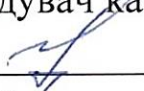


**ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКІВ**

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

 (Борисюк І.Ю.)

“ 27 ” серпня 2021 р

МЕТОДИЧНА РОЗРОБКА ПРАКТИЧНОГО ЗАНЯТТЯ

Факультет: фармацевтичний

Навчальна дисципліна «Фармацевтична біотехнологія»

Семінарське заняття №7 Тема: **«Фармацевтична біотехнологія отримання гормональних препаратів.»**
для аспірантів

Практичне заняття розробив:
асистент



(Акішева А.С.)

підпис

Практичне заняття обговорено на
методичній нараді кафедри
«27» серпня 2021 р.
Протокол № 1

Одеса – 2021

Тема: Фармацевтична біотехнологія отримання гормональних препаратів.

Мета: Ознайомитися з основними особливостями біотрансформації (біоконверсії) стероїдних сполук.

Основні поняття: гормони, стероїдні гормони.

Обладнання: згідно до вимог Належної аптечної практики (GPP).

Навчальний час: 4,0

План

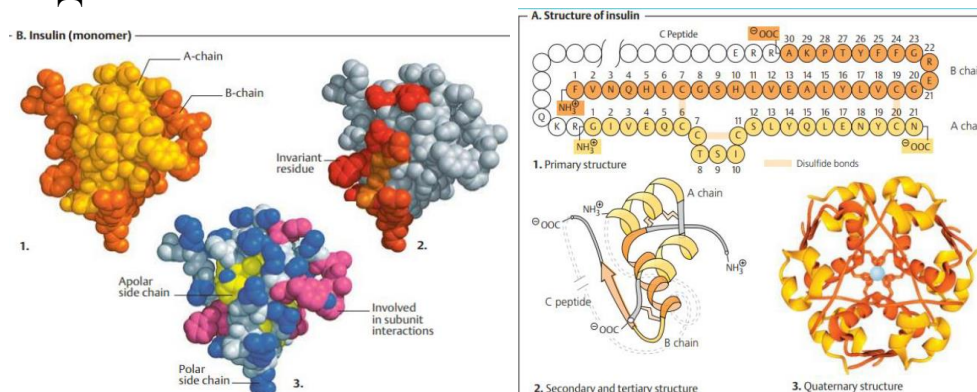
I. Організаційний момент

Зміст теми

Виробництво препаратів інсуліну

Інсулін - гормон білкової природи, що виробляється клітинами острівців Лангерганса підшлункової залози для підтримки гомеостазу глюкози в крові. Кодують цей білок 70% м-РНК, виділених з цих клітин.

БУДОВА ІНСУЛІНУ



Нестача інсуліну в крові внаслідок придбаних або успадкованих факторів призводить до захворювання на цукровий діабет. Це системне захворювання, неминуче веде до погіршення якості життя, а без лікування - до смерті. Відомо, що людський інсулін являє собою поліпептид з молекулярною масою 5808, що складається з 51ї амінокислоти, які утворюють дві поліпептидні ланцюги, з'єднані дисульфідними містками. Одна ланцюг, яка називається А містить 21 амінокислоту, другий ланцюг - В містить 30 амінокислотних залишків. Амінокислотний склад ланцюгів видоспецифічен. Пептидні ланцюги А і В з'єднані за допомогою двох дисульфідних містків (SS), які необхідні для прояву гормональної активності інсуліном (їх руйнування призводить до втрати активності). Попередник інсуліну продукується всередині β - клітин за допомогою ДНК і РНК-керovanого синтезу. Синтезується інсулін у вигляді однопептидної попередника - препроінсуліну (107 амінокислотних залишків), що містить кінцевий сигнальний пептид (23 амінокислотних залишку) і 35звенний з'єднувальний пептид (Спептіда). При видаленні сигнального пептиду в клітці утворюється проінсулін з 86 амінокислотних залишків, в якому

ланцюга інсуліну (А і В) з'єднані Спептіда, що забезпечує їм необхідну орієнтацію при замиканні дисульфідних зв'язків. Довгий ланцюг проінсуліну в апараті Гольджі упаковується в гранули, де в результаті гідролізу видаляються чотири амінокислоти з утворенням інсуліну і зв'язує Спептіда. Інсулін і Спептіда в еквівалентних концентраціях секретіруються відповідь на всі стимулятори секреції інсуліну (глюкоза, маноза). Після протеолітичного відщеплення Спептіда утворюється інсулін. У гранулах клітин інсулін депонується у вигляді кристалів, що складаються з двох атомів цинку і шести молекул інсуліну. Цинк, концентрація якого в β - клітинах острівців Лангерганса досягає високих значень, формує комплекси з інсуліном. Інсулін всіх хребетних утворює димери за допомогою водневих зв'язків між пептидними групами залишків В24 і В26 двох мономерів, які при високих концентраціях гормону, в свою чергу, реорганізуються в гексамери, що містять по два атоми цинку в кожному. Наявність таких високоупорядочених комплексів істотно полегшило вивчення кристалічної структури інсуліну. При фізіологічних концентраціях інсулін перебуває в мономерній формі. Цукровий діабет за поширеністю і тяжкості посідає третє місце після серцево-судинних і онкологічних захворювань. З огляду на тяжкість захворювання діабетом, стає зрозумілим, чому вже більше 100 років проводяться різнопланові дослідження зі створення та вивчення препаратів інсуліну. У зв'язку з цим становить інтерес історія створення лікарських препаратів інсуліну:

- 1902 г. - лікар І. М. Соболев встановив, що рівень цукру в крові людини регулюється спеціальним гормоном підшлункової залози:

- 1921 г. - вперше інсулін був виділений з підшлункової залози в чистому вигляді канадськими вченими Бантінгом Ф. і Бестом Ч., і застосований в Торонто з високим ефектом для лікування 10-річного хлопчика, хворого на діабет:

- 1923 г. - фірмою «Eli Lilly» (США) промислово отриманий інсулін з підшлункової залози великої рогатої худоби і свиней. Інсулін з великої рогатої худоби має дещо більшою антигенно-стю для людини в порівнянні зі свинячим інсуліном (з 1200 кг підшлункової залози можливо отримати близько 100 г кристалічного інсуліну). Інсулін з підшлункової залози великої рогатої худоби відрізняється трьома амінокислотами від інсуліну людини, свинячий - однією амінокислотою. Інсулін, виділений з підшлункової залози тварин, використовували до початку 80-х років ХХ століття:

- 1935 г. - Хагедорна Г. Х. в Данії оптимізував дію інсуліну в організмі, запропонувавши пролонгований препарат - протамінцінкінулін (вводили один раз на добу):

- 1952 г. - отриманий гомогенний кристалічний інсулін, званий однокомпонентним:

- 1954 г. - англійський біохімік Сенджер Г. отримав Нобелівську премію за встановлення структури інсуліну:

- 1963- 1965 р.р. - трьома колективами дослідників в США, Китаї та ФРН, а на початку 70-х років радянськими вченими здійснено синтез обох ланцюгів і їх з'єднання дисульфідними зв'язками для отримання інсуліну. Даний метод синтезу не знайшов промислової реалізації в зв'язку з низьким виходом, високою ціною і складністю проведення синтезу поліпептидного гормону, що складається з десятків амінокислотних залишків:

- 1980 р - датська компанія «Novo» розробила метод перетворення інсуліну свині в інсулін людини шляхом ферментативного заміщення 30го залишку аланіну в ланцюзі У на залишок треоніну. Надалі проводили хроматографічне очищення продукту, чистота якого була не нижче 99%. Обидва інсуліну не відрізнялися за активністю і часу дії. Тільки в кінці 50-х, початку 60-х років ХХ століття були з'ясовані відмінності структури людського інсуліну від інсулінів тваринного походження, які викликали алергічні реакції. Результати даних досліджень лягли в основу розробок промислового отримання інсуліну людини. В даний час основними способами отримання інсуліну, ідентичного людині, є напівсинтетичний і генно-інженерний. Можливість створення людського інсуліну стала реальною тільки після встановлення факту, що біосинтез інсуліна в клітках островкової тканини відбувається за такими основними етапами:

- закодована інформація про структуру інсуліну міститься в гені інсуліну (ділянка ДНК) 11й хромосоми:

- в результаті стимулюючої дії, перш за все глюкози і деяких інших речовин, ця інформація списується РНКполімеразой з інсулінового гена у вигляді мРНК на рибосомах, в яких здійснюється з'єднання амінокислот з утворенням білків. На рибосомах відбувається збірка поліпептидного ланцюга з 109 амінокислот з утворенням препроінсуліну під впливом рестриктаз, в результаті утворюються фрагменти від декількох сотень до декількох тисяч нуклеотидів:

- при синтезі препроінсуліну в -клітинах підшлункової залози перші 23 амінокислоти «проводять» молекулу через мембрану клітини. Ці амінокислоти відщеплюються рестриктазами і утворюється пептид проінсулін, що складається з 86 амінокислот. Молекула проінсуліну згортається таким чином, що початковий і кінцевий її сегменти зближуються, а центральна частина молекули видаляється під впливом ферменту рестрикції. Роботи по генно-інженерного отримання інсуліну почалися з 1978 року, когдa появилося повідомлення (США) про отримання штаму кишкової палички, яка продукує щурячий проінсулін. У 1978 році були синтезовані окремі ланцюга людського інсуліну за допомогою експресії їх синтетичних генів в клітинах

Е. Coli. Кожен з отриманих синтетичних генів підлаштовувався до 3'концу гена ферменту

-галактозидази і вводився в векторну плазмиду (pBR322). Клітини Е. Coli, трансформовані такими рекомбінантними плазмідами, виробляли гібридні (химерні) білки, що складаються з фрагмента галактозидази і А або В пептиду інсуліну, приєднаного до неї через залишок метіоніну. При обробці химерного білка бромціаном пептид звільняється. Однак замикання дисульфідних містків між освіченими ланцюгами інсуліну відбувалося з працею. У 1981 році синтезований генаналог проінсуліну - міні Спроінсулін, в якому 35звенний Спептіда був замінений на сегмент з шести амінокислот: АргАргГліСерЛізАрг і показана його експресія в Е. Coli. У 1980 році У. Гілберт з співробітниками виділили м-РНК інсуліну з пухлини клітин підшлункової залози щура і за допомогою зворотної транскриптази отримали з неї кДНК. Отриману кДНК вбудували в плазмиду pBR322 Е. Coli, в середню частину гена пеніцилінази. Рекомбінантна плазмида містила інформацію про структуру проінсуліну. В результаті трансляції мРНК в клітинах синтезувався гібридний білок, що містить послідовності пеніцилінази і проінсуліну, який вищепляється з такого білка трипсином. У 1980 році американськими вченими Міллером і Бакстером билвпервие описаний процес клонування людського гена в Е. Coli з подальшою індукцією і отриманням білка інсуліну, ідентичного людському. У промислових умовах рекомбінантний інсулін вперше був отриманий американською фармацевтичною компанією «Eli Lilly» спільно з біотехнологічної компанією «Genentech» (США) і продукт був випущений на ринок в 1982 р. При виробництві людського інсуліну використана технологія рекомбінантних ДНК: поміщають кДНК гена людського проінсуліну в Е. Coli або *S. cerevisiae* гідролізують отриманий проінсулін до молекули інсуліну. В цей же час компанія «NovoNordisk» (Данія) розробила технологію отримання генно-інженерного інсуліну людини, засновану на використанні генетично модифікованих дріжджових культур в ролі суперпродуцентів інсуліну людини. Використання еукаріот, що мають схожу з людською систему процесингу білків в ролі продуцентів інсуліну, дозволило отримати гормон або його попередник в нативної формі. Значною перевагою даної технології є повна відсутність в препаратах бактеріальних токсинів і пірогенів клітинної стінки. Незважаючи на всі ці переваги, отримання інсуліну з використанням бактеріальних штамів суперпродуцентів залишається кращим завдяки більш високому рівню експресії інсуліну в складі гібридного білка.

В даний час генно-інженерний інсулін виробляють шляхом ферментації генетично змінених мікроорганізмів: кишкової палички або дріжджів, які здатні синтезувати попередник інсуліну (проінсулін) в складі химерного протеїну. З отриманого биосинтетическим шляхом проміжного продукту реконструюють інсулін людини (ензиматичними шляхом) за наступною

схемою: культивування штаму з вбудованим геном гібридного білка, що включає повну послідовність інсуліну людини:

очищення і ренатурації гібридного білка:

протеолітичну розщеплення гібридного білка з отриманням інсуліну:

очищення інсуліну. Дана схема багато в чому нагадує процес біосинтезу інсуліну в островках Лангерганса, де гормон спочатку з'являється у вигляді білка попередника (проінсуліну), а потім протеолітичними ферментами від проінсуліну відщеплюється з'єднувальний Спептіда. У виробництві для розщеплення гібридного білка використовують сходні по специфічності ферменти: трипсин і карбоксипептидазу В. Гідроліз проводять шляхом обробки ферментами послідовно або одночасно. Прикладом отримання рекомбінантного інсуліну є технологія, запропонована російськими вченими з ВАТ «Національні біотехнології», Інституту біоорганічної хімії РАН і Державного інституту кровозамінників та медичних препаратів. Ними був створений штам-продуцент гібридного білка *E. Coli JM109 / pPINS07*. На рис. 16 представлена біотехнологічна схема отримання рекомбінантного інсуліну.

Біотехнологічна схема отримання рекомбінантного інсуліну

Технологія отримання рекомбінантного інсуліну включає наступні стадії:

хімічний синтез ДНК послідовностей, що кодують продукцію А і В ланцюгів:

ці послідовності нуклеотидів вбудовуються в *lacZ* ген *E. Coli*, що кодує частина молекули ферменту бетагалактозидази, *lacZ* ген знаходиться в складі *pBR322* плазміді:

кожну з плазмід з *lacZ* геном і А (або В) ланцюгом вводять в окремий штам *E. Coli*:

штами- продуценти культують окремо в двох біореакторах, трансформовані *E. Coli* продукують химерні білки, що складаються з ковалентно пов'язаних молекул рекомбінантного білка (А чи Вцспі) і власного білка ешерихій:

- виділивши химерні білки, їх обробляють бромціаном, роз'єднує білки по залишках метіоніну. Далі А і В ланцюга відокремлюються від білків ферменту бетагалактозидази і очищаються:

- очищені А і В ланцюга з'єднуються дисульфідними зв'язками, отримують дволанцюжкові, біологічно активний мономер інсуліну.

З вирощеного біомаси виділяється попередник інсуліну, гібридний білок, експресуємий в кількості 40% від усього клітинного білка, що містить препроінсуліну. Перетворення його в інсулін *in vitro* здійснюється в тій же послідовності, що і *in vivo* - відщеплюється ліпідіруючий поліпептид, препроінсулін перетворюється в інсулін через стадії окислювального

сульфітоліза з подальшим відновлювальним замиканням трьох дисульфідних зв'язків і ферментативним вичленуванням зв'язує Спептіда. Як видно зі схеми, для очищення інсуліну використовують різні види хроматографічних очисток: іонообмінні, гель-фільтраційні і ВЕРХ, що дозволяє отримати інсулін високим ступенем чистоти. Використання афінної хроматографії значно знизило зміст в препараті баластних білків з молекулярною масою більшою, ніж у інсуліну. До цих білків відноситься проінсулін і частково розщеплені проінсуліну, які здатні індукувати вироблення антиінсулінових антитіл. Особливу роль відіграє оброщенофазова ВЕРХ. Використання ВЕРХ є кращим в великомасштабному виробництві, оскільки метод позбавлений ряду недоліків, властивим іншим видам хроматографії (наприклад, іонообмінних хроматографії відрізняє тривалість очищення за рахунок низьких значень тиску:

висока собівартість методу за рахунок низької ємності сорбентів і їх високу вартість). Визначальними факторами при проведенні оброщенофазової ВЕРХ є: рН рухомої фази, температура, добавки для введення в рухому фазу, максимальне навантаження на хроматографічну колонку і ін. Однією з основних проблем у виробництві генно-інженерного інсуліну людини є очищення інсуліну від родинних пептидів, зокрема від А21-дезамідоінсуліна, що відрізняється від інсуліну дезамідованим аспарагін в двадцять перший положенні А ланцюга. Зміст інсуліноподібний домішок і А21-дезамідоінсуліна в фармакопейних субстанціях інсуліну людини жорстко регламентується. У Російській Федерації питаннями отримання генно-інженерного інсуліну займається ряд вчених, в тому числі, і фахівці ВАТ «Національні біотехнології». Ними запропонована промислова схема отримання препарату інсуліну людини на основі штаму *E. Coli* 163JM109 / рHINS11. На думку авторів, використання запропонованого ними штаму має ряд переваг перед штамом *E. Coli* JM109 / рPINS07, який розглядався нами раніше. Так, згідно з рис. 16 видно, що при використанні штаму *E. Coli* JM109 / рPINS07 отримання рекомбінантного інсуліну зводиться до наступного: культивування штаммапродуцента *E. Coli* JM109 / рPINS07, руйнування бактеріальних клітин дезінтеграцією, відділення тілець включення, що містять гібридний білок, їх розчинення в буфері, що містить сечовину і дітіотреїтолу, кислотне осадження домішкових сполук, очищення гібридного білка хроматографією на КМ-сефарозе, розщеплення гібридного білка трипсином і карбоксипептидази Восуществляють послідовно, при цьому продукти трипсинолізу хроматографірують на СПсефарозе, а отриману після розщеплення карбоксипептидази Б фракцію інсуліну очищають методом оброщенофазової високоефективної рідинної хроматографії (ОФ ВЕРХ) з подальшою гельфільтрацією. В даному методі, на думку авторів, є присутнім багатостадійна технологічний ланцюжок. Крім того, послідовне розщеплення гібридного білка трипсином і карбоксипептидази В вимагає і

послідовних хроматографічних очисток діаргінінінсуліна після триптичного гідролізу гібридного білка і інсуліну після розщеплення карбоксипептидази В, які призводять до значних втрат кінцевого продукту. Необхідно також відзначити, що використаний штам-продуцент *E. Coli JM109 / pPINS07*, що несе рекомбінантну плазмиду *pPINS07*, яка кодує гібридний білок з високою часткою лідерних пептиду, що становить близько 50%. Тому використання даного штаму при отриманні інсуліну здорожує процес виробництва изза підвищення витрат на біосинтез і знижує вихід цільового продукту. Перевагою створеної плазмиди *pHINS11* являється те, що вона забезпечує більш високий вихід кінцевого продукту інсуліну за рахунок підвищення виходу правильно згорнутого гібридного білка після його ренатурації. Отриманий штам-продуцент *E. Coli JM109 / pHINS11* характеризується наступними ознаками:

1. Морфологічні ознаки: клітини дрібні, палочковидної форми, грамнегативні, неспороносні, розміром 1x3, 5 мкм, рухливі з добре помітними тільцями включення після індукції синтезу гібридного білка:

2. Культуральні ознаки: при зростанні на агаризованому середовищі LB колонії круглі, гладкі, напівпрозорі, блискучі сірі. Край рівний, діаметр колоній 1-3 мм, консистенція пастоподібна. Зростання в рідких середовищах характеризується рівним помутнінням.

3. Фізіолого-біохімічні ознаки: клітини ростуть при температурі 4-42 °С, оптимум рН 6, 8-7, 6. Як джерело азоту використовують як мінеральні солі амонію, так і органічні сполуки: амінокислоти, пептони, триптон, дріжджовий екстракт. Як джерело вуглецю при зростанні на мінімальній середовищі використовують гліцерин, вуглеводи, амінокислоти:

4. Стійкість до антибіотиків: клітини штаму продуцента проявляють стійкість до ампіциліну (до 500 мкг / мл), обумовлену наявністю в плазміді гена лактамази (*bIa*):

5. Стабільність плазмиди в штамі: при підтримці клітин протягом декількох місяців на агаризованому середовищі LB, що містить ампіцилін, не спостерігається втрати або перебудови плазмиди, що впливає на експресію гібридного білка:

У конструювати штамі гібридний білок після індукованої експресії накопичується у вигляді тілець включення і його зміст становить не менше 30% від загального білка клітини. Розглянемо технологічну схему отримання генно-інженерного інсуліну при використанні штаму-продуцента *E. Coli JM109 / pHINS11*. 1. Конструювання плазмиди *pHINS11*. а) плазмиди *pHINS11* конструюють на основі відомої плазмиди *pHINS05*. Плазмідну ДНК *pHINS05* піддають вичерпного гідролізу рестриктазами *BeII* і *BamHI*. Для цього 5 мкг плазмідної ДНК *pHINS05* в 20 мкл буфера, що містить 33 мм тріацетата, рН = 7, 9:

66 мМ Кацетата, 10 мМ Mg ацетату, 0, 1 мг / мл БСА і 10 од. рестриктази *NotI* і *BamHI* інкубують 1 годину при температурі 37 ° С. З отриманого гідролізату виділяють *BamHI* фрагмент ДНК розміром близько 1654, 2 т. П. О. за допомогою електрофорезу в 0, 8% гелі легкоплавку агарози. Далі ДНК депротейнізують фенолом, сумішшю фенолу з хлороформом (1: 1), хлороформом, і в облогу етиловим спиртом, розчиняють в 20 мкл води. Отриманий *BamHI* фрагмент, що містить ген гібридного білка і векторну плазмиду *pYINS05*, лігирують з 20кратним молярним надлишком олігонуклеотидних дуплекса, отриманого в результаті відпалу синтетичних нуклеотидів *oligolink24A* (SEQ ID NO: 4) і *oligolink24B* (SEQ ID NO: 5). б) Компетентні клітини штаму *E. Coli JM109* трансформують лігированной сумішшю (10 мкл) і висівають на *LB* агар, що містить 100 мкг / мл ампіциліну. З виростих колоній виділяють плазмидную ДНК і секвенірують між сайтами рестриктаз *EcoRI* і *BamHI* для підтвердження вставки в лінкерних частина гена гібридного білка. В результаті отримують плазмиду *pHINS09*. с) Для отримання плазмиди з делецією по горгену (негативного регулятора копійності) до 5 мкг плазмидної ДНК *pHINS09* в 20 мкл буфера додають 10 од. рестриктази *Eco47III* і *SnaI*, що генерують «тупі» кінці, і суміш інкубують протягом 1 години при 37 ° С. Далі ДНК депротейнізують фенолом, сумішшю фенолу з хлороформом (1: 1), хлороформом, осаджують етиловим спиртом, розчиняють в 20 мкл води. Отриману таким чином ДНК лігирують в 30 мкл буфера для лігування в присутності 5 од. ДНК лігази фага T4 протягом 16 годин при 8 ° С. Лігированной сумішшю (10 мкл) трансформують компетентні клітини штаму *E. Coli JM109* і висівають на *LB* агар, що містить 100 мкг / мл ампіциліну. Відбирають бактеріальні клони, що несуть плазмидную ДНК розміром 3, 6 т. П. О. Виділені плазмиди піддають Рестрикційний аналіз і секвенірують за методом Сенгера. В результаті отримують плазмиду *pHINS11*. d) плазмиди *pHINS11* трансформують компетентні клітини штаму *E. Coli JM109* і висівають на *LB* агар, що містить 100 мкг / мл ампіциліну. Окремо локалізовану колонію тричі пересівають на чашки з *LB* агаром, що містить 100 мкг / мл ампіциліну. Отриманою моноклоновою культурою інокулірують 5 мл рідкого середовища *LB* з ампіціл

лином і інкубують протягом ночі при інтенсивному струшуванні при 37 ° С. Отриманий штаммпродуцент *E. Coli JM109 / pHINS11* зберігають в 20% гліцерині при мінус 40 ° С. 2. Вирощування біомаси штаммапродуцента *E. Coli JM109 / pHINS11*. Культивування клітин штаму *E. Coli JM109 / pHINS11* для отримання інокулята і основного вирощування проводять на живильному середовищі наступного складу (г / л): гідролізат казеїну соляно-кислотного - 30:

екстракт пекарських дріжджів - 14:

двозаміщений фосфат калію тре-водний - 6:

однозаміщений фосфат калію - 3:

сульфат магнію - 0, 5:

глюкоза - до 50:

ампіциліну натрієва сіль - 0, 05:

вода очищена до 1 л. Посівні культури готують в кількості 1/10 від обсягу що засіюються живильного середовища і вирощують до оптичної щільності 7- 8 одиниць при довжині хвилі 540 нм, довжина оптичного шляху 10 мм, рН культивування $6, 9 \pm 0, 2$ (коригування проводять додаванням глюкози і луги), тривалість 4 6 годинників:

pO_2 - $40 \pm 15\%$. Вирощування основної культури проводять в ферментере ємністю 150 л з 90 літрами живильного середовища. Обсяг інокулята - 10 л. Культивування проводять при наступних параметрах: температура $36, 5 \pm 0, 5$ ° С:

рН 6, 7 7, 1:

pO_2 - $40 \pm 15\%$. Для індукції біосинтезу гібридного білка в середині логарифмічної фази росту культури при оптичної щільності 7- 9 одиниць вносять індуктор - 1-ізопропіл-D1-тіогалактопіранозід. Культивування продовжують до утворення внутрішньоклітинних включень гібридного білка («тілець включення» - ТВ) у 90- 95% клітин. Експрес-контроль процесу накопичення ТВ здійснюють за допомогою фазово-контрастної мікроскопії препаратів.

3. Виділення тілець включення. Зростання культури в ферментере зупиняють шляхом різкого скорочення інтенсивності перемішування, культуру охолоджують до 10- 14 ° С і концентрують на сепараторі в 8- 10 разів. В отриману суспензію додають трісоснової до концентрації 0, 1 М, сечовину - до 1, 5 М, ЕДТА - до 1 мМ. Забуферений до рН 6, 8- 7, 0 суспензію тричі пропускають через гомогенізатор при тиску 700 800 атм і температурі 15- 20 ° С. Гомогенат клітин пропускають через проточну центрифугу ($g = 18000$). Основна маса тілець включення (не менше 90%) осідає в роторі центрифуги. Вологий осад тілець включення (2, 6 кг) вивантажують з ротора центрифуги, заморожують і зберігають при мінус 40 ° С. Втрати гібридного білка при виділенні тілець включення не перевищують 15%.

4. Розчинення тілець включення, що містять гібридний білок, і ренатурації гібридного білка. У реактор об'ємом 30 л, заповнений 18 л буферного розчину, що містить 0, 1 М трісНCl, рН 8, 0 і 8 М сечовини, завантажують 1, 8 кг пасти тілець включення і включають щоперемішує пристрій. Після розчинення тілець включення в реактор додають дітіотреїтолу до кінцевої концентрації 10 мМ і продовжують перемішування протягом 10- 12 год при 15 ° С. Кількість гібридного білка в розчині становив 174 м В реактор з охолодженням об'ємом 250 л заливають 160 л гліцінNaOH буфера, рН 9-11 і охолоджують його до температури 10 14 ° С. Після охолодження буферного розчину в реактор подають розчин гібридного білка

з відновленими дисульфідними зв'язками. Протягом 20- 24 год інкубують розчин гібридного білка, перемішуючи і підтримуючи температуру в реакторі 10-14 ° С. Після ренатурації гібридного білка з утворенням правильно замкнених SS зв'язків (контроль ОФ ВЕРХ) проводять кислотне осадження домішкових білків шляхом підкислення реакційної середовища в реакторі до рН 4,0-4,5 розчином соляної кислоти. Зупиняють перемішування і через 4-5 ч супернатант освітлюють на мікрофільтраційних установці. Зміст ренатурірованого гібридного білка в освітленому супернатанті становить 85 г. 5. Очищення ренатурірованого гібридного білка на КМсефарозе. Правильно згорнутий гібридний білок сорбують з фільтрату на іонообмінних колонку об'ємом 5 л, заповнену КМсефарозой, попередньо врівноважену 0,05 М Наацетатним буфером, рН 4,05, 5. Сорбований білок елююють з колонки градієнтом 0,10, 6 М хлоридом натрію в 0,05 М Наацетатном буфері, рН 4,05, 5, що містить 1,5 М сечовини. Фракції, що містять гібридний білок з чистотою не менше 95% (контроль методом ОФ ВЕРХ), об'єднують і використовують для подальшої роботи. В результаті отримують 63 г ренатурірованого гібридного білка з чистотою не нижче 90%.

6. Спільний гідроліз гібридного білка трипсином і карбоксипептидазою Ві очищення інсуліну на СПсефарозе. Розщеплення гібридного білка трипсином і карбоксипептидази В проводять в реакторі з нержавіючої сталі з охолодженням об'ємом 30 л, забезпеченим пристроєм,. У реактор вносять 13 л розчину гібридного білка, розчин охолоджують до 4-8 ° С і доводять значення рН розчину до 7,2-7,3 додаванням 1 М розчину трісосновного. Потім в розчин вносять розчин трипсину і карбоксипептидази В в масовому співвідношенні: гібридний білок: трипсин: карбоксипептидаза В - 2000: 1: 1, 25. Реакцію гідролізу проводять протягом 10-12 годин, контролюючи методом ОФ ВЕРХ накопичення інсуліну в гідролізаті. Реакцію розщеплення зупиняють, підкисляючи гідролізат до рН 3,2-3,6 10% -ним розчином соляної кислоти. У реактор додають хлористий калій до концентрації 40 мМ. Отриманий розчин наносять на хроматографічну колонку об'ємом 5 л, заповнену СП-сефарозой, попередньо врівноважену буфером: 2 М сечовина, 0,1 М амоній ацетат, рН - 3, 6. Промивання колонки проводять тим же буфером. Елюція сорбованої інсуліну проводять лінійним градієнтом хлористого калію від 0 до 0,5 М в врівноважується буфері. Об'єднують фракції, що містять 13,2 г інсуліну з чистотою не менше 95% (контроль методом ОФ ВЕРХ).

7. Отримання високоочищеного інсуліну методом препаративної обращенофазової вискоефективної рідинної хроматографією. У підготовлену колонку за допомогою насоса для подачі проби з ємності подають розчин інсуліну з попередньої стадії очистки в кількості 13,2 г білка. Реєстрацію процесу поділу ведуть при 220 нм на проточному

спектрофотометре. Зібрані фракції основного піку інсуліну аналізуються наутримання домішок методом ОФ ВЕРХ. Після очищення отримують 11,4 г високоочищеного інсуліну людини з вмістом основної речовини 98%. За останній час поряд дослідників встановлено, що молекули інсуліну, хроматографічна очищення яких проходить при низьких значеннях рН, піддаються агрегації, що погіршує якість продукту. Інсулін утворює фібрили при концентрації понад 5 г / л у водних розчинах, причому показано, що середня молекулярна агрегатів може варіювати від 10 до 200 кДа. Вид агрегації залежить від рН, температури іонної сили і природи органічного розчинника. Так, при 25 ° С в 3, 5 М розчині оцтової кислоти (рН 2, 6) інсулін існує переважно у вигляді мономерів, що підтверджено при турбидиметричним методом (довжина волни 400 і 350 нм) Однак при зниженні рН розчину до 2, 0 або при підвищенні температури до 60 ° С інсулін швидко утворює волокнисті структури, які з часом перетворюються в нерозчинні агрегати. Передбачається, що кисла реакція середовища прискорює агрегацію шляхом утворення зарядженого оточення білкових молекул, в якому збільшуються сили тяжіння між молекулами інсуліну. В результаті проведених досліджень встановлено, що інсулін схильний до утворення нерозчинних агрегатів, фібрил, в розчинах з рН 2, 5 3, 5. Найбільш інтенсивно освіту фібрил протікає в розчинах, що містять такі неорганічні кислоти, як азотна, ортофосфорна, сірчана або соляна. Подібна агрегація інсуліну значно знижує як якість очищення, так і термін експлуатації сорбентів для хроматографії. Оптимальною рухомою фазою, що забезпечує мінімальну здатність інсуліну до агрегації, є рухома фаза, що включає оцтову кислоту. При цьому збільшується термін експлуатації сорбентів. У молекулі інсуліну виявлено області, які відіграють підвищену роль в його фізико-хімічні та біологічні властивості. При внесенні мутаційних змін в амінокислотну послідовність цих областей істотно змінюються властивості молекули в цілому. Вдалося отримати аналоги з модифікацією вчепився, що призводить до значного збільшення гормональної активності в порівнянні з природним інсуліном. Контроль якості генно-інженерного інсуліну передбачає контроль додаткових показників, що характеризують стабільність рекомбінантного штаму і плазмиди, відсутність стороннього генетичного матеріалу в препараті, ідентичність експресіруемого гена і ін.

Використання людського інсуліну з самого початку терапії зводить до мінімуму виникнення алергічних реакцій. Найбільш часті ускладнення інсулінової терапії - гіпоглікемічний стану, що, перш за все, виявляється в порушенні функцій центральної нервової системи (сплутаність свідомості, кома та ін.). В даний час в медичній практиці використовують інсуліни трьох типів:

- короткодійні з швидким початком ефекту - регулярний інсулін - являє собою короткодійний розчинний при нейтральному значенні рН

кристалічний цінкінсулін, ефект якого розвивається протягом 15 хвилин після підшкірного введення і триває 5-7 годин. З метою збільшення тривалості дії всі інші препарати інсуліну модифіковані та при розчиненні в нейтральному середовищі утворюють суспензію. Вони містять протамин в фосфатному буфері - протамінцінкінсулін і НПХ (нейтральний протамін Хагедорна) - НПХінсулін або різні концентрації цинку в ацетатному буфері - інсуліни ультраленте, стрічці, семіленте:

-середньої тривалості дії - препарати містять протамин, що представляє білок середньої молекулярної маси 4400, багатий аргініном і одержуваний з молочка райдужної форелі. Для утворення комплексу потрібно співвідношення протаміну і інсуліну 1: 10. Після підшкірного введення протеолітичні ферменти руйнують протамин, дозволяючи інсуліну всмоктуватися:

-тривалість дії з повільним проявом ефекту. Лікування хворих на цукровий діабет I типу включає використання комбінації препаратів інсуліну людини швидкого (короткого) і тривалого (пролонгованої) дії. Короткодійний інсулін повинен швидко досягати піку активності відповідно до підйомом рівня глюкози, пов'язаних з прийомом їжі, і припиняти свою дію після його падіння. Інсулін пролонгованої дії, навпаки, повинен протягом тривалого часу забезпечувати певний базовий рівень глюкози в проміжках між прийомами їжі. Інсулінова терапія з використанням інсуліну має ряд недоліків, які вдалося подолати тільки після отримання його генно-інженерних аналогів. 171В даний час обсяг щорічного споживання в світі субстанції генно-інженерного інсуліну людини становить приблизно близько 30000 кг, а з урахуванням постійного зростання захворювання на діабет у світі випуск рекомбінантного інсуліну буде збільшуватися щорічно.

II. Контроль опорних знань

Виконати тестові завдання:

1. Ослаблення обмежень на використання в промисловості мікроорганізмів-рекомбінантний, продукції-цірующих гормони людини, стало можливим завдяки:

- а) вдосконалення методів ізоляції генно-інженерних рекомбінантов від навколишнього середовища;
- б) підвищення кваліфікації персоналу, що працює з рекомбінантов;
- в) встановленої експериментально слабкою життєздатності рекомбінантов;
- г) експериментальному підтвердженню обов'язкової втрати чужорідних генів.

2. До специфічних білків гормонів відносяться:

- А) інсулін, ангіотензин, окситоцин, меланотропін
- Б) ангіотензин, меланотропін, цитохром Р-450, ДНК-полімераза
- В) тільки окситоцин інсулін
- Г) тільки меланотропініоксітоцін

3. Основна перевага ферментативної біоконверсії стероїдів перед хімічної трансформацією складається:

- 1) в доступності реагентів;
- 2) в вибірковості впливу на певні функціональні групи стероїду;
- 3) в скороченні часу процесу;
- 4) в отриманні принципово нових з'єднань;

4. До основних представників стероїдів відносяться:

- 1) кортикостероїди, прогестогени, естрогени і андрогени;
- 2) убіхінон, пантотенова кислота, естрогени і андрогени;
- 3) кортикостероїди, прогестогени, тромбокساني, простоніди, аланін;
- 4) жоден з перерахованих;

5. Кортикостероїди містять при С-17:

- 1) аміногрупу;
- 2) гідроксізамещенную ацетильную групу;
- 3) кільце ароматичне;
- 4) карбонильную або гідроксильну групи, а їх модифіковані аналоги - алкільну або етінільную групу;

6. В якості вихідної сировини для виробництва стероїдних препаратів використовуються:

- 1) стерини рослин (клас фитостеринів);
- 2) ергостерину;
- 3) стигмастерин;
- 4) всі відповіді вірні;

Компетенції: ПК-3

7. Речовина s Рейхштейна може бути отримано з:

- 1) диосгенина;
- 2) соласодіна;
- 3) преднізолону;
- 4) целюлози;

Компетенції: ПК-3

8. «Речовина s» Рейхштейна служить вихідним продуктом для 11β-гідроксилювання при мікробіологічному синтезі:

- 1) андрогенів;
- 2) гідрокортизону (кортизолу) і його синтетичних аналогів: преднізолону та дексаметазону;
- 3) гідрокортизону (кортизолу) і його синтетичних аналогів: діогесніна і тромбоксану;
- 4) кортексолона;

9. Присутність гідроксильних груп в ядрі циклопентанпергідрофенантрону обумовлює фармакологічну активність для більшості стероїдних гормонів в положеннях вуглецевого атома:

- 1) С-3, С-11, С-16, С-17;

- 2) С-3;
- 3) С-3, С-13, С-5, С-12, С-14;
- 4) С-4, С-5, С-7, С-10, С-11, С-16;

III. Обговорення теоретичних питань:

1. Стероїдні гормони, будова, біологічна роль в організмі.
2. Традиційні джерела отримання стероїдних гормонів.
3. Штами мікроорганізмів, що володіють здатністю до трансформації (біоконверсії) стероїдів. Конкретні реакції біоконверсії стероїдів. Підходи до вирішення селективності процесів біоконверсії.
4. Сутність процесу біотрансформації .;
5. Що вдає із себе «речовина S», його застосування .;
6. Яким чином здійснюється синтез молекули стероїду в процесі біоконверсії ?
7. Переваги біотехнологічних методів виробництва стероїдів перед методами хімічного синтезу .;
8. Трансформація може здійснюватися як зростаючої на середовищі культуурою, так і відмитим від живильного середовища клітинами мікроорганізму. Який з варіантів краще, чи є винятки ?;
9. У процесі промислового виробництва стероїдів необхідною умовою є висока ступінь попереднього подрібнення стероїдного субстрату. З якою метою і чим це зумовлено ?;
10. В даний час можливості і переваги використання біотрансформації проявилися найбільш яскраво в області перетворень стероїдних сполук. Складність молекул стероїдів ускладнює навіть незначні їх модифікації хімічним шляхом.
11. Яка роль гормону інсуліну в організмі людини? Опишіть структуру гормону.
12. Які етапи синтезу інсуліну в β -клітинах островкової тканини Вам відомі?
13. Опишіть історію створення виробництва природного та рекомбінантного інсуліну.
14. Проведіть аналіз технології отримання рекомбінантного інсуліну і вкажіть методи межопераційного контролю.
15. Яким чином проводять конструювання плазмиди несучої ген інсуліну людини?
16. Що являють собою тільця включення? Яким чином проводиться процес ренатурації?
17. Яка роль гормону росту (соматотропіну) в організмі людини? Опишіть структуру гормону.
18. Проведіть аналіз технології отримання рекомбінантного гормону росту і вкажіть методи межопераційного контролю.

19. Яка роль еритропоєтину в організмі людини? Опишіть структуру гормону.
20. Опишіть лінії клітин, які використовуються для отримання еритропоєтину.
21. Які етапи включають отримання трансгенних тварин?
22. Проведіть аналіз технології отримання еритропоєтину і вкажіть методи межопераційного контролю.
23. За якими параметрами проводять контроль якості гормональних препаратів?
24. Апаратурно-технологічна схема виробництва гормонів.

Теми доповідей/ рефератів

1. Яка роль гормону інсуліну в організмі людини? Опишіть структуру гормону.
2. Опишіть історію створення виробництва природного та рекомбінантного інсуліну
3. Які етапи синтезу інсуліну в клітинах островкової тканини Вам відомі?

IV. Підведення підсумків

Список рекомендованої літератури

1. S. Spada. G. Walsh Directory of Approved Biopharmaceutical Products 1st Edition . – CRC Press, 2019. – 336 p.
2. С. Kokare PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY 1st Edition. – Nirali Prakashan, 2017. – 274.
3. Лихач А. В. Промислова біотехнологія / А. В. Лихач. – МНАУ. – 2016. – 116 с.
4. Краснопольский Ю.М., Звягинцева О.В. Фармацевтическая биотехнология. Аспекты фармацевтической химии. Ю.М. Краснопольский, О.В. Звягинцева. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2018. – 248 с.
5. Державна фармакопея України : в 3 т. / ДП “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”. –2-е вид. –Харків : Державне підприємство “ Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів ”, 2015. –Т.1. –