

## КРИТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ: ЖИВЫЕ СИСТЕМЫ

*Ю.С. Севастьянов, В.П. Голубев, Д.Г. Победимский, Ю.Л. Рыбаков, Н.Е. Лазаренко*

*На основе аналитико-статистических и сравнительных исследований получен комплекс данных, позволяющих проведение оценки проектов, представленных на конкурс ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» (VIII этап), в частности, по приоритетному направлению «Живые системы».*

**Ключевые слова:** бионаноиндустрия, живые системы, критическая технология, нанобиотехнология.

В последние годы в России создан большой задел в сфере исследований и разработок по широкой номенклатуре направлений развития бионаноиндустрии. В ряде этих направлений сделаны первые шаги по коммерциализации результатов, что позволяет ожидать освоения и выпуска в коммерческих объемах целого ряда продуктов бионаноиндустрии. Важнейшими основами для решения этих проблем являются действующие критические технологии, которым и посвящается настоящая работа.

К таким направлениям бионаноиндустрии следует отнести:

- «умные» полимеры и биосовместимые материалы, защитные наноконпозиционные пленки и покрытия, молекулярные ансамбли и самоорганизующиеся слои, функциональные молекулы;
- диагностические системы для медицины, в том числе биочипы и хемодиагностикумы: наноустройства, хемо- и биодатчики для контроля за здоровьем и осуществления направленных медицинских воздействий на организм;
- нанофармакологию – лекарственные средства на основе наночастиц: разработка лекарственных препаратов с программируемым механизмом действия, новые биоматериалы; искусственные ферменты, антитела и заменители тканей организма;
- регуляторы функций живых систем с помощью наночастиц;
- генную инженерию и генотерапию.

Рассмотрим основные тенденции развития приоритетного направления «Живые системы» в 2008–2009 гг. по материалам научно-технического анализа конкурсных проектов на проведение НИР и выполнение технологических (ТР) и опытно-конструкторских работ (ОКР) в рамках открытых конкурсов ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы».

**Критическая технология «Биомедицинские технологии жизнеобеспечения и защиты человека» (прогресс в создании пандемических противогриппозных вакцин и технологии их производства).** Вакцинация является важным направлением в организации противодействия пандемии гриппа. Испытывая определенное технологическое отставание, наша страна остается ведущим производителем практически всего спектра актуальных вакцин в мировом секторе этой промышленности. Фактически все современные противогриппозные вакцины были впервые разработаны в СССР. Затем базовые технологии распространились в мире.

В настоящее время за рубежом ведутся работы по конструированию новых вакцин. Кандидат в вакцинные штаммы должен содержать хотя бы один признак патогенности. Для получения безопасной вакцины необходимо удалить эту детерминанту. При этом необходимо вирусный геном перевести в форму ДНК. Впервые это осуществлено нобелевским лауреатом Д.Балтимором для РНК-вируса полиомиелита. В отношении РНК-вируса гриппа этот подход получил название «обратной генетики».

Несколько научных групп в мире осуществляют конструирование вирусов, используя прием удаления на уровне ДНК последовательности, кодирующей сайты патогенности.

В последние годы в развитии технологии конструирования и производства противогриппозных вакцин существенно расширился как арсенал подходов, так и технологических решений. Ежегодная подготовка традиционных вакцин (живые гриппозные, цельновирионные, сплит- и субъединичные вакцины) включает в себя получение, прежде всего, вакцинных штаммов. Особенно технологии ориентируются на ускоренную разработку продуцентов антигенов и возможности модификации актуальных сезонных или пандемических вирусов.

Исследуются также ДНК-вакцины, рекомбинантные субъединичные вакцины (вирусы гриппа в качестве векторов или дефектных вирусов для непатогенных вакцинных штаммов) и универсальной вакцины на основе высококонсервативных антигенов M2, M1, NP (или индивидуальных вирусных генов).

Проявляется интерес к использованию систем продукции компонентов вакцин в растениях, особенно в культурах риса. Съедобные вакцины не только являются актуальными с точки зрения управления зоонозными резервуарами вирусов и бактерий, но имеют большое значение для ранней вакцинации при рождении человека и в младенчестве.

Высоко развиты стадии подготовки технологического процесса получения вакцин в Швеции. Компанией GE совместно с Институтом гриппа РАМН разработаны волновые биореакторы для ферментации. Существенно повышена производительность клеточных культур при выращивании вирусов. Созданы системы отбора клеток, концентрация и фильтрация с отделением фракций, содержащих целевой продукт.

**Критическая технология «Биокаталитические технологии».** Рассмотрим сравнительный анализ штаммов, используемых в процессе получения акрилата аммония.

В последнее время многие отечественные и зарубежные химические компании стали проявлять интерес к биокаталитическому способу синтеза солей акриловой кислоты. Это связано с постоянно возрастающей потребностью в сополимерах, содержащих этот мономер, а также со значительными преимуществами биотехнологического процесса в сравнении с традиционным химическим синтезом.

Имеющиеся публикации свидетельствуют об успешных лабораторных разработках, но информация о промышленном внедрении данной технологии за рубежом отсутствует. Основной проблемой является сложность культивирования штаммов-продуцентов и низкая нитрильная активность описанных биокатализаторов.

**Критическая технология «Биотопливо, серосодержащее топливо».** В качестве примера рассмотрим микробную десульфуризацию моторного топлива. Существует несколько объективных причин, заставляющих научное, экспертное и промышленное сообщества интенсивно искать пути десульфуризации нефти и моторного топлива (бензина, керосина).

Мировая тенденция такого поиска заключается в том, чтобы, по возможности, удалить серосодержащие соединения. Интересы экологии заставляют развитые страны вводить жесткие госстандарты на ограничение содержания серы в бензине и дизельном топливе. По стандарту США лимитируют в дизтопливе не более 15 ppm (в 2010 г. получено снижение до 10 ppm). Европарламент принял стандарт Евро-5 на содержание серы в дизеле и бензине — до 10 ppm.

В настоящее время глубокая десульфуризация дизельного топлива и бензина осуществляется путем HDS — процесса при высоком давлении водорода до 200 атм и использовании металлов группы Co-Ni-Mo. Предыдущее испарение примесей и биокаталитическая десульфуризация достигли уровня пилотных установок, что указывает на их инновационную продвинутость. Из 25 патентов десульфуризации топлива 12 посвящены сорбции серы из топлива и методам регенерации сорбента.

Данная работа осуществляется при нормальных условиях, не требует водорода и протекает с высокой селективностью.

К сожалению, пока метод биокаталитической десульфуризации может рассматриваться только на среднесрочную перспективу — 10–15 лет.

**Критическая технология «Энергетика и энергосбережение. Биотопливо».** Микробная десульфуризация моторного топлива. Конкурентные позиции в рассматриваемой тематике нефтепереработки занимают ГНИИ генетики и РГУ нефти и газа им. М.И. Губкина.

Однако это освоение новых менее капитальных по стоимости процессов и технологий, относящихся к нефтепереработке, выглядит еще «сыроватым».

Обсуждаются планы разработки ТЗ на создание технологического регламента BDS:

- выбор микроорганизмов, пригодных для процесса BDS;
- определение ограничений метода биологической десульфуризации;
- усовершенствование биокатализатора;
- разработка оптимальных способов десульфуризации.

Имеющийся уровень знаний недостаточен для немедленной организации индустриального биотехнологического процесса удаления серы из нефти и моторного топлива и может рассматриваться в среднесрочной перспективе (10–15 лет).

**Критическая технология «Биомедицинские технологии жизнеобеспечения и защиты человека».** Наблюдается прогресс в создании пандемических противогриппозных вакцин и технологии их производства. В России наиболее успешной частью противоэпидемических мероприятий в ограничении распространения инфекций с респираторным механизмом передачи является вакцинопрофилактика (эпизоотия «птичьего» гриппа, пандемия гриппа от вируса свиного происхождения и др.).

В работах головного биологического отечественного института – Института гриппа РАМН проводится анализ состояния проблемы конструирования и производства пандемических противогриппозных вакцин. Решение основной задачи определяется современной методологией по конструированию противогриппозных вакцин (техника реассортации уходит в прошлое) и по использованию подходов генной инженерии, обратной генетики и банков плазмид, несущих базовые вирусные гены. Современные технологии, предлагаемые консорциумами западных биокомпаний и Институтом гриппа РАМН, не только обеспечивают биобезопасность в лабораториях конструирования вакцинных вирусов, но и биобезопасность производства.

В развитии промышленного производства организации РФ ориентируются на следующие подходы:

- использование наночастиц и наноэмульсий в качестве функциональных адъювантов;
- создание полностью безопасных штаммов для живой гриппозной вакцины с делециями молекулярных детерминант патогенности.

Использование белковых и химических шаперонов для обеспечения самосборки молекул гемагглютинирина вируса H1N1v2009 и импрегнации целловирионных препаратов, включая наночастицы в клеточную систему для усиления антигенных свойств.

Отметим, что наиболее заметными достижениями в отечественной вирусологии и иммунологии являются получение полной функциональной копии Курганских изолятов вируса гриппа птиц H5N1 с использованием методов рекурсивной ПЦР, обратной генетики и создание технологии универсальной вакцины на основе белка M2.

**Критическая технология «Генотерапия».** Использование наночастиц на основе производных гидрокортизона в качестве векторов для доставки генетического материала в эукариотические клетки *in vivo*.

Лидирующие позиции здесь занимает НИИ экспериментальной медицины РАМН.

Различают физические, химические и биологические способы доставки генетических конструкций в клетки. Физические подходы *in vivo* реализуются путем использования электрического поля для внедрения ДНК в клетки. Применяются специальные микросферы или химически сконструированные липосомные частицы (Московский институт тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова).

Наиболее перспективны биологические методы доставки ДНК, особенно способом с использованием клеточных рецепторов, которые специфически взаимодействуют с комплекс-

ными соединениями под названием лиганд-полимеры или белки. В этом случае после взаимодействия рецептора с лигандом рецептор способен внедрять лиганд в цитоплазму – рецепторный эндоцитоз. Именно этот процесс представляется интересным с точки зрения решения проблемы генной терапии.

Описаны десятки лиганд-рецепторных пар. Поэтому изучение новых пар является перспективной задачей. В качестве первого кандидата выбран стероидный глюкокортикоидный гормон – гидрокортизон, способный включаться в ядро клеток на основе катионных полимеров – полилизина, полиэтиленимин-протамина и др.

Создание таких векторных комплексов наночастиц на основе катионных полимеров, модифицированных гидрокортизоном, и плазмид с целевыми маркерными генами с последующей их экспрессией – цель дальнейших исследований.

Алгоритм технологического синтеза включает в себя следующие стадии:

- синтез конъюгатов (пар);
- хроматографический анализ конъюгатов;
- взаимодействие полученных производных с ДНК;
- оптимизация размеров наночастиц до 30 нм, содержащих единичные молекулы плазмидной ДНК;
- введение в систему комплексования дополнительного компонента – лактоферрина для формирования наночастиц с молекулярными размерами;
- проведение процесса трансфекции наночастиц (трансмембранные и ядерноклеточные процессы);
- исследование доставки плазмидной ДНК в клетки печени и почек мышей.

По данному направлению работ целесообразно получить грантовую поддержку Минобрнауки России.

В последнее время расширяются возможности медицины и фармакологии. Для ряда заболеваний создаются новые методы лечения без применения хирургии или лучевой терапии, сохраняющие пациенту не только жизнь, но и качество жизни после их использования. Одной из ведущих областей применения названных средств является онкология. Использование систем избирательной доставки лекарств защищает организм от нежелательных эффектов. Это направление занимает особое место в научно-педагогической деятельности МИТХТ им. М.В. Ломоносова.

Все зарубежные исследовательские агентства сходятся во мнении, что фармацевтика будет являться основным сегментом медицинских применений нанотехнологий, обеспечивая 80 – 90 % всего рынка нанотехнологий в медицине. При этом, по оценкам NanoMarkets и Scientifica, соответственно, в 2012 г. объем мирового рынка адресной доставки лекарств будет составлять от 5 до 26 млрд долл. (см. рисунок).

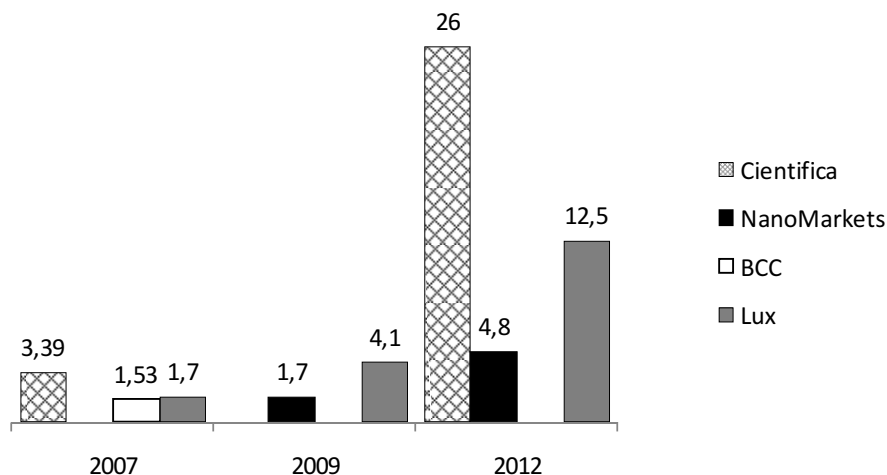
Более половины фармацевтических компаний-производителей, работающих в области наномедицины, используют нанотехнологии для разработки систем доставки активных лекарственных веществ к органам и тканям-мишеням.

Российские разработки в данной сфере в целом соответствуют мировому уровню, а российские производители и зарубежные глобальные корпорации в дальнейшем будут иметь равные шансы на лидерство. На внешнем рынке средств адресной доставки лекарств российские предприятия и организации смогут завоевать долю в 25 %.

**Критическая технология «Биоинженерия и биоматериалы».** Использование биосовместимых материалов из регенерированного шелка для тканевой инженерии и лекарственной терапии. Лидирующие позиции в этой области занимают биофак МГУ им. М.В. Ломоносова, а также ФГУ НЦ трансплантологии и искусственных органов Минздравсоцразвития России.

В российской научной литературе *шелком* называют материал, продуцируемый гусеницами бабочек-шелкопрядов.

Хотя по числу публикаций отечественные авторы заметно уступают зарубежным, вместе с тем имеются сведения о значительном прогрессе в рассматриваемой тематике целого ряда



Оценки мирового рынка систем адресной доставки лекарств в 2007–2012 гг., млрд долл.

известных организаций, имевших крупные инвестиционные объемы финансирования на проведение исследований и разработок в известнейшем для экспертного сообщества международном фонде – Международном научно-техническом центре (исполнитель – ФГУП ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов) и в российском фонде РФФИ. Практически это означает, что российские исследователи достигли мирового уровня в развитии потенциала производства биосовместимых материалов.

**Критическая технология «Биокаталитические технологии».** Сравнительный анализ штаммов, используемых в процессе получения акрилата аммония. Лидирующие позиции в разработке этой тематики занимает ГНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, а также компания «Биоамид» (Саратов).

Компания «Биоамид» разработала и успешно применяет в промышленности биокатализатор на основе штамма *Alcaligenes denitrificans* С-32 – продуцента нитриказы. С целью дальнейшего совершенствования биокатализатора путем направленной селекции получен штамм ВКПМ В-9582 с более высокой нитриказной активностью.

Исследователи провели сравнительное изучение вновь созданного штамма и его предшественника ВКМ В-2243D применительно к гидролизу нитрила акриловой кислоты.

Был использован следующий алгоритм процесса:

- получение и культивирование нативных клеток штаммов (культивирование исполняли в условиях реализации схемы масштабирования и дробной подачи ацетата аммония и добавок ацетата)

- определение нитриказной активности (количество фермента на образование 1 мкмоль акриловой кислоты за 1 мин.);

- оценка влияния  $t^{\circ}$ , рН, субстратной специфичности, добавок тиоловых и хелатирующих реагентов, ионных частиц.

На основании исследований оптимизированы условия для биотрансформации акрилонитрила в акрилат аммония с использованием рассматриваемых штаммов:  $32^{\circ}$  С и рН 9,6. Полученные штаммы имеют патент РФ. Ферменты обоих штаммов идентичны.

Представленный проект фактически реализует инновационную стадию организации промышленного производства акриламида и полиакриламида.

Патент ГНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов реализован в Южной Корее и в Пермском крае.

Таким образом, в настоящее время отечественными исследователями создан научный задел по широкой номенклатуре направлений развития бионаноиндустрии.