

Тема лекции: Рекомбинантные белки и полипептиды. Инсулин, видоспецифичность, иммуногенные примеси. Традиционные и генно-инженерные методы получения. Стандартизация препаратов инсулина. Конструирование продуцентов и микробиологический синтез гормона роста человека. Технологии получения и стандартизация препаратов рекомбинантного эритропоэтина.

Производство рекомбинантных белков (РБ) стал возможным благодаря генной инженерии. РБ – это белки, производимые с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Первым рекомбинантным белком, полученным методом биосинтеза является инсулин (1978 г.). В настоящее время объем мирового рынка препаратов на основе РБ белков составляет 200 млрд. долларов. Более 100 белков человека могут производиться методом биосинтеза. Использование технологии рекомбинантной ДНК решает проблему дефицита животного сырья, позволяет нарабатывать лекарственные средства в необходимом количестве с высокой частотой.

Перечень наиболее распространенных РБ производимых на основе кишечной палочки: инсулин, соматотропин, интерфероны, интерлейкины, урокиназа, сериновая протеаза и др. На основе трансформированных клеток яичника золотистого хомячка китайского получают эритропоэтин.

Продуценты рекомбинантных белков. Первым биообъектом для получения РБ явилась кишечная палочка (*E. Coli*). Получаемый белок оставался внутри клетки и был мало доступен для протеаз для выделения белков, следовательно, необходимо было разрушать клетку, что весьма трудоемко и затрудняет очистку продукта. Затем стали использовать сенную палочку (*Bac. subtilis*), дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*), псевдомонады (*Pseudomonas*). У них секреция белков происходит в культуральную жидкость, это является положительным моментом, так как не нужно проводить трудоемкую стадию по разрушению клеток для выделения белков.

Этапы создания рекомбинантной ДНК

1. Рестриктазное расщепление ДНК, вырезание необходимого фрагмента ДНК (гена) из исходной ДНК организма-донора. Можно так же синтезировать нужный ген.

2. Определение точных границ гена.
3. Обработка рестриктазами вектора для клонирования, который будет реплицироваться в клетке хозяина (плазмида, бактериофаг).
4. Сшивание лигазой двух фрагментов ДНК с образованием рекомбинантной ДНК.
5. Введение рекомбинантной ДНК клетку-хозяина. Этот процесс называется трансформацией.
6. Идентификация и отбор клеток, несущих рекомбинантную ДНК.
7. Получение специфического белка, синтезированного трансформированными клетками хозяина.

Производство инсулина

Инсулин – пептидный гормон поджелудочной железы. Регулирует углеводный обмен и поддерживает уровень сахара в крови. Самым первым инсулином был инсулин, полученный из поджелудочной железы свиней и крупнорогатого скота. При этом инсулины содержали примеси проинсулина, глюкогона, самостотина и др. Поэтому препараты были аллергенны. Кроме того, животные инсулины отличались от человеческого инсулина по аминокислотному составу: свиной инсулин содержит в В-цепи в положении 30 – аланин, в человеческом содержится треонин. Говяжий отличался тремя аминокислотами: 2 в А-цепи и 1 в В-цепи. Инсулины видоспецифичны. Видоспецифичность связана с изменениями на участке 8-10 А-цепи. Инсулин человека имеет последовательность аминокислот: тирозин-серин-изолейцин, говяжий инсулин: аланин-серин-валин. Инсулин состоит из двух пептидных цепей. А-цепь человеческого инсулина содержит 21 аминокислоту, В-цепь – 30 аминокислот. Обе цепи соединены дисульфидными мостиками. Третий дисульфидный мостик находится внутри А-цепи между остатками цистеина.

Способы получения человеческого инсулина

1. Синтетический (биохимический).
2. Биосинтетический (генно-инженерный).

Синтетический метод заключается в замещении С-концевой кислоты аланина в свином инсулине на треонин. Данный метод редко используется.

Биосинтетический метод связан с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Данный метод может проводиться двумя вариантами:

- А) Через биосинтез проинсулина с дальнейшим выделением инсулина.

Б) Раздельный биосинтез двух цепей инсулина с последующим их объединением химическим синтезом.

Биосинтез инсулина через проинсулин. Стадии.

1 стадия. Конструирование рекомбинантной ДНК.

Рекомбинантная ДНК должна содержать последовательность нуклеотидов, кодирующих А- и В-цепи инсулина и соединяющий их С-пептид (35 аминокислот). Далее идет сигнальный участок и промотор. Она так же должна содержать ген устойчивости к β -лактамам антибиотикам.

2 стадия. Ферментация.

Процесс происходит в биореакторах, с использованием трансформированной *E. Coli*. Используют традиционные для микроорганизмов питательные среды с постоянной аэрацией. В начале биосинтеза наращивают биомассу до определенных количеств, затем в среду вносят индуктор, который запускает внутриклеточный механизм активации гена, кодирующего информацию об инсулине. Оптимальная температура 39°C, процесс длится до 12 часов.

3 стадия. Выделение из биомассы синтезированного рекомбинантного белка.

3.1. Отделение биомассы от культуральной жидкости путем центрифугирования.

3.2. Разрушение клеток механическим ультразвуковым или другим действием.

3.3. Удаление водорастворимых белков путем отмывания массы буферными растворами.

3.4. Растворение осадка рекомбинантного белка концентрированным раствором мочевины.

3.5. Осветление раствора на центрифуге.

3.6. Очистка раствора от механических примесей методом мембранной фильтрации.

3.7. Отделение рекомбинантного белка от других белков методом ионообменной хроматографии.

3.8. Обессоливание гибридного белка методом гель-фильтрации.

3.9. Концентрирование белка ультрафильтрацией.

3.10. Лиофильная сушка белка или осаждение солями цинка.

4 стадия. Химическая и ферментативная трансформация рекомбинантного белка.

4.1. Отделение проинсулина от молекулы гибридного белка гидролизом бромцианом в концентрированной муравьиной кислоте.

4.2. Сульфитолиз – это разрушение неправильно расположенных дисульфидных связей в проинсулине.

4.3. Ренатурация – правильное замыкание дисульфидных связей.

4.4. Отделение С-пептида ферментативным гидролизом от инсулина.

4.5. Выделение инсулина лиофильной сушкой или осаждением солями цинка.

Стандартизация инсулина

На субстанцию инсулина и его лекарственные формы имеются фармакопейные статьи. Препараты инсулина классифицируются по видовой специфичности (свиной, говяжий, рекомбинантный человеческий), степени очистки (очищенный, высокоочищенный, кристаллизованный), длительности действия (короткого действия 5-8 ч., пролонгированного действия 18-30 ч.). В инсулине определяется содержание основного вещества (биологическим методом, методом ВЖХ), нормируются сопутствующие примеси, родственные пептиды, консерванты и другие вспомогательные вещества. Подлинность определяется методом пептидного картирования. Проводятся испытания на пирогенность.

Соматотропин

Соматотропин – это гормон роста человека, секретируется передней долей гипофиза. Впервые выделен в 1963 году из гипофиза трупного материала. Недостаток гормона в организме приводит к гипофизарной карликовости.

Проблемы производства из животного сырья

1. Дефицит трупного материала.

2. При получении выделяется несколько форм гормона, к которым у детей могут вырабатываться антитела.

3. Возможно заражение выделенного гормона вирусами.

Поэтому в настоящее время соматотропин получают методом биосинтеза с использованием технологии рекомбинантной ДНК.

Соматотропин – это одноцепочечный полипептид, содержит 191 аминокислоту.

Стадии биосинтеза соматотропина

На первой стадии конструируют рекомбинантную ДНК в два этапа: на первом этапе расщеплением рестриктазами получают кодирующую аминокислотную последовательность, за исключением первых 23 аминокислот. На втором этапе получают синтетический ген, который кодирует аминокислотную последовательность от 1 до 23. Затем оба фрагмента генов объединяют вместе и включают к паре промоторов и участку связывания рибосом.

На второй стадии рекомбинантную ДНК соматотропина вводят в клетку кишечной палочки. Проводят отбор трансформированных клеток, несущих рекомбинантную ДНК.

На третьей стадии в биореакторе на традиционных питательных средах для микроорганизмов проводят культивирование трансформированных клеток *E. Coli* в аэробных условиях.

На четвертой стадии проводят отделение биомассы кишечной палочки от культуральной жидкости.

На пятой стадии проводится выделение соматотропина из клеток кишечной палочки путем их разрушения химическим способом (раствор натрия гидрокарбоната, pH 11).

На шестой стадии проводится очистка соматотропина от бактериальных белков с помощью моноклональных антител.

Соматотропин выпускается в виде лиофилизированных порошков для инъекционных растворов. Препараты «Биосома», «Генотропин», «Хуматром» и др.

Эритропоэтин (ЭПО)

Представляет почечный гормон гликопротеиновой природы. Является физиологическим регулятором продукции эритроцитов.

Зрелый белок ЭПО состоит из 166 аминокислот. Имеется 2 сульфидные связи и 4 олигосахариды ковалентно связанные с аспарагинами 24, 38, 83 и с серином в 126 положении.

Для биоактивности рекомбинантного ЭПО важными являются 4 области: аминокислоты 11-15; 44-51; 100-108; 147-151.

Остатки углеводов не определяют активность гормона, ни его специфичность. Они служат для предотвращения преждевременного удаления ЭПО из циркуляции в организме.

Для получения нативного ЭПО используется плазма крови и моча с высоким содержанием гормона. Естественным источником для получения человеческого ЭПО служит моча пациентов с тяжелыми формами анемии.

Концентраты мочи получают с помощью методов адсорбции, осаждения этанолом, мембранной фильтрацией, и ионообменной хроматографией. Очищенный концентрат высушивают с помощью лиофильной сушки.

В настоящее время ЭПО получают по технологии рекомбинантной ДНК, продуцентом рекомбинантного ЭПО является не микробная клетка, а животная клетка. Используются клетки яичника китайского золотистого хомячка. На первом этапе из ДНК донора выделяют ген ЭПО. Затем с помощью вектора, в который включен ген ЭПО. Он вводится в животную клетку, затем выделяются клетки, которые синтезируют ЭПО. Проводится выращивание трансформированных клеток в биореакторах на питательных средах специфичных для животных клеток. Длительность биосинтеза 30 часов. По окончании биосинтеза отделяют культуральную жидкость, в которой содержится ЭПО, очищают ее методом мембранной фильтрации 0,8 мкм. Проводят очистку иммунно-аффинной и ионообменной хроматографии и получают лекарственную форму (инъекционные). Выпускается ЭПО рекомбинантные: эпоэтин альфа, эпоэтин бета, эпоэтин омега. Применяют для лечения анемии различного происхождения (гемодиализ, лечение цитостатиками).