

ШЛЯХИ УДОСКОНАЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ГЕННО-ІНЖЕНЕРНОГО ІНСУЛІНУ

Пічкур А. Ю.

КПІ ім. Ігоря Сікорського, pichkur.anastasiia@iit.kpi.ua

За підрахунками ВООЗ на сьогодні у всьому світі на цукровий діабет хворіє приблизно 420 мільйонів людей, з яких понад два мільйони проживають в Україні. Єдиним способом для підтримки життя та працездатності людей, хворих на цукровий діабет, є обов'язкове комплексне приймання антидіабетичних препаратів, серед яких основним терапевтичним засобом є інсулін.

Інсулін являє собою гормон білкової природи, що синтезується β -клітинами острівців Лангерганса підшлункової залози з метою підтримання гомеостазу глюкози у крові. На сьогодні відомо чотири способи його отримання: повним хімічним синтезом; екстракцією з підшлункових залоз людини; напівсинтетичним методом за допомогою ферментно-хімічної заміни в положенні 30 В-ланцюга амінокислоти аланіну у свинячому інсуліні на треонін; біосинтетичним способом за генно-інженерної технології. Перші два способи практично не використовуються через неекономічність, яка обумовлена недостатньою розробленістю першого способу і нестачу сировини для масового виробництва другим способом. Найбільш ефективним методом вироблення інсуліну є генно-інженерний, який передбачає використання як продуценти рекомбінантні штами мікроорганізмів, що містять плазмідну ДНК, яка кодує проінсулін.

Основними продуцентами інсуліну являються рекомбінантні штами *E.coli* та *S. cerevisiae*. Але найкращим джерелом для масштабного виробництва рекомбінантних білків є рекомбінантні штами *Escherichia coli*. Вони швидко ростуть, невибагливі до поживного середовища, забезпечують великий вихід синтезуючого продукту та рентабельність. При цьому найчастіше використовують штами: *E. coli* JM109, *E. coli* HB101, *E. coli* TG1, *E. coli* TG2 і *E. coli* BL21, які можуть рости на різних середовищах: глюкозо-пептонному середовищі, середовищі Буліра, середовищі Кеслера.

Використовуючи систему експресії *E.coli*, попередники інсуліну отримують у вигляді тілець включення, а повністю функціональні поліпептиди - за допомогою процедур солубілізації та рефолдингу. Бактеріальна система експресії на основі *E. coli* є економічно ефективною та найбільш застосовуваною. Вона має ряд переваг таких як - низька вартість, високі рівні експресії, прості умови культивування, швидкий ріст, відсутність ендотоксинів та ін. Для очистки генно-інженерного інсуліну від проінсуліну, який провокує алергічні реакції при лікуванні хворих на діабет, його піддають системі очищення.

Є багато методів отримання генно-інженерного інсуліну з різних штамів *E. coli*, проте більшість з них мають ряд недоліків таких як: використання великої кількості сорбенту при гель-фільтрації та ферментів при подальшому розщепленні гібридного білка; низький рівень руйнування клітин при отриманні

тілець включень та недосконалі методи очищення, що передбачають використання сечовини та органічних розчинників. Виправляючи ці недоліки, на жаль, утворюються нові - низький вихід цільового продукту та довга тривалість процесу. Тому шляхи покращення технологій виробництва генно-інженерного інсуліну можуть бути направлені на пошук шляхів виправлення цих недоліків.

Наявні дані про можливість покращення стадії руйнування клітин шляхом заміни ультразвукової дезінтеграції на високоефективну технологію прес руйнування, яка дозволяє підвищити ефективність цього процесу майже у 2 рази. Запропонований авторами спосіб значно дешевше, має вищу продуктивність і дозволяє отримати на виході чистіший препарат (тілець включення).

Критичною точкою технології є також стадія очищення цільового продукту. У багатьох технологіях очищення інсуліну здійснюють методом гель-проникаючої хроматографії на зшитих декстринових гелях з використанням 0,5 М оцтової кислоти. Заміна цього способу очищення інсуліну на гель-проникаючу хроматографію у водній оцтовій кислоті на гідрофільному гелі дозволяє отримати цільовий продукт вищої якості. Є також дані про удосконалення схеми очищення генно-інженерного інсуліну шляхом заміни його сорбції на макропористому сульфокатіоніті на іонообмінну хроматографію та високоефективну рідинну хроматографію, що дозволило отримати високоочищений препарат інсуліну з чистотою 98-99%.

Таким чином, незважаючи на велику різноманітність технологічних схем отримання генно-інженерного інсуліну людини, сучасні наукові дослідження спрямовані на вдосконалення технології його отримання шляхом пошуку створення нових генетичних конструкцій, удосконалення технологічних рішень руйнування клітин, оптимізації стадії рефолдингу та удосконалення режиму процесу трипсिनолізу, що дозволить отримати продукт який буде повністю відповідати фармакопейним вимогам.

Список використаної літератури:

1. Chance R, Glaser N., Detection C. Insulin Lispro (Humalog) In: Walsh G, Murphy B, editors. Biopharmaceuticals, industrial prospect. Kluwer: Dordrecht; 1999. p. 149-172.
2. Owens DR, zinman B, bolli G: Insulins today and beyond. Lancet. 2001, №5, т.1., С 739-746.
3. Walsh G. Therapeutic insulins and their large-scale production. Appl Microbiol Biotechnol. 2005; №67. С 151-159.
4. Лазарев ОП, Лесик Ш, Костецький ІГ, Лісовський ІЛ, Рибачук ВМ, Стадник ВІ. Спосіб одержання рекомбінантного інсуліну людини Патент України JVfo 76661, С12N 15/17, С12N 1/21, публ. 2006.
5. Андреевичева Т.Ю. Баландина Л.В. Костакова Г.А. Спосіб очистки инсулина патент RU2146944С1 публ.2000-03-27.