтетаза и протеинкиназа. ИФН был открыт как фактор, обладающий выраженным противовирусным действием. Эта его активность оказалась очень высокой, подавление вирусов вполне сопоставимо с активностью феромонов. Еще А. Айзекс, автор открытия ИФН, показал, что эффекты ИФН связаны со специфическими изменениями в метаболизме клетки: под действием любого из трех видов ИФН клетка переходит в особое состояние «невосприимчивости к вирусной инфекции», которое характеризуется активацией ИФН-за-висимых ферментных систем и появлением в цитоплазме до 20 новых белков. Наиболее изученным ИФН-зависимым ферментом является 2',5'-олигоаденилатсинтетаза, которая активируется под действием всех трех видовИФН. Она катализирует синтез ряда коротких моно-, ди-, три- и тетраполиаденилатов на основе аденозинтрифосфата (АТФ). Их отличительной особенностью является образование необычной 2',5'-фосфодиэфирной связи. Активность этого фермента проявляется только в присутствии двуспиральной РНК (дсРНК), состоящей не менее чем из 30 нуклеотидов. 2',5'-олигоаденилаты выполняют функцию мощного активатора клеточных эндонуклеаз, в частности РНК-азы L. Активация РНК-азы предотвращает считывание чужеродной генетической информации, так как эффективно разрушает моноспирали вновь синтезируемой РНК (но не способна расщеплять дсРНК). Активация ИФН-зависимой ферментной системы 2',5'-олигоаденилатсинтетаза-РНК-аза L является основным механизмом противовирусного действия ИФН.

Другим механизмом,причем совершенно независимым, является активация про-теинкиназы одного из факторов инициации синтеза белка elF-2, которая осуществляется также только в присутствии дсРНК. Фосфори-лирование elF-2 с участием АТФ полностью останавливает синтез нового белка, в частности - белков вириона. Сочетание этих двух механизмов обеспечивает надежность противовирусной защиты. Имеются и другие механизмы противовирусного действия ИФН:

* подавление метилирования синтезированных матричных РНК (мРНК), что исключает их участие в синтезе белка; этот механизм работает в отношении самого распространенного индикаторного вируса везикулярного стоматита, используемого для определения ИФН и реовирусов;
* активацияфосфодиэстеразы, приводящая к подавлению участия транспортных РНК (тРНК) в сборке белкового полипептида на рибосомах;
* специфическое подавление трансляции вирусных тРНК без влияния на синтез белков;
* подавление сборки вирионов и почкования вируссодержащих частиц (вирус мышиной лейкемии).

Описанные выше 4 реакции проявляются в отношении ограниченного числа вирусов. Для их проявления не требуется присутствия дсРНК.

Так как ИФН блокирует фундаментальные процессы репродукции репликативной формы РНК и белка нуклеокапсида, к его действию чувствительны практически все вирусы, содержащие РНК или ДНК: цитолитические, интегрирующиеся, медленные. Чувствителен к ИФН и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ). Обычно чувствительность к действию ИФН определяется рецепторной системой, закодированной в хромосоме 21 для ИФН I типа и в хромосоме 6 - для ИФН II типа. Резистентность клеток к действию ИФН может быть вызвана утратой этих специфических рецепторов. Упрощенная схема противовирусного действия ИФН показана на рисунке (см рис 1).



*Рисунок 1 – Противовирусное действие интерферона*

Огромное количество экспериментов, накопленных к настоящему времени, показывают, что в норме гены ИФН репрессированы, и их считывание начинается только после индуцирующего воздействия. На примере ИФН I типа показано, что при этом индуктор не взаимодействует с генами ИФН прямо, а сначала включает систему ядерных интерферонрегулирулирующих факторов (ИРФ), в частности ИРФ-1, который, в свою очередь, уже способен включать считывание генов ИФН. Интересно, что на считывание генов ИРФ влияет не только индуктор (вирусная РНК и ее химические аналоги), но также сам ИФН, интерлейкин (ИЛ)-1 и фактор некроза опухоли а (ФНО-а) [24]. Существует тесная функциональная связь ИФН с другими цитокинами в иммунном ответе, имеющая объективный базис в виде ИРФ в геноме, который активируется под действием разных сигналов. Обратная регуляция системы ИФН осуществляется несколькими путями. Основным из них следует признать активацию 2'-фосфодиэстеразы, способной расщеплять важнейший фактор состояния невосприимчивости к вирусной инфекции - 2',5'-оли-гоаденилатсинтетазу. Под действием ИФН в цитоплазме уровень этого фермента возрастает примерно в 5 раз, препятствуя накоплению 2',5'-олигоаденилатсинтетазы. Вследствие непрерывного взаимодействия позитивного и негативного факторов уровень этого олигоаденилата в цитоплазме носит динамический характер. Это позволяет защитить клеточные РНК от деградации под действием РНК-азы L, которая активируется при накоплении 2',5'-олигоаденилатсин-тетазы. Другим отрицательным фактором регуляции ИФН в клетке является специфический ингибитор ИФН. В здоровом организме этот ингибитор обнаруживается примерно у 60% популяции, но уровень его относительно невысокий. Однако при патологических состояниях, например при СПИДе, осложненном саркомой Капоши, ингибитор выявлялся также у 50% больных, но у 30% из них он был достаточен для инактивации очень высокого уровня -500 МЕ/мл ИНФ-а и даже более. Однако это исключительный случай. Клинически при лечении вирусных инфекций ингибитор обычно не проявляется. Ингибитор ИФН у мышей был выделен и очищен. Он оказался полипептидом с молекулярной массой 8-10 кДа. Ингибитор человеческого ИФН, по некоторым данным, может быть структурным аналогом ИФН-у Клинически выраженное подавление развития состояния невосприимчивости к вирусам могут вызывать ингибиторы циклооксигеназы жирных кислот (например, ацетилсалициловая кислота), выполняющие важную роль на раннем этапе синтеза простагландинов. Ингибиторами являются и сами простагландины, особенно PGЕ2. Ингибитор простагландинов - индометацин положительно влияет на действие ИФН и может быть рекомендован для клинического применения, например, для предотвращения слишком сильных пирогенных реакций. По некоторым данным ИФН находятся в антагонизме с ростовыми гормонами, в частности, с тромбоцитарным ростовым фактором. Это должно учитываться при клиническом применении ИФН. Целесообразно также избегать применения ИФН совместно с кортикостероидными гормонами, которые снижают активацию иммунных эффекторов, прежде всего - макрофагов, вызванную ИФН. Если нет возможности отменить эти гормоны, они должны применяться в разные с ИФН дни.

*Иммуномодулирующее действие*

Долгое время ИФН рассматривались как факторы, влияющие на функции соматических клеток без участия иммунной системы. С позиций сегодняшнего дня можно утверждать, что активация неспецифических клеточных реакций иммунитета и регуляция эффекторов в иммунном ответе, по-видимому, основная функция ИФН в организме. Также отметим следующие функции:

* модуляция активности NK-клеток;
* усиление экспрессии Fc-рецепторов к IgG на мембранах макрофагов под действием ИФН-а;
* снижение активности Т-лимфоцитов супрессоров под действием ИФН-Р;
* повышение активности Т-лимфоцитов под действием ИФН-у;
* усиление экспрессии антигенов гистосовместимости I и II классов;
* регуляция чувствительности факторов иммунной системы к цитокинам;

*Антипролиферативный эффект*

Способность ИФН тормозить размножение клеток стала известна вскоре после его открытия, уже в 1962 г. К антипролиферативному (АП) эффекту оказались чувствительными все клетки - как нормальные, так

и опухолевые; максимальной чувствительностью обладали быстроразмножающиеся клетки. Высокочувствительны к АП-эффекту опухолевые клетки, характеризующиеся непрерывным неуправляемым ростом. При применении ИФН в высоких дозах (>1 млн ME) АП-эффект выражается, прежде всего, в цитопении. Клетки кроветворной системы высокочувствительны к ИФН. При этом подавляется как рост, так и способность к колониеобразованию в костном мозге и селезенке. Как правило, лимфоидный ряд более чувствителен к ИФН, чем миелоидный. Наименее подвержен действию ИФН эритропоэз. Вместе с тем, ИФН, применяемый в высоких суточных дозах (3-15 млн ME), вызывает циторедукцию (снижение числа циркулирующих опухолевых лейкоцитов) в среднем с 97,4\*109 до 4,2х109/л с уменьшением размеров селезенки [3, 5, 20, 21] у больных хроническим миелолейкозом. АП-эффект носит обратимый характер. После прекращения введения ИФН кроветворение полностью восстанавливается. Возобновляется рост опухолевых клеток. Для поддержания АП-эффекта в организме необходимо постоянное введение высоких доз ИФН. АП-эффект определенно связан с активацией 2',5'-олигоаденилатсинтетазы, так как в различных культурах наблюдается параллелизм между уровнем 2',5'-олигоаденилатов в цитоплазме и степенью подавления пролиферации. Эта взаимосвязь пока непонятна. АП-эффект обеспечивается также усилением экспрессии опухоль-ассоциированных антигенов, ингибицией действия опухолевых ростовых факторов, ингибицией синтеза РНК и белка в опухолевой клетке.

Учитывая все вышеперечисленные эффекты ИФН, становится понятным, что они имеют широчайший спектр терапевтического действия. Однако применение ИФН из донорской крови не исключает вероятность контаминации конечного продукта вирусами человека, такими как вирус гепатита В и С, вируса иммунодефицита и др. Эти проблемы решаются путем применения рекомбинантных ИФН, что обеспечивает абсолютную их безопасность. Рекомбинантные а-2b ИФН созданы на основе гена ИФН а-2b, доминирующего в человеческой популяции, поэтому к нему не синтезируются или синтезируются в минимальных количествах антитела, что обеспечивает стойкий терапевтический эффектПолучение рекомбинантного а-ИФН заключается в культивировании рекомбинантного штамма E. coli. В качестве продуцента используют штамм E. coli SS5, полученный с помощью рекомбинантной плазмиды pSS5, содержащей три промотора: Plac, Pt7 и Ptrp, и ген а-ИФН с веденными нуклеотидными заменами.

Рекомбинантный а-2b интерферон - Лаферобион («Биофарма», Украина) - имеет очень широкое применение в клинической практике. Лаферобион выпускается в виде сухого лиофилизированного порошка (инъекционная форма) - 1 млн МЕ, 3 млн МЕ, 5 млн МЕ, 6 млн МЕ, 9 млн МЕ, 18 млн МЕ; и в виде ректальных суппозиториев по 150 тыс МЕ, 500 тыс МЕ, 1 млн МЕ, 3 млн МЕ. Раствор Лаферобиона (в зависимости от локализации патологии) вводят внутримышечно, внутривенно, эндолимфально, внутрибрюшинно, внутрипузырно, парабульюарно, ректально, интраназально и подконъюнктивально.

Принципиальным является вопрос о рекомендуемых дозах ИФН. Высокие дозировки (3-5 млн МЕ и выше) вызывают побочные эффекты (гриппоподобный синдром, артериальную гипертензию, снижение порога судорожной готовности головного мозга и др.) и обеспечивают преимущественно ан-типролиферативный эффект, который может быть полезен при лечении опухолей. Еще в конце ХХ века было установлено, что малые дозы интерферонов (500 тыс - 1 млн МЕ) оказывают более выраженный иммуномодулирующий и противовирусный эффект и гораздо лучше переносятся больными, поэтому при рецидивирующих герпес-вирус-ных проявлениях (лабиальный, генитальный, опоясывающий герпес, проявления цитомегаловирусной инфекции и инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барр), рекомендовано применение именно умеренных доз интерферона в сочетании с противовирусными препаратами (аномальными нуклеозидами и препаратами других групп), а также в сочетании со специфическими иммуноглобулинами. Лаферобион назначается ежедневно или через день курсом 10-15 введений. В детской практике лучше применять Лаферобион в виде суппозиториев во избежание негативного отношения ребенка к лечебным процедурам.

Именно препараты Лаферобиона в форме суппозиториев в последнее время находят все более широкое применение в клинической практике. Это объясняется, впервую очередь, возрастающим количеством урогенитальной патологии, вызванной инфекциями, передающимися половым путем, при лечении которых применение препаратов данной группы позволяет значительно снизить дозы и продолжительность курса лечения антибактериальными и противовирусными препаратами. Уменьшение риска передозировки и связанных с этим побочных явлений обеспечивает ряд неоспоримых преимуществ суппозиториев перед инъекционными формами препаратов интерферонового ряда. Следует учитывать, что локальное применение Лаферобиона в форме суппозиториев дает быстрый терапевтический эффект непосредственно в очаге поражения, а также позволяет проводить курсы амбулаторной терапии при разнообразных проявлениях вирусной инфекции. Такие же курсы рекомендованы и при инфекциях, вызванных папилломавирусами. Папилломавирус активно циркулирует в кровеносном русле, потому применение Лаферобиона внутримышечно является продуктивным методом введения.

При респираторных вирусных инфекциях и гриппе вышеуказанные дозы Лаферобиона применяются в течение 3-5 дней (предпочтительно - в форме суппозиториев) и в виде интраназальных препаратов (для новорожденных доза препарата - 20-50 тыс МЕ в 1 мл, для остальных детей и взрослых -100 тыс МЕ в 1 мл).

Все составляющие терапии вирусных инфекций обеспечивают уменьшение количества рецидивов, восстановление иммунологической реактивности и сокращают сроки заболевания. [6, 20, 27]

**2. Расчетная часть**

**2.1 Расчет материального баланса**

Количество среды для приготовления 60 тонн интерферона



Компоненты:

Вода дистиллированная – 10000 литров (**10000 кг**)

Na2HPO4 – 60 кг (содержание основного вещества 98%) -**61,22 кг**

K2HPO4 – 30 кг (содержание в безводном 98%) – **30,61** кг

NaCl – 5 кг (содержание 98%) – **5,102** кг

NH4Cl – 10 кг(содержание 99,5) – **10,05** кг

CaCl2 – раствор 0,1М. Количество раствора в литрах – 100. Количество безводного хлористого кальция высшего сорта с массовым содержанием 96,5% - 11,502 кг (масса раствора при плотности 1,007 – **100,7кг**)

MgSO4 – раствор 0,1М. Количество в литрах – 10. Количество безводного MgSO4 хч с массовым содержанием 99,5% - 0,1206 кг (масса раствора – **100,33** кг).

Глюкоза, 40% - 50 л, при плотности 1,5 – **75 кг**.

Дрожжевой экстракт – **50 кг**.

Итого масса среды: **10433,012** кг

**10000** литров

Удельная активность интерферона не менее 2.0Ч10-8 МЕ/мг

Количество ферментационной среды с учетом потерь (10%) за счет уноса среды с отходящими от ферментера газами

G1 = 10000\*1.1 = 11000 л

Общий расход (в кг) компонентов для ферментационной среды

G2 =61.22+30.61+5.102+10.05+11.502+0.1206+30+50=198.6 кг

Содержание абсолютно сухих веществ в ферментационной среде

G3=61,22\*0,98+30,61\*0,98+5,102\*0,98+10,05\*0,995+11,502\*0,965+0,1206\*0,995+75\*0,4+50 = 196,211 кг

Количество посевного материала для засева ферментационной среды (посевная доза – 2% по отношению к G1)

G4 = 11000\*0.02 = 220 л

Количество готового посевного материала составит

G5 = 220\*0.95 = 209 л

Общий расход компонентов питательной среды

G6 = 1,279+0,639+0,106+0,210+2,104+2,096+1,567+1,045=9,046 кг

Содержание абсолютно сухих веществ в посевной среде

G7=1,279\*0,98+0,639\*0,98+0,106\*0,98+0,210\*0,995+2,104\*0,965+1,567\*0,995+1,045\*0,4 = 6.192 кг

Количество среды, поступившей в ферментер (среда для ферментации + посевной материал):

G8 = 11000+209 = 11209 л

Содержание абсолютно сухих веществ при этом составит:

G9 = 196,211 + 6,192 = 202,403 кг

Количество культуральной жидкости (к.ж.), полученной после ферментации и поступившей на стадии обработки (выход с учетом уноса с отходящими газами – 90%)

G10 = 11209\*0.9 = 10088.1 л

Потери к.ж. с отходящими газами составят 10%:

G11 = 11209\*0.1 = 1120.9 л

При этом потери абсолютно сухих веществ с отходящими газами составит 10%:

G12 = 202,403 \* 0,1 = 20,24 кг

Общая активность в культуральной жидкости:

А2 = 10088,1 \* 2,0Е21 = 2.0176E25

Затраты абсолютно сухих веществ на энергию биосинтеза 15%

G13 = 202,403 \* 0,15 = 30,3605 кг

Количество абсолютно сухих веществ в культуральной жидкости, поступившей на обработку:

G14 = 202,403 – (20,24 + 30,3605) = 151,80

Количество абсолютно сухих веществ в культуральной жидкости, после разрушения клеток

G15 = 0.97\*151,80 = 147,246 кг

Количество культуральной жидкости, после разрушения клеток

G’10 = 10088,1\*0,97=9785,45 л

Количество абсолютно сухих веществ в культуральной жидкости, после удаления растворимых клеточных компонентов

G16 = 0.99\*147,246 = 145,7735 кг

Количество культуральной жидкости, после удаления растворимых клеточных компонентов

G’’10 = 9785,457\*0,99= 9687,60 л

Количество абсолютно сухих веществ в культуральной жидкости, после центрифугирования

G17 = 0.98\*145,7735 = 142,858 кг

Количество культуральной жидкости, после центрифугирования

G’’’10 = 9687,60243\*0.98 = 9493,85 л

Количество абсолютно сухих веществ в культуральной жидкости, после ренатурации

G18=G17

Количество культуральной жидкости, после ренатурации

G’’’’10 = 9493,85 л

Количество абсолютно сухих веществ в культуральной жидкости, после хроматографической очистки

G19 = 0.97\*142,858 = 138,5723 кг

G20 = 0.99\*138,5723 = 137,1866 кг

G21 = 0.99\*137,1866 = 135,8114 кг

Количество культуральной жидкости, после хроматографической очистки

G’’’’’10 = 9493,85\*0.97 = 9209,034 л.

G’’’’’’10 = 9209,034\*0.99 = 9116,94 л.

G’’’’’’’10 = 9116,94\*0.99 = 9025,77 л.

Материальный баланс получения ферментативного препарата (расчет на 1м3культуральной жидкости)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Израсходовано | | | | | Получено | | | | | Выход фермента,% | |
| Наименование сырья и получпродуктов | Коли-чество,  л | Содер-  жание  a.c.b.,кг | Актив-ность,ед/г  ед/см3 | Общая  актив-  ность | Наименование конечного продукта, отходов и потерь | Количество, л | Актив-ность, ед/г, ед/см3 | Общая актив-ность,  ед | Содер-  жаниеa.c.в., кг | На стадии | К исход. |
| Стадия ТП- Выращивание продуцента в ферментере | | | | | | | | | | | |
| -питательная ферментационная среда  -посевной материал | 11000  209 | 196,211  6.192 | 211 |  | -культуральная жидкость  -потери с уносом расход сухих веществ на энергию биосинтеза | 10088.1  1120.9 | 211 | 2,025 | 151,80  20,24 30,36 | 100 |  |
| ИТОГО | 11209 | 202,403 |  | | ИТОГО | 11209 |  | 2,0-17 | 202,403 |  | |
| Стадия ТП-Разрушение клеток | | | | | | | | | | | |
| -культуральная жидкость | 10088.1 | 151,80 | 2,025 | 2,025 | -биомасса (W=97%)  -потери от инактиваци | 9785,45  302,65 | 1.31723 | 1.9425 | 147.246  4.554 | 97%  97% |  |
| Стадия ТП-Удаление растворимых клеточных компонентов | | | | | | | | | | | |
| -культуральная жидкость | 9785,45 | 147.246 | 1.31723 | 1.9425 | Концентрат (W=99%)  Потери | 9687,60  97,85 | 9.03422 | 1.30325 | 145.7735  1.4725 | 99%  99% | 96% |
| Стадия ТП - Центрифугирование | | | | | | | | | | | |
| -культуральная жидкость | 9687,60 | 145.7735 | 9.03422 | 1.30325 | Концентрат  (W=98%)  Потери | 9493,85  193,752 | 9,03422 | 1,30325 | 145,7735  1,4725 | 98% | 94% |
| Стадия ТП- Ренатурация | | | | | | | | | | | |
| Концентрат | 9493,85 | 145,7735 | 9.03422 | 1.30325 | -ренатурат  (W=100%)  -потери | 9493,85  - | 9.03422 | 1.30325 | 145,7735  - | 100% | 94% |
| Стадия ТП-Очистка | | | | | | | | | | | |
| Ренатурат  Очищенный препарат  Очищенный препарат | 9493,85  9209,034  9116,94 | 145,7735  138,5723  137,1866 | 9.03422 | 1.30325 | Очищенный препарат (W=97%)  Очищенный препарат (W=99%)  Очищенный препарат (W=99%)  Потери от инактивации | 9209,034  9116,94  9025,77  474,6925 | 6,45420  4,70420  3,46420 | 1,26325  1,25125  1,23825 | 138,5723  137,1866  135,8114  9,9621 | 99%  99% | 93,12%  92,18%  91,26% |
| ИТОГО | 421.5324 | 421.5324 |  |  |  | 421.5324 |  |  | 421.5324 |  | |

**2.2 Расчет необходимого оборудования**

*Ферментер*

Объем производства препарата в сутки

Q1 = 60/365 = 0.164 т

Необходимое количество культуральной жидкости в сутки

Q2 = 0,164/0,6 = 0,273 м3 (273 литра)

Таким образом, выбираем ферментер объемом ~ 600 литров

Оптимальным для нашего процесса будет P – пилотный ферментер от компании BIOENGINEERING, объемом 1000 литров и рабочим объемом 650 литров.

Количество культуральной жидкости с одной ферментации при учете потерь во время ферментации (10%) составит

Q4 = 0,65\*0.5\*0.9 = 0.29 м3

Количество ферментации в сутки (n):

n = 0.273/0.45 = 0,6

Количество культуральной жидкости в год (Q5)

Q5 = 60/0,6 = 100 м3

Продолжительность оборачиваемости одного ферментера

- длительность ферментера – 16 часов

- слив к.ж. – 0,5 часов

- мойка ферментера – 1 час

- проверка ферментера на герметичность – 0,5 часов

- стерилизация ферментера – 3 часа

- заполнение ферментера питательной средой – 2 часа

- засев – 1 час

Количество рабочих часов в году

t2 = 365\*24 = 8760 часов

Необходимое количество ферментеров

N = 100\*24/0.29\*8760 = 0,9 ~ 1

Принимаем количество ферментеров – 1 и еще один запасной.

*Посевной аппарат*

Рабочий цикл

-длительность выращивания посевного материала – 12 часов

-засев в ферментер – 1 час

-мойка аппарата – 0,5 часов

-проверка на герметичность – 0,5 часов

-стерилизация пустого аппарата – 1 час

-стерилизация питательной среды – 1 час

-приготовление питательной среды в посевном аппарате – 1 час

Количество посевного материала на загрузку одного производственного ферментера:

Q6 = 0.65\*0.5\*0.021 = 0.0068 м3

Полный объем объем посевного аппарата при коэффициенте заполнения 0,6:

Q7 = 0.0068/0.6 = 0,011375 м3

Был выбран посевной аппарат фирмы ООО НПП «ТРИС» Biotron SP II объемом 15 литров.

*Расчет сборников культуральной жидкости*

Q9 = 0.273/0.8 = 0.341 м3

Согласно рассчитанным данным выбираем сборник стальной эмалированный, объемом 0,4 м3

Полезный объем сборника

Vп = 0,4\*0,8 = 0,32 м3

Количество сборников

n = 0.341/0.32 = 1.06 ~ 2 штуки.

Принимаем 2 сборника и один запасной. Всего сборников культуральной жидкости – 3 штуки.

*Расчет центрифуги*

Примем коэффициент заполнения барабана промышленной центрифуги – 0,75.

Q10 = 0.273/0.75 = 0.364 м3

Согласно данным выбираем центрифугу серии PSBD с нижней выгрузкой сухого остатка модели PSBD-540, объемом 0,4 м3, производство компании АЛСИ ФАРМТЕХ.

Полезный объем центрифуги

Vп = 0,4\*0,75 = 0,3 м3

Количество центрифуг

n = 0.364/0.3 = 1.21 ~ 2

Принимаем 2 центрифуги и одну запасную. Всего центрифуг – 3 штуки.

*Расчет сборников культуральной жидкости после центрифугирования*

Q11 = 0.273/0.8 = 0.341 м3

Согласно рассчитанным данным выбираем сборник стальной эмалированный, объемом 0,4 м3

Полезный объем сборника

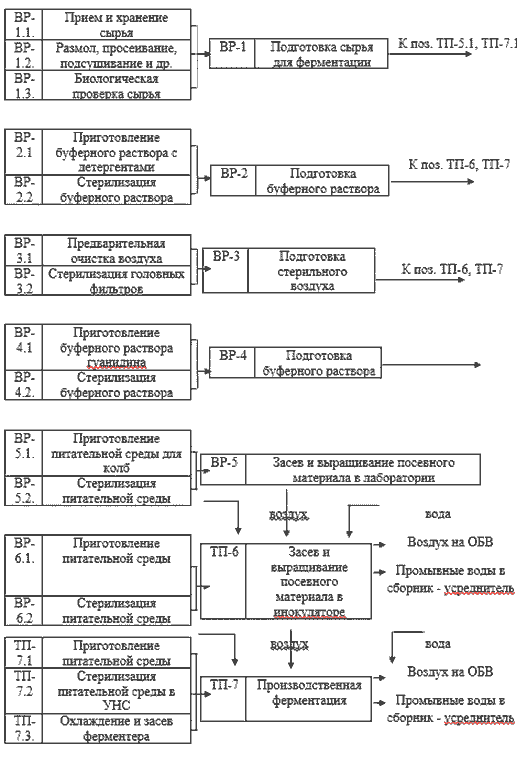
Vп = 0,4\*0,8 = 0,32 м3

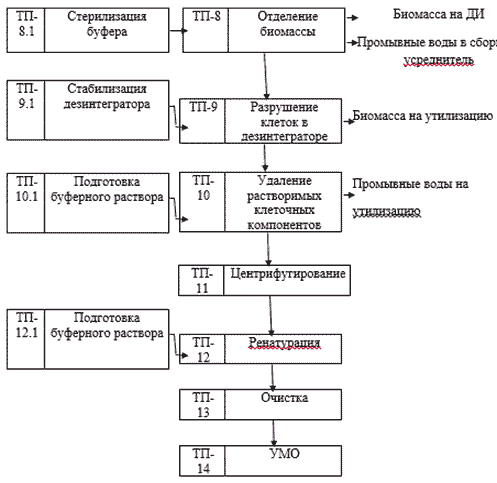
Количество сборников

n = 0.341/0.32 = 1.06 ~ 2 штуки.

Принимаем 2 сборника и один запасной. Всего сборников культуральной жидкости после центрифугирования – 3 штуки.

**2.3 Технологическая схема производства**





**Заключение**

Разработка методов получения лейкоцитарного и рекомбинантного интерферона в препаративных количествах, а также высокоэффективных методов их очистки открыла возможность применения этих препаратов в лечении вирусных гепатитов.

В настоящее время как у нас в стране, так и за рубежом выпускаются коммерческие препараты: человеческий лейкоцитарный, лимфобластный «Велферон» (Wellferon), фибробластный (Ферон); интерферон и интерфероны, полученные генно-инженерными методами: рекомбинантные альфа-(Роферон, Реальдерон и другие), бета- и гамма-интерферон (Гаммаферон).

Главным из ИНФ является ИФНг.

ИФНг — ключевой медиатор активации системы естественной цитотоксичности, регулирует процесс дифференцировки естественных киллерных клеток и их цитотоксическое взаимодействие с клетками-мишенями, стимулирует цитотоксические и регуляторные функции макрофагов, активирует цито-токсические лимфоциты.

Под действием ИФНг повышается продукция цитокинов, таких, как интерлейкин-1, интерлейкин-2, интерлейкин-12, ИФНв, и фактора некроза опухолей-б.

**Список использованных источников**

1. Н.П. Елинов. Основы биотехнологии. Для студентов институтов; аспирантов и практических работников. – СПб.: Наука, 1995 – 600 с.
2. Г.А. Гореликова. Основы современной пищевой биотехнологии. – Кемерово, 2004. – 100 с.
3. Тареева Т.Г., Брагина Г.С., Малиновская В.В. Виферон - рекомбинантный б2В-ИФН: применение в педиатрии. - М., 1997. - 78 с.
4. А.А. Красноштанова, И.А. Крылова, Е.С. Бабусенко. Основы биотехнологии. – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2001 – 84 с.
5. Г.Г. Гончаренко. Основы биотехнологии. Гомель: УО «ГГУ им. Ф. Скорины», 2008 – 282 с.
6. В.К. Османов, О.В. Бирюкова, А.В. Борисова. Методы выделения и очистки продуктов биотехнологических производств. – Нижний Новгород, 2005 – 27 с.
7. Романцов М.Г. Интерфероногены: перспективы клинического применения. - М.; СПб., 1998. - 38 с.
8. К.Г. Федосеев. Процессы и аппараты биотехнологии в химико-фармацевтической промышленности. – М.: Медицина, 1996. – 200 с.
9. М.Е. Бекер. Введение в биотехнологию. - М.: Пищ. Промышленность, 1978. – 232 с.
10. А.М.Белоусов, М.А. Ленский. Основы проектирования предприятий биотехнологической и бродильной промышленности. Нормы пожарной безопасности. - Бийск, БТИ АлтГТУ, 2005. - 198 с.
11. В.В. Бирюков. Основы промышленной биотехнологии. - М.: КолосС, 2004. – 296 с.
12. Перетрухина А.Т., Блинова Е.И. Бактерийные и вирусные препараты. - М.: Академия Естествознания, 2010. — 241 с.
13. В.А.Блинов. Общая Биотехнология. Курс лекций. – Саратов: ФГОУ ВПО "Саратовский ГАУ", 2003 – 162 с.
14. А.И.Божков. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты. – Харьков, 2005 – 364 с.
15. А.В.Буров. Основы биотехнологии. - СПб.: ГОУ ВПО СПБПУ РП. СПб., 2005. – 38 с.
16. Р.Г.Василов, В.Е. Лепский. Биотехнология и общество. Сборник материалов форума Биотехнология и Общество. - М.: Изд-во «Когито-Центр», 2010. – 159 с.
17. У.Э. Виестур. Биотехнология: Биотехнологические агенты, технология, аппаратура. – Рига: Зинатне, 1987. – 263 с.
18. А.Ю.Винаров, А.А.Кухаренко, В.И.Панфилов. Лабораторные и промышленные ферментеры. – М.: РХТУ, 2004. – 97 с.
19. Н.А.Войнов, Т.Г.Волова, Н.В. Зобова. Современные проблемы и методы биотехнологии. - Красноярск: ИПК СФУ, 2009.
20. Н.А.Войнов, Р.А.Степень, С.М.Воронин, Д.В. Буйко. Улучшение экологичности и повышение эффективности биохимических производств. - Химия растительного сырья. - 1998. - №1. - С. 33-43.
21. Т.Г.Волова. Биотехнология. - Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – 252 с.
22. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. - М.: Мир,2002. - 589 с.
23. Гончаренко Г.Г. Основы биотехнологии: учебно-методический комплекс для студентов биологических специальностей. - Гомель: УО «ГГУ им. Ф. Скорины», 2008. – 282 с.
24. Грачева И.М., Иванова Л.А. Биотехнология биологически активных веществ. - М., Издательство НПО «Элевар», 2006. – 453 с.
25. Гребенникова В.В. Биотехнология: сборник ситуационных задач с эталонами ответов. - Красноярск : тип. КрасГМУ, 2011. – 73 с.
26. Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию. Курс лекций. - Мн.: БГУ, 2002. - 105 с.
27. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. - — М.: Издательский центр «Академия», 2003. — 208 с.
28. Ермишин А.П. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика. - Мн.: Тэхналогія, 2005. —430 с.
29. Ефимова М.В. Введение в прикладную биотехнологию. - Петропавловск-Камчатский: КамчатГТУ, 2004. - 95 с.
30. Катлинский А.В. Курс лекций по биотехнологии. - М.: Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова, 2005. - 152 с.
31. Коростелева Н.И., Громова Т.В., Жукова И.Г. Биотехнология. - Барнаул: АГАУ, 2006. - 127 с.
32. Кошелев Ю.А. и др. Краткий курс биотехнологии. - Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2009. – 77 с.
33. Крылов И.А. Комплексная переработка биомассы промышленных микроорганизмов. – М., 2001. – 84 с.