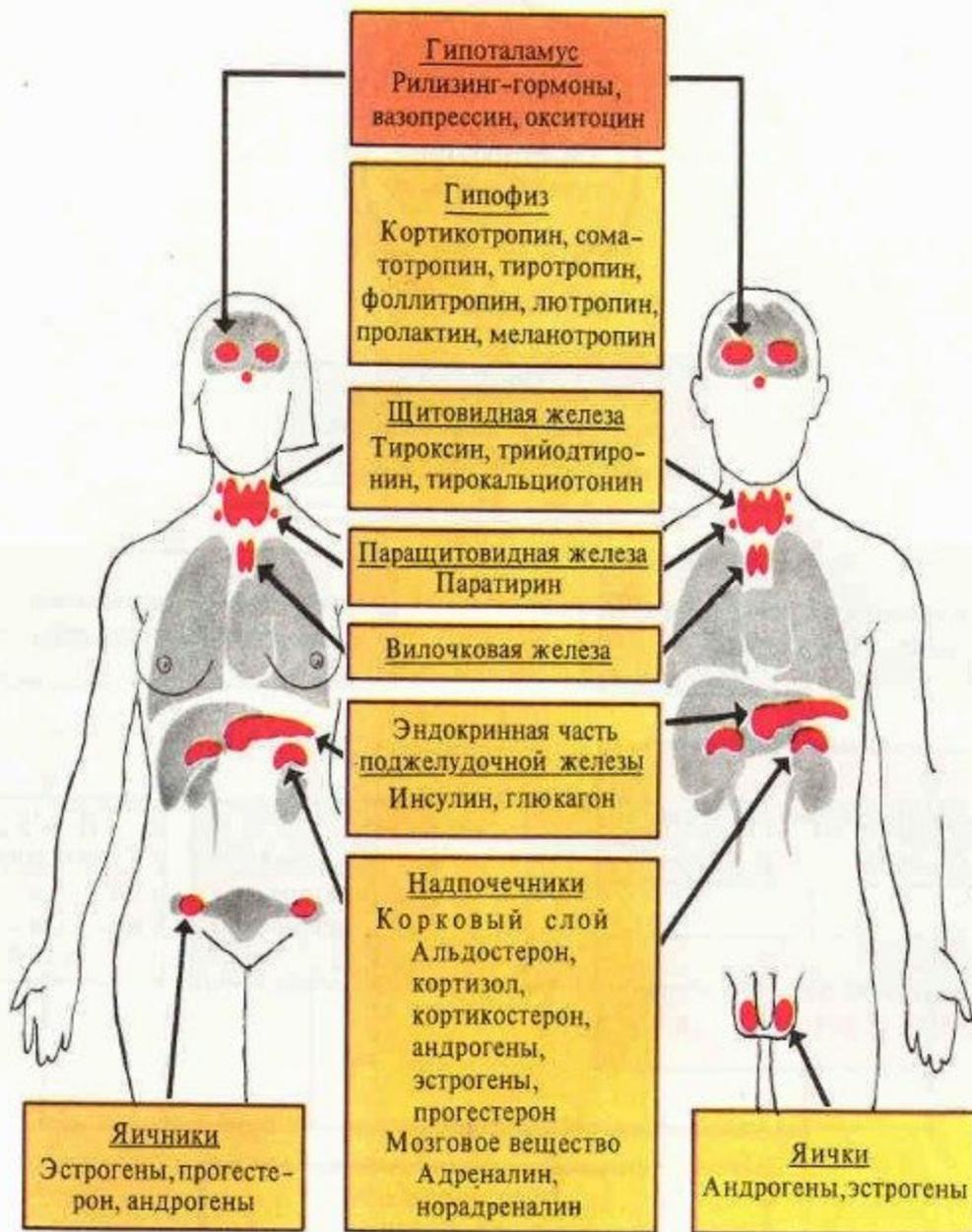


БИОТЕХНОЛОГИЯ ГОРМОНАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

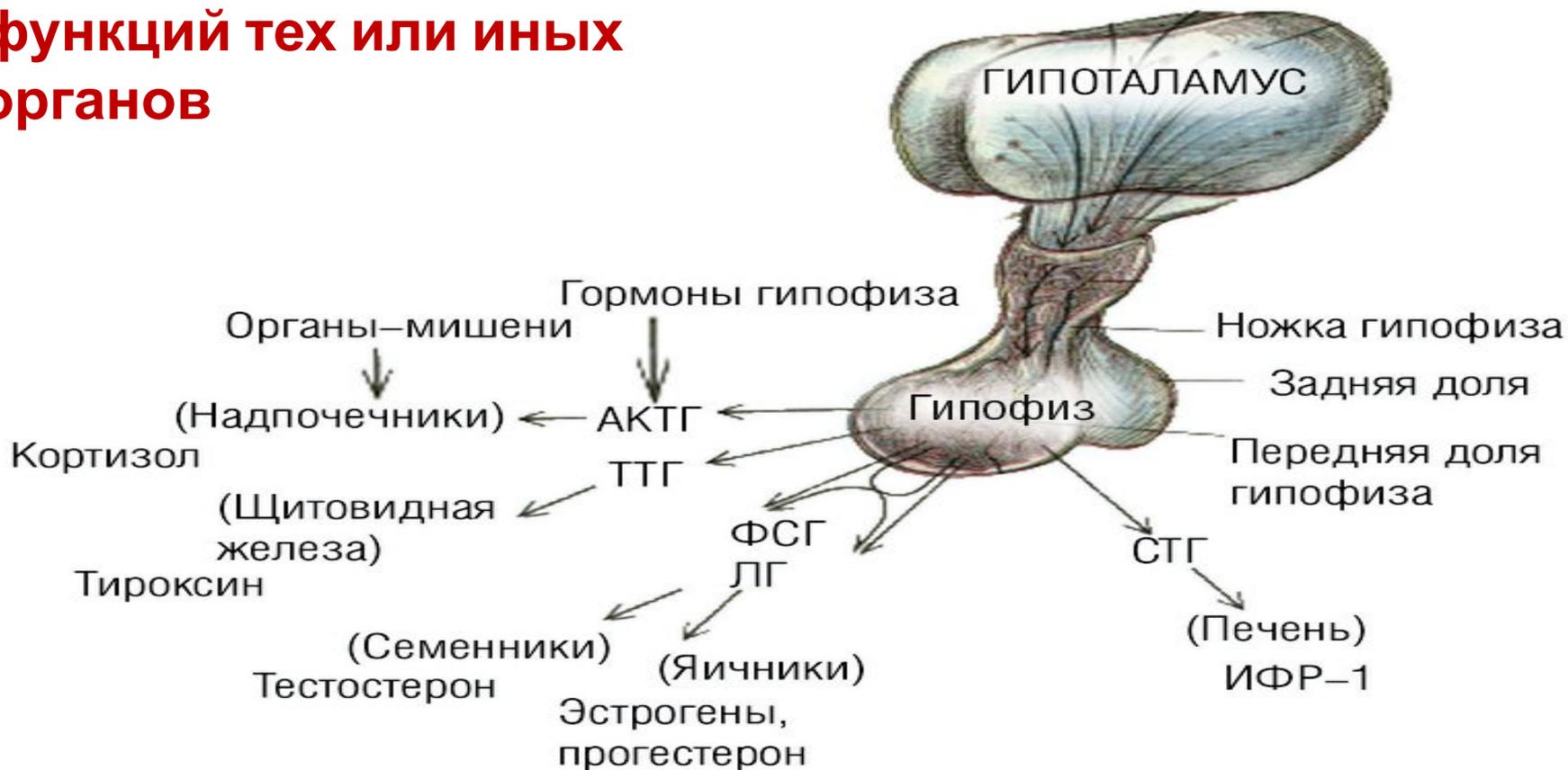
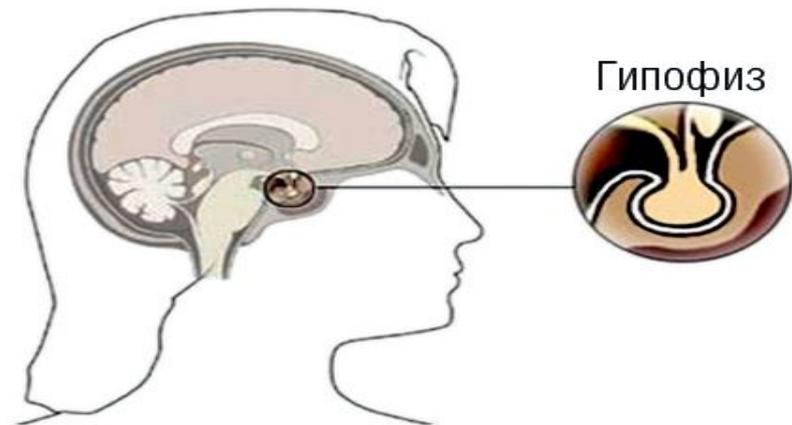
Что такое гормоны?

Гормоны - (от греч. *hormáo* - привожу в движение, побуждаю), биологически активные вещества, вырабатываемые эндокринными железами, или железами внутренней секреции, и выделяемые ими непосредственно в кровь. Термин «гормоны» введён англ. физиологами У. Бейлиссом и Э. Старлингом в 1902 г. Гормоны разносятся кровью и влияют на деятельность органов, изменяя физиологические и биохимические реакции путём активации или торможения ферментативных процессов. Известно более 30 гормонов, выделяемых эндокринными железами млекопитающих и человека.



Железы внутренней секреции и их гормоны

**Всего в организме
вырабатывается
более 100 гормонов и
каждый из них играет
очень важную роль в
регуливании
функций тех или иных
органов**



Химическая природа и пути действия гормонов

- **Простые и сложные белки, пептиды - гормоны гипофиза, панкреаса и др.**
 - **Стероидные гормоны - коры надпочечников, половые стероиды**
 - **Производные аминокислот - адреналин, гормоны щитовидной железы, эпифиза**
- **через мембранные рецепторы и вторичные посредники**
 - **проникая в клетку, через рецепторы цитоплазмы и ядра**
 - **через мембранные рецепторы и вторичные посредники**

ЛИПОФИЛЬНЫЕ ГОРМОНЫ

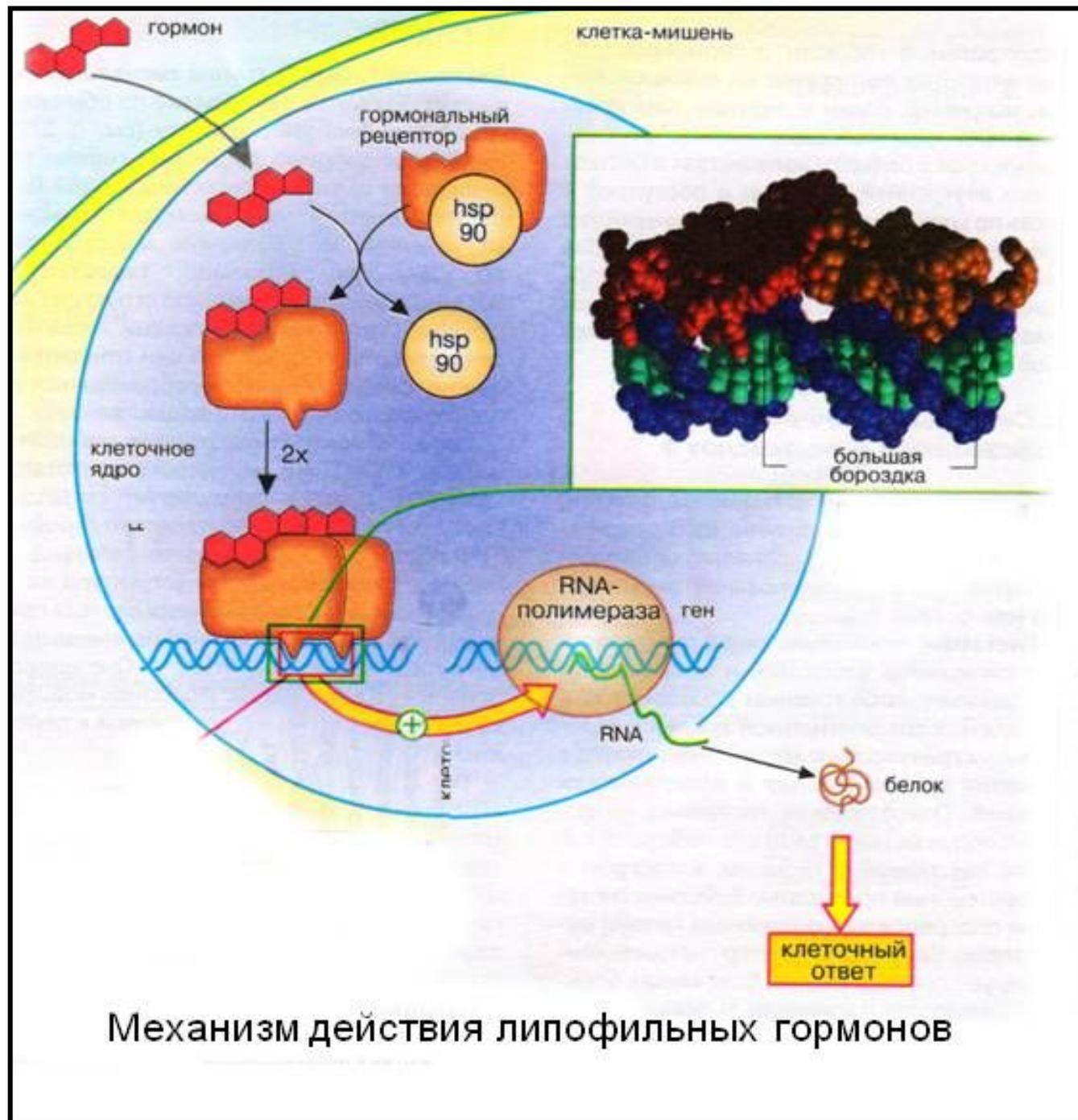
Секретируются в кровь сразу после синтеза

Проникают через мембрану

Связываются с ^{КЛЕТК}и внутриклеточными рецепторами

Регулируют транскрипцию отдельных генов

Транспортируются с белками переносчиками



ГИДРОФИЛЬНЫЕ ГОРМОНЫ

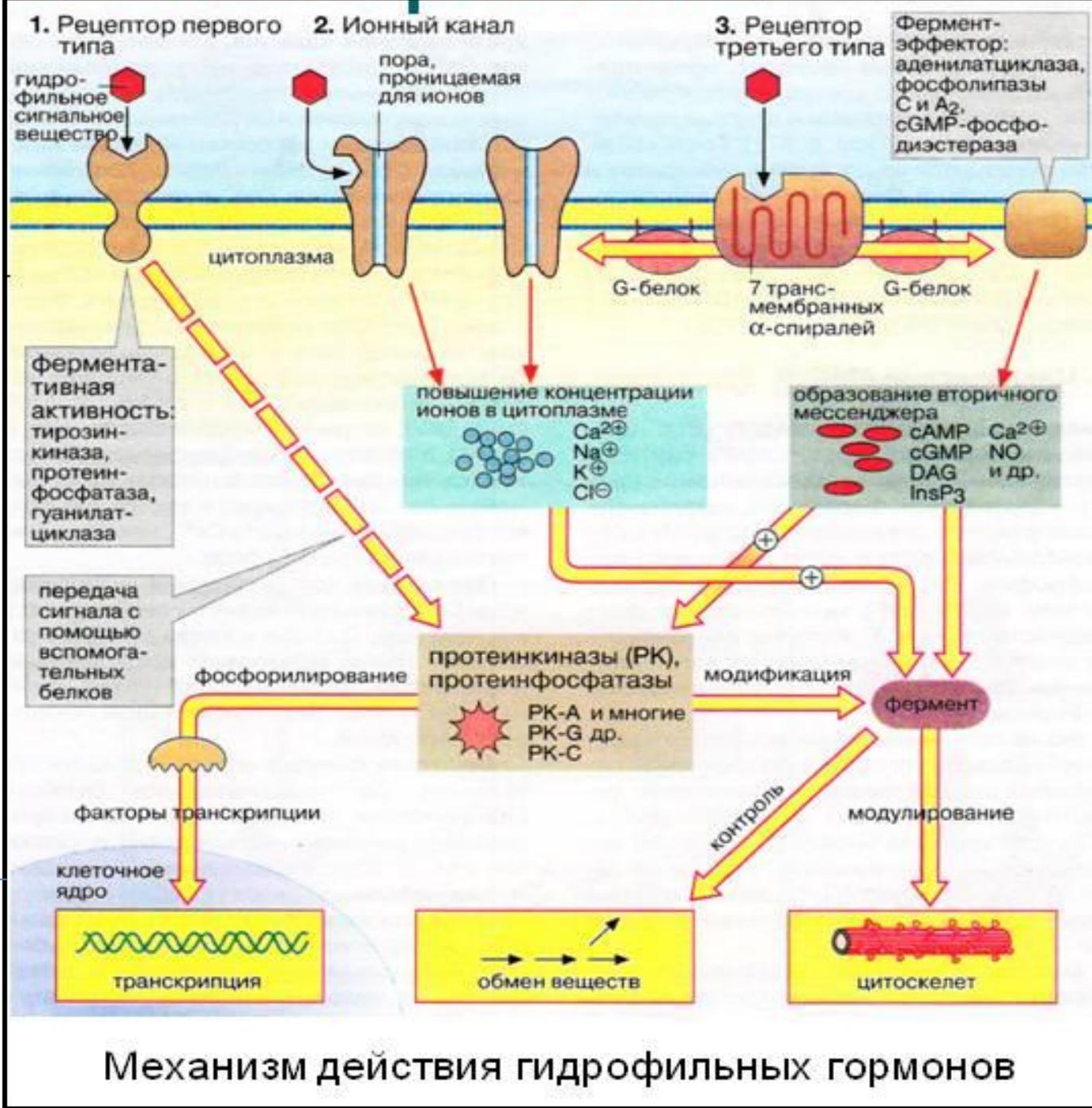
Имеют пептидную природу или являются производными аминокислот

Способны накапливаться в клетках желез

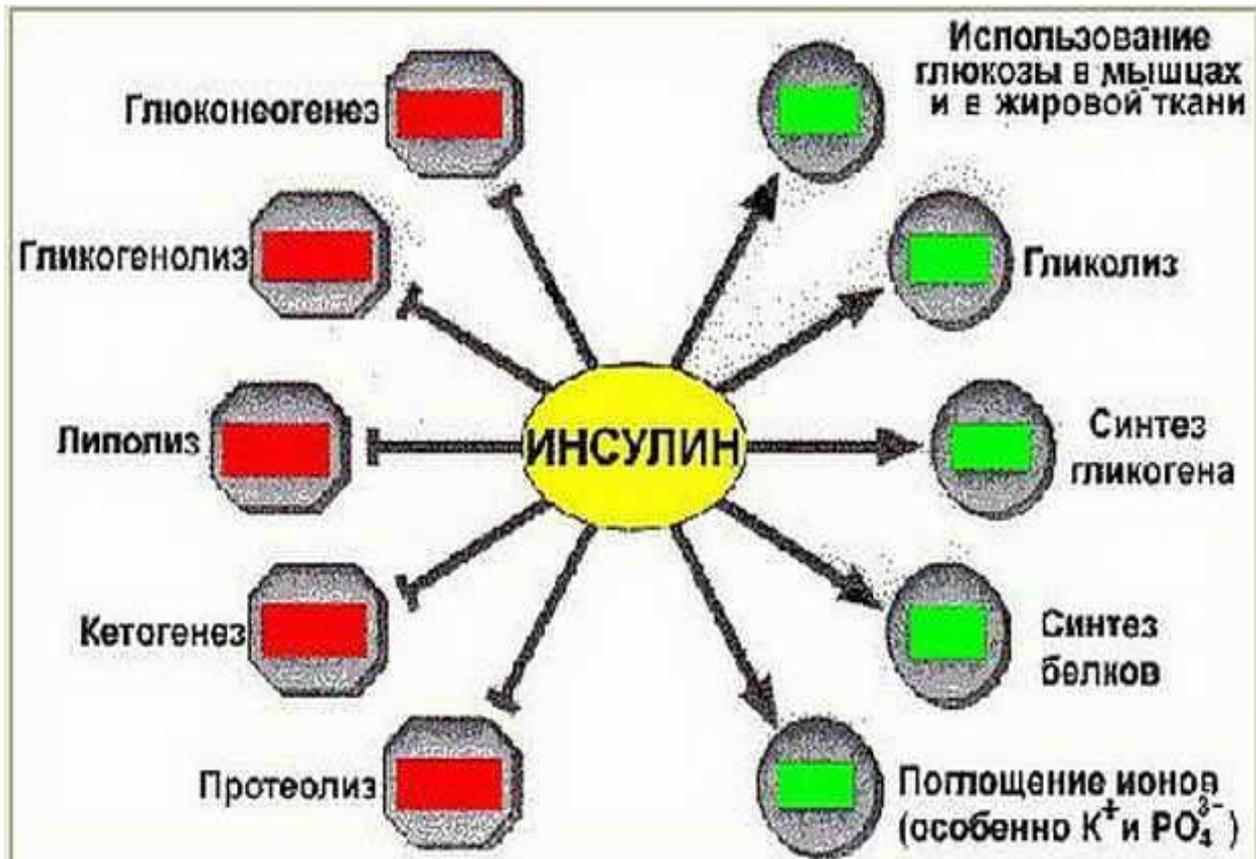
Не проникают в клетку

Связываются с рецептором, находящимся на мембране

Транспортируются в потоке крови без переносчиков

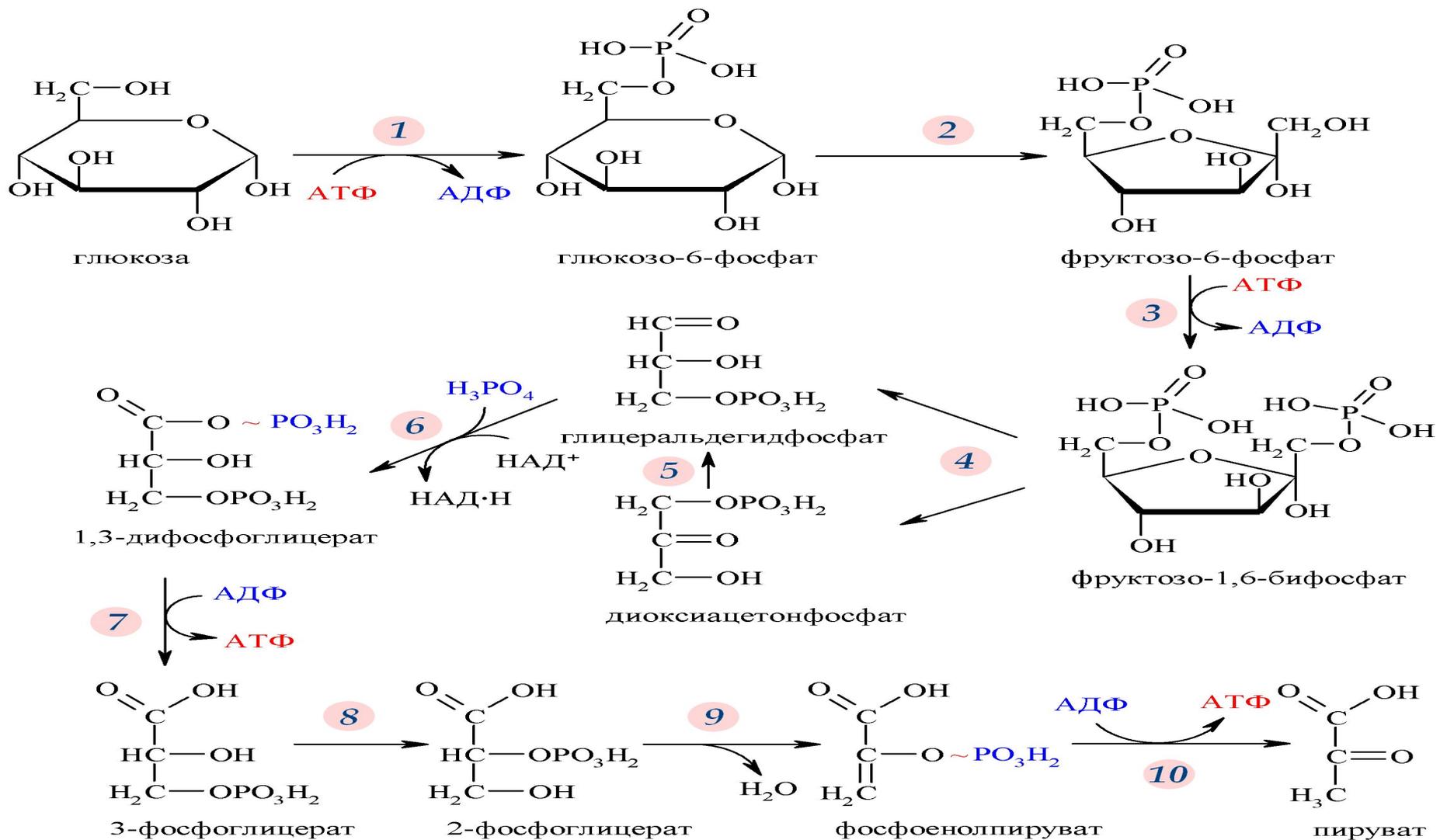


ИНСУЛИН



Действие инсулина. Зеленый цвет - стимуляция, красный - угнетение

1. Увеличивает проницаемость плазматических мембран клеток для глюкозы,
2. Активирует [ферменты гликолиза](#) (см. след. рис.)
3. Стимулирует образование в печени и мышцах из глюкозы [гликогена](#),
4. Подавляет активность ферментов, расщепляющих гликоген и жиры
5. Усиливает синтез [жиров](#) и [белков](#).



Ферменты гликолиза: 1 — [Гексокиназа](#) 2 — [Глюкозо-6-фосфатизомераза](#)
 3 — [6-Фосфофруктокиназа](#) 4 — [Альдолаза](#) 5 — [Триозофосфатизомераза](#)
 6 — [Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа](#) 7 — [Фосфоглицераткиназа](#) 8 — [Фосфоглицеромиутаза](#) 9 — [Енолаза](#) 10 — [Пируваткиназа](#)



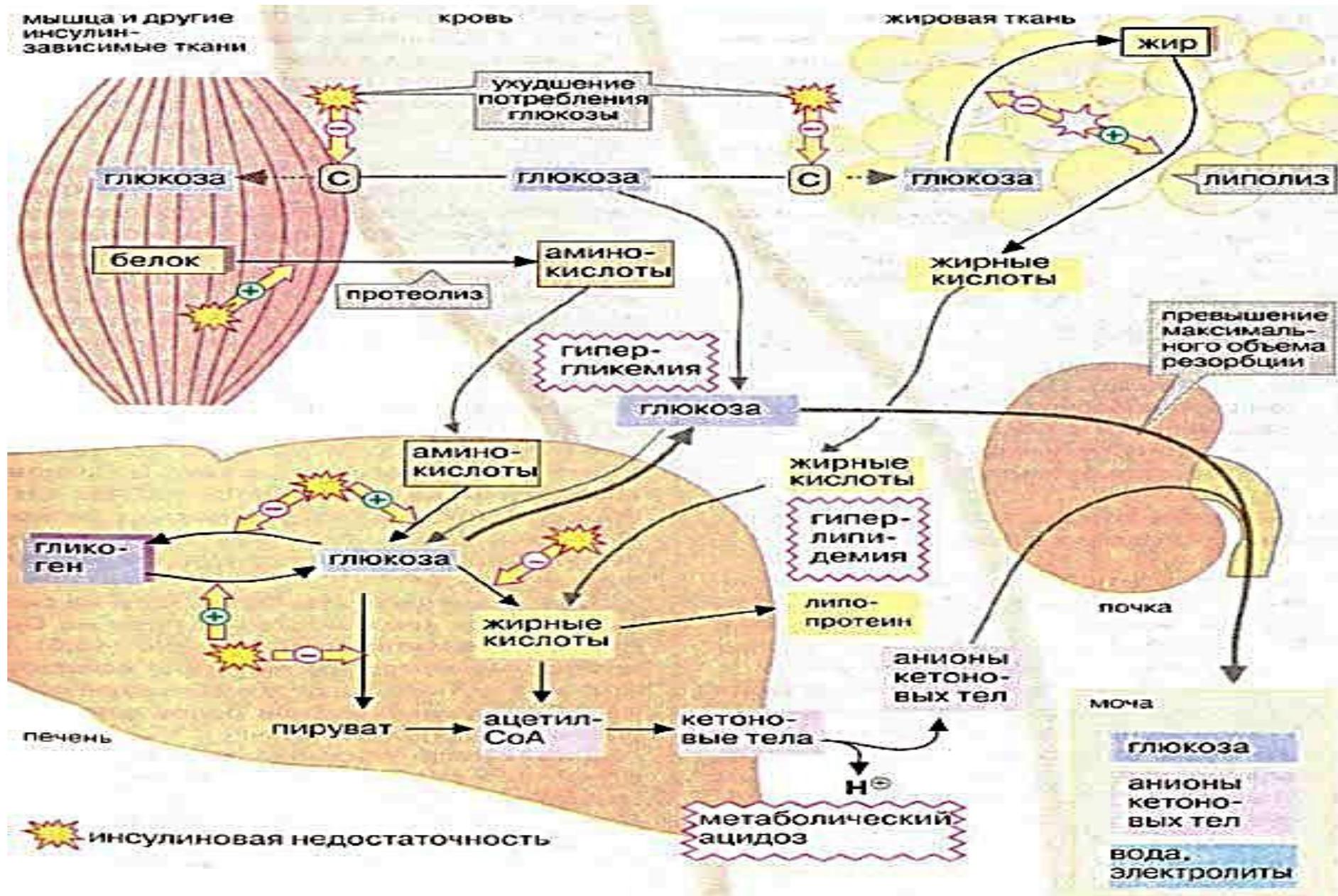
Инсулин вырабатывается в бета-клетках островков Лангерганса поджелудочной железы.



70% матричной РНК, выделенной из этих клеток, кодируют именно инсулин.

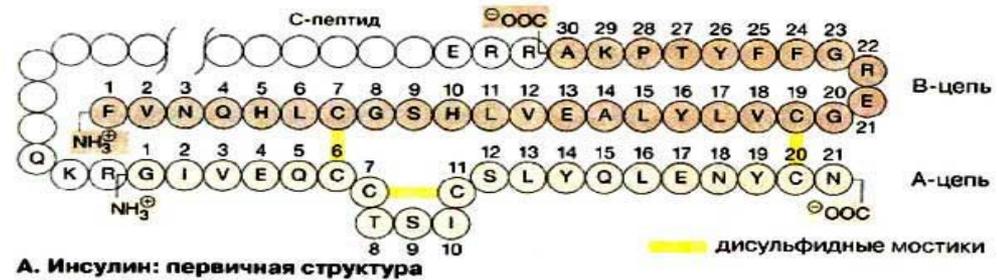
Инсулин секретируется в ответ на стимуляторы секреции инсулина (**глюкозу, маннозу, аминокислоты – лейцин, аргинин**). Человеческая поджелудочная железа содержит до 8 мг инсулина (200 биол. Ед; 1 мг = 28 БЕ).

ПОСЛЕДСТВИЯ ДЕФИЦИТА ИНСУЛИНА

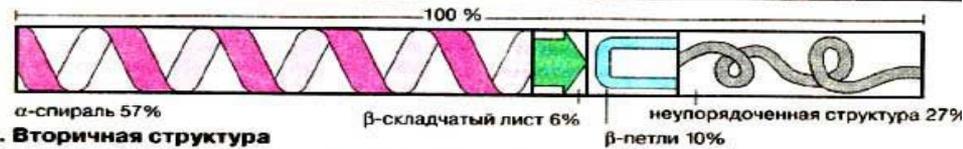




Человеческий инсулин



А. Инсулин: первичная структура



Б. Вторичная структура

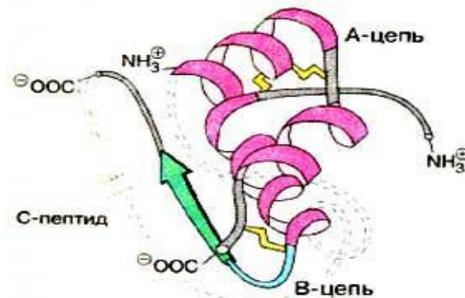
**Структура инсулина
расшифрована в 1954 г. англ.
биохимиком
Ф. Сенджером**

Инсулин это полипептид с м.м.
5808;

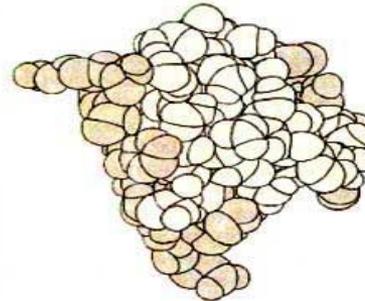
- 51 аминокислота
- 2 полипептидные цепи,
соединенные дисульфидными
мостиками:

цепь А - 21 аминокислота
цепь Б – 30 аминокислот

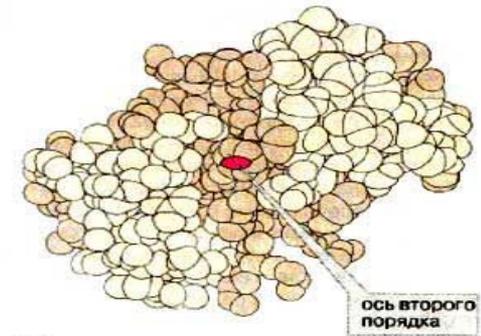
**Аминокислотный состав цепей
видоспецифичен**



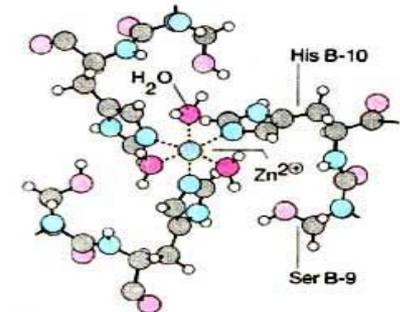
1. Мономер: схема свертывания



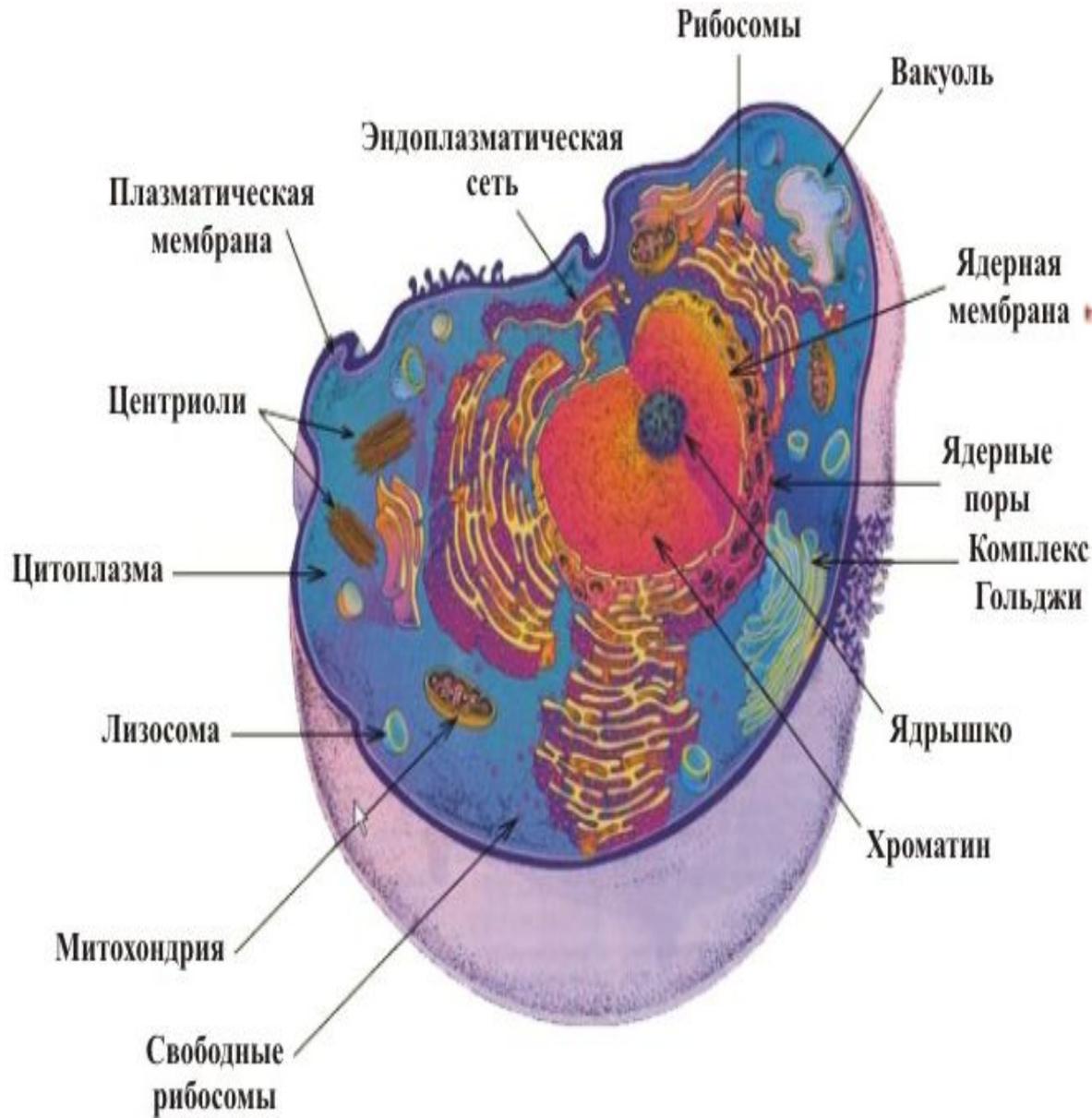
**2. Мономер, вандерваальсова модель
В. Третичная структура**



1. Димер



**2. Zn²⁺-комплекс в гексамере
Г. Четвертичная структура**

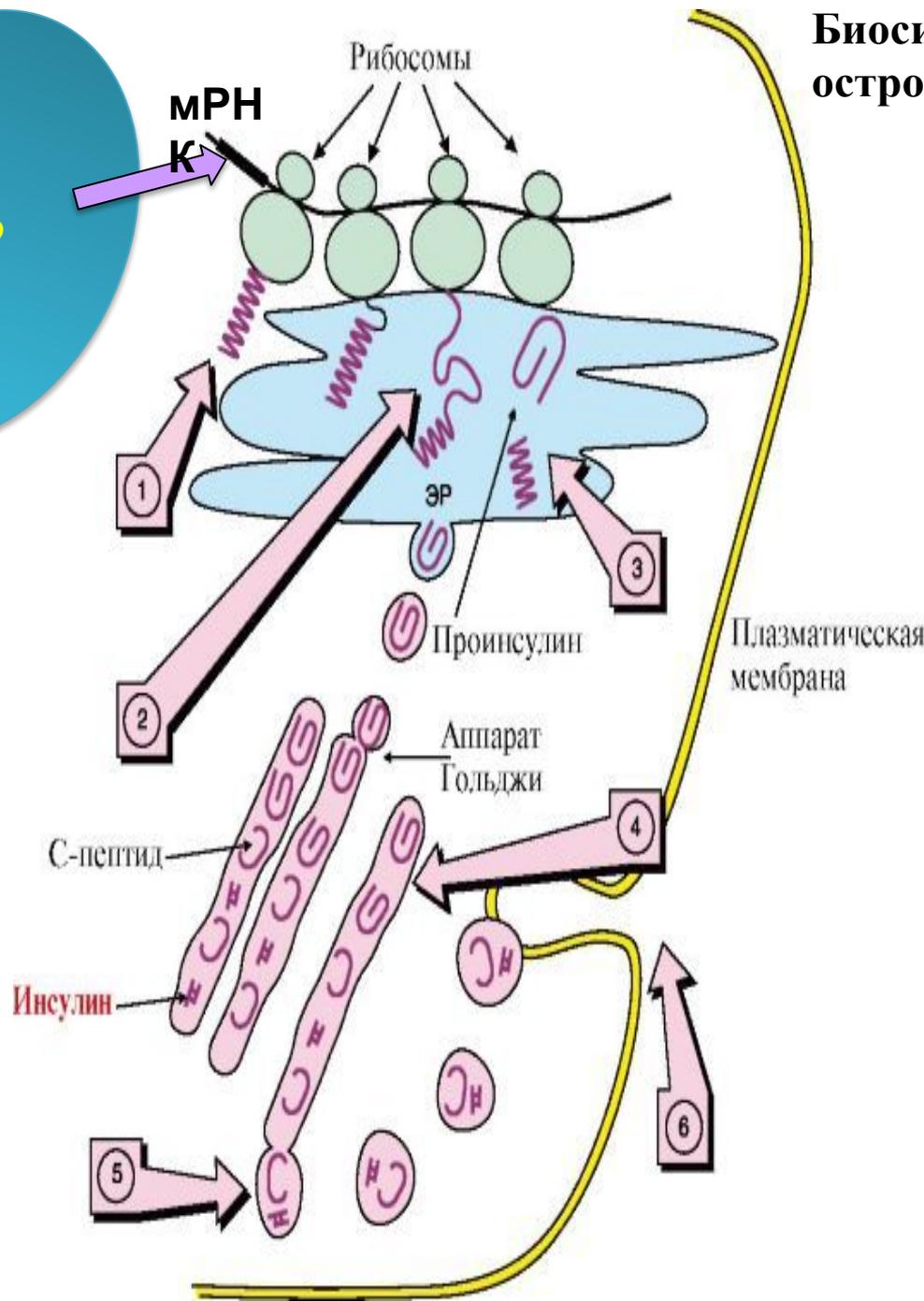


как
происходит
биосинтез
инсулина в
организме, в
 β -клетках
островков
Лангерганса



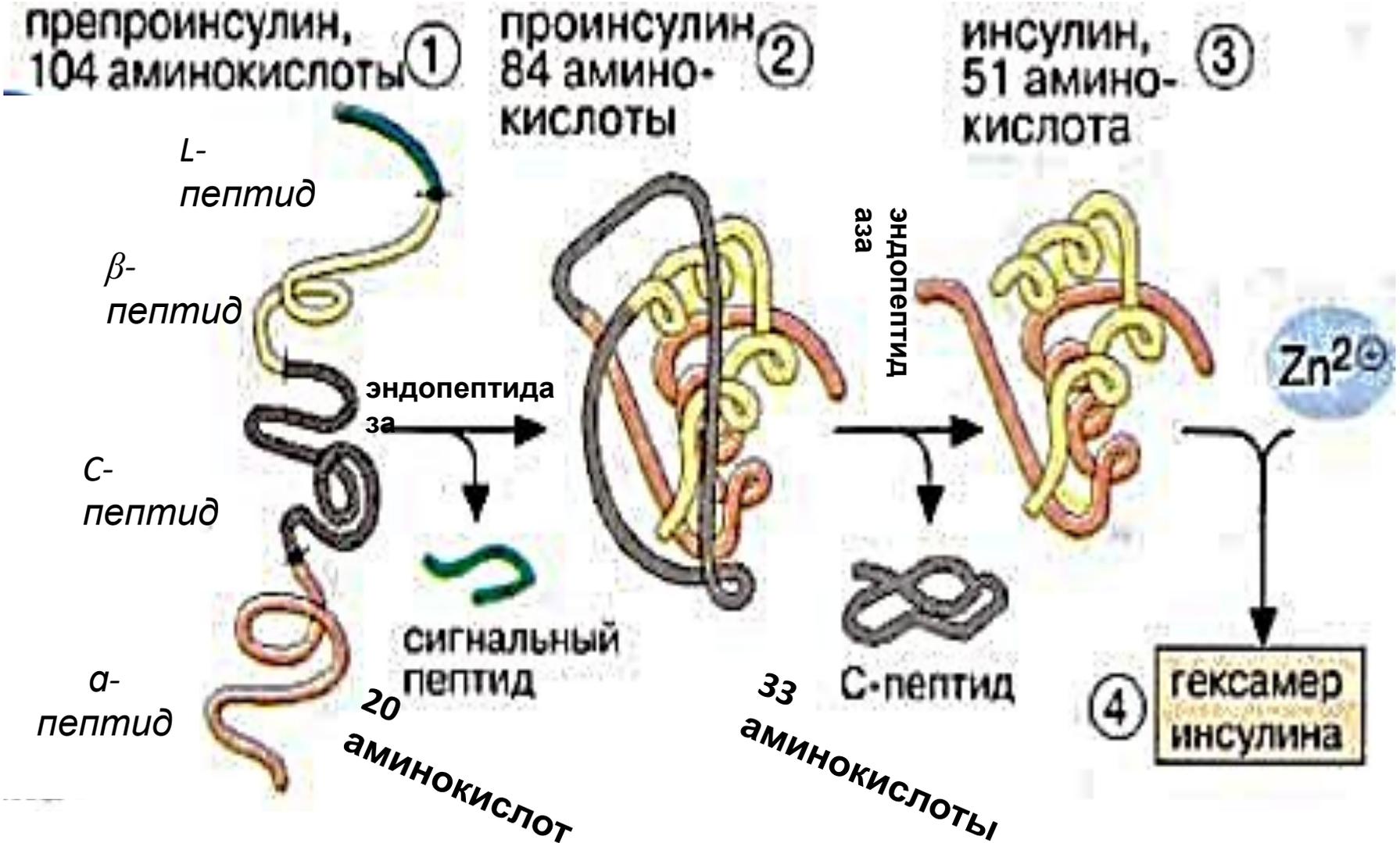
СИНТЕЗ ИНСУЛИНА В КЛЕТКАХ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Биосинтез инсулина в β -клетках островков Лангерганса

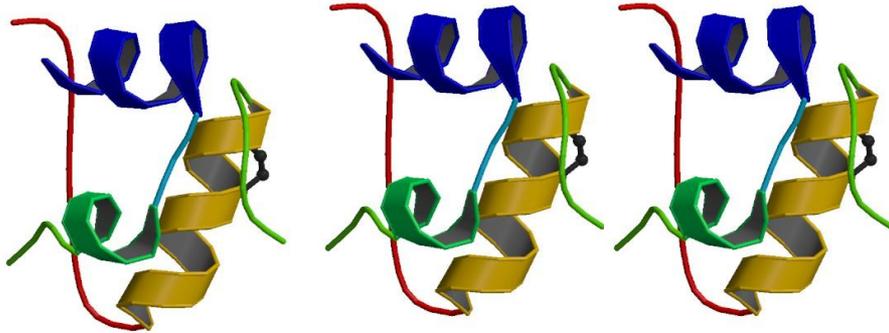


- 1 - синтез полипептидной цепи препроинсулина;
- 2 - синтез происходит на полирибосомах, прикрепленных к наружной поверхности мембраны эндоплазматического ретикулума (ЭР);
- 3 - сигнальный пептид отщепляется по завершении синтеза полипептидной цепи и образуется проинсулин;
- 4 - проинсулин транспортируется из ЭР в аппарат Гольджи и расщепляется на инсулин и С-пептид;
- 5 - Молекулы инсулина, соединяются с ионами [цинка](#) и образуют кристаллические гексамерные агрегаты. Кристаллы инсулина включаются в секреторные гранулы и депонируются,
- 6 - секреторные гранулы депонируются и транспортируются к плазматической мембране для высвобождения.

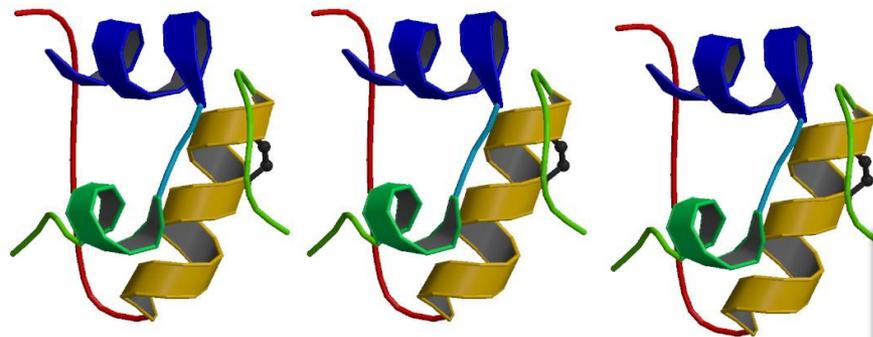
Биосинтез инсулина в β -клетках островков Лангерганса



МОНОМЕРЫ ИНСУЛИНА



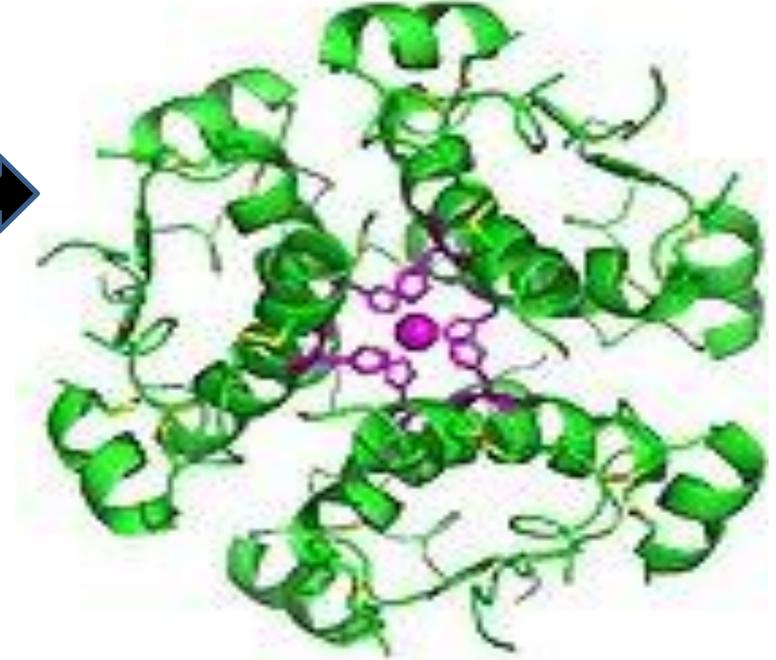
+ 2 Zn²⁺



Биологически активные
молекулы инсулина

Структура кристалла инсулина, депонируемого в β -клетках островков ЛАНГЕРГАНСА.

Image of six insulin molecules assembled in a hexamer, highlighting the threefold [symmetry](#), the [zinc](#) ions holding it together, and the [histidine](#) residues involved in zinc binding. Insulin is stored in the body as a hexamer, while the active form is the monomer.



После экзоцитоза кристаллы инсулина, попадают в межклеточное пространство и кровотоки. Изменение физических свойств среды приводит к отщеплению цинка и распаду кристаллического неактивного инсулина на отдельные молекулы, которые и обладают биологической активностью.

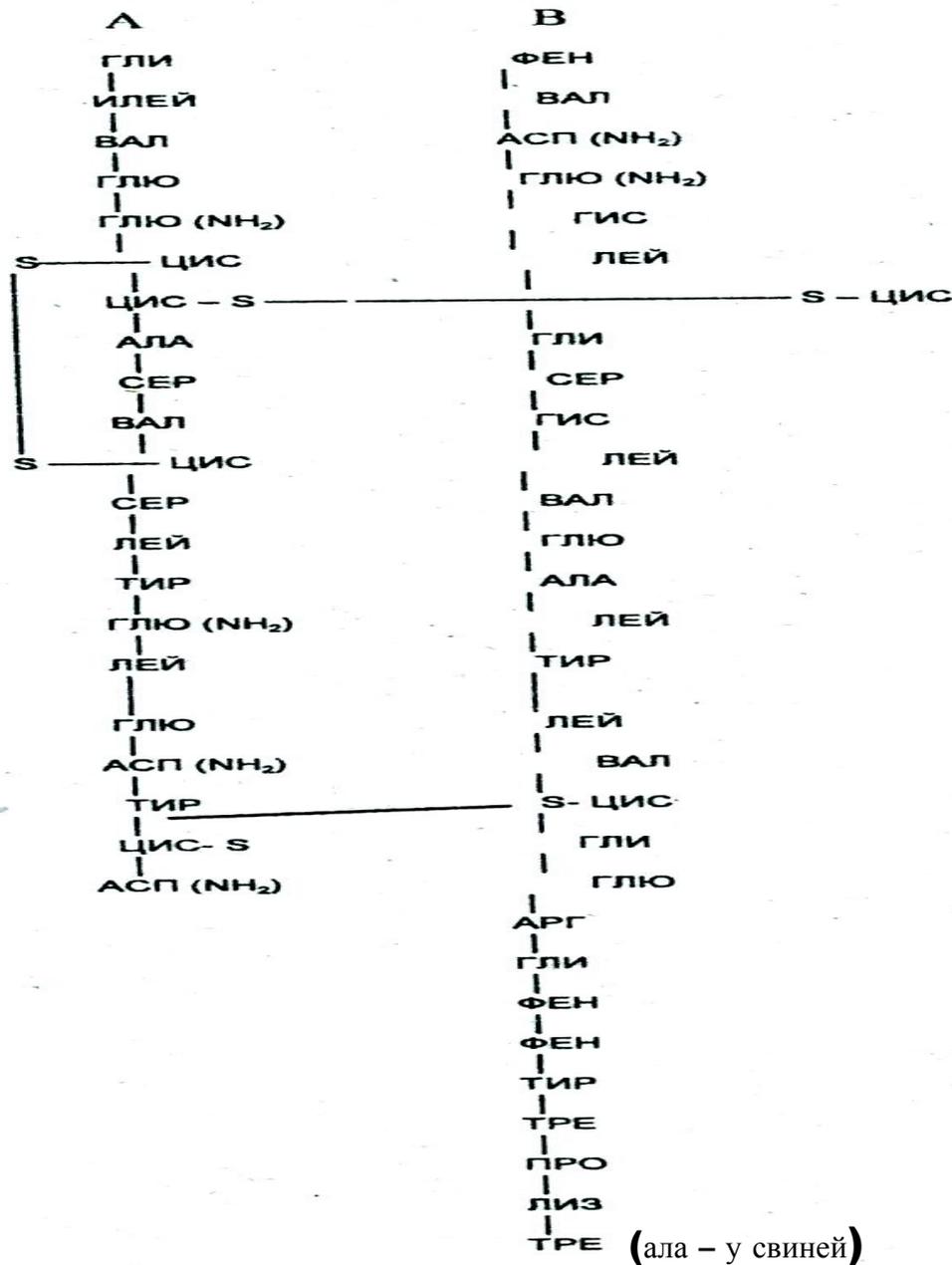
БИОСИНТЕЗ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ИНСУЛИНА

I. Замещение 1 аминокислоты в молекуле свиного инсулина

II. Синтез α - и β -цепей инсулина в клетках *E. Coli* с последующим соединением их в молекулу гормона (*Великобритания*)

III. Синтез проинсулина в клетках *E. Coli* с последующим преобразованием в инсулин (*РАН ИБОХ*)

Преобразование инсулина свиней в инсулин человека



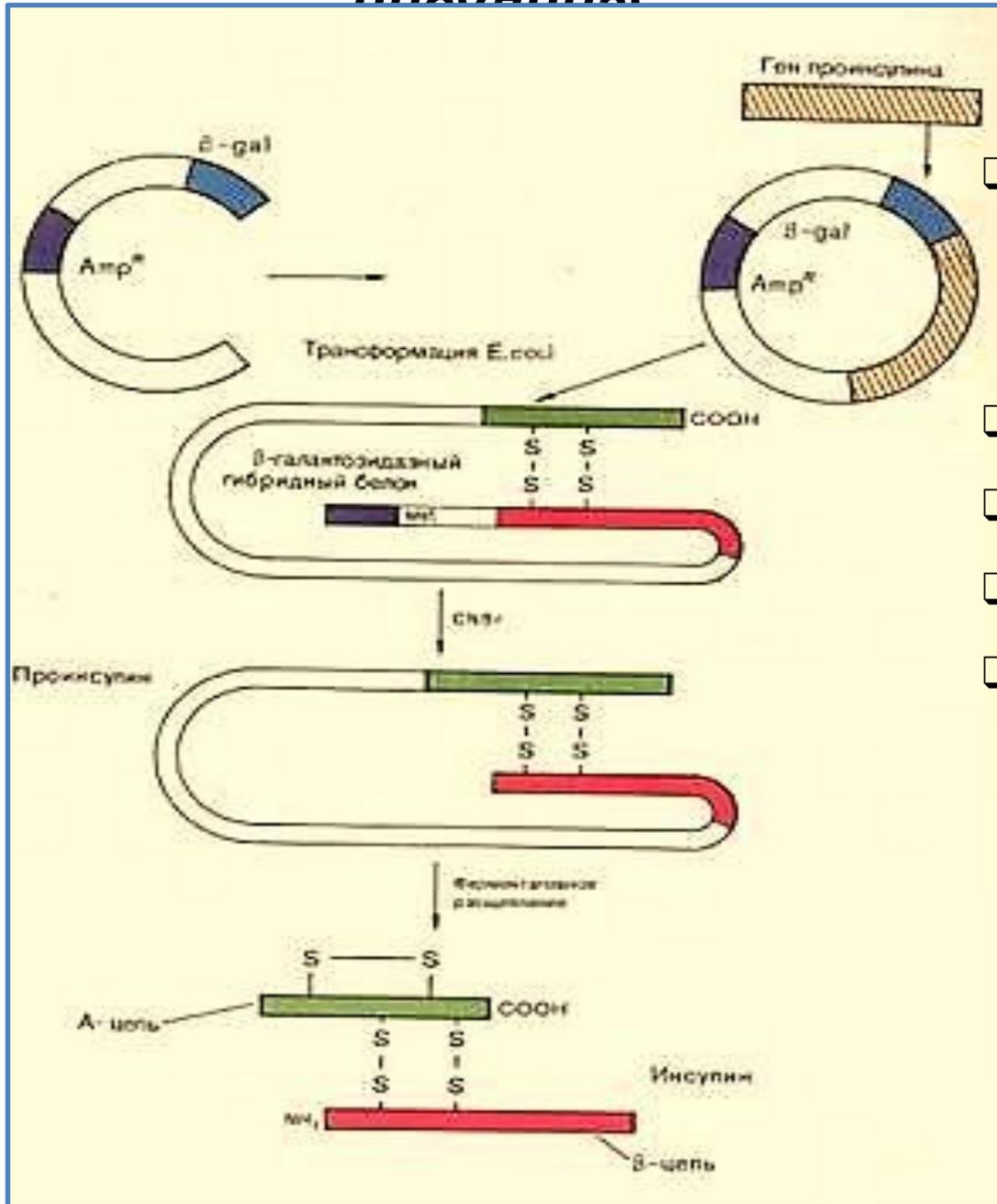
Моноинсулин

Ферментативное замещение 30-й аминокислоты в цепи В (у свиней – это аланин) на треонин (у человека) и последующая хроматографическая очистка

Метод разработан в 1980г. датской фармкомпанией «Novo»

Микробиологический синтез

ИНСУЛИН



- ❑ Химическим путем создают синтетический ген проинсулина. На N-конце гена - кодон ТАС (метионин), а на С-конце - два стоп-кодона (*терминатор*).
- ❑ Ген присоединяют к фрагменту гена β -галактозидазы *E. coli* в **С-концевой части**. Образующийся гибридный ген имеет свой *промотор* и свой *рибо-сом-связывающий* участок
- ❑ Встраивают в плазмиду *VpR322* с помощью ДНК-лигазы
- ❑ Гибридный ген трансформируют в клетку-хозяина
- ❑ Выделяют и культивируют трансформированные клетки
- ❑ Проинсулин, в составе **β -галактозидазного гибридного белка** выделяют и подвергают химико-ферментативной трансформации в той же последовательности, что и *in vivo*:
 - отщепляют β -галактозидазный фрагмент,
 - проводят **окислительный сульфитолиз с последующим восстановительным замыканием 3-х дисульфидных связей**
 - Ферментативно (эндопептидаза)

Очистка синтетического инсулина

- Важно очистить инсулин проинсулина, который индуцируют выработку **антиинсулиновых антител**.
- Используется хроматографическая очистка:
 - Ионообменная,
 - Гелевая
 - ВЭЖХ.
 - Наиболее эффективна аффинная хроматография

Стандартизация инсулина

- По чистоте классифицируют препараты инсулина на 4 группы, в зависимости от содержания проинсулина:
 - обычные, содержат проинсулин более 1%
 - монопиковые – менее 0,3% (**Гельфильтрационная хроматография**)
 - улучшенные монопиковые – менее 0,005%
 - монокомпонентные – менее 0,001%
- Полный контроль производства генноинженерного инсулина включает:
 - контроль стабильности рекомбинантного штамма и плазмиды,
 - отсутствие постороннего генетического материала в препарате,
 - идентичность экспрессируемого гена
 - и т.д., всего 22 показателя.

Инсулины короткого действия (начало действия обычно через 30-60 мин; максимум действия через 2-4 ч; продолжительность действия до 6-8 ч):

- ☛ инсулин растворимый [человеческий генно-инженерный] (Актрапид НМ, Генсулин Р, Ринсулин Р, Хумулин Регуляр);
- ☛ инсулин растворимый [человеческий полусинтетический] (Биогулин Р, Хумодар Р);
- ☛ инсулин растворимый [свиной монокомпонентный] (Актрапид МС, Монодар, Моносунсулин МК).

Инсулины ультракороткого действия (гипогликемический эффект развивается через 10-20 мин после п/к введения, пик действия достигается в среднем через 1-3 ч, длительность действия составляет 3-5 ч):

- ☛ инсулин лизпро (Хумалог);
- ☛ инсулин аспарт (НовоРапид Пенфилл, НовоРапид ФлексПен);
- ☛ инсулин глужизин (Алидра).

ИНСУЛИНЫ

Препараты инсулина комбинированного действия (бифазные препараты) (гипогликемический эффект начинается через 30 мин после п/к введения, достигает максимума через 2-8 ч и продолжается до 18-20 ч):

- ☛ инсулин двухфазный [человеческий полусинтетический] (Биогулин 70/30, Хумодар К25);
- ☛ инсулин двухфазный [человеческий генно-инженерный] (Гансулин 30Р, Генсулин М 30, Инсуман Комб 25 ГТ, Микстард 30 НМ, Хумулин М3);
- ☛ инсулин аспарт двухфазный (НовоМикс 30 Пенфилл, НовоМикс 30 ФлексПен).

Препараты инсулина пролонгированного действия включают в себя препараты средней продолжительности действия и препараты длительного действия.

Инсулины средней длительности действия (начало через 1,5-2 ч; пик спустя 3-12 ч; продолжительность 8-12 ч):

- ☛ инсулин-изофан [человеческий генно-инженерный] (Биосулин Н, Гансулин Н, Генсулин Н, Инсуман Базал ГТ, Инсуран НПХ, Протафан НМ, Ринсулин НПХ, Хумулин НПХ);
- ☛ инсулин-изофан [человеческий полусинтетический] (Биогулин Н, Хумодар Б);
- ☛ инсулин-изофан [свиной монокомпонентный] (Монодар Б, Протафан МС);
- ☛ инсулин-цинк суспензия составная (Монотард МС).

Инсулины длительного действия (начало через 4-8 ч; пик спустя 8-18 ч; общая продолжительность 20-30 ч):

- ☛ инсулин гларгин (Лантус);
- ☛ инсулин детемир (Левемир Пенфилл, Левемир ФлексПен).

Соматотропный гормон

- Обратимся к литературе. И на сей раз к приключенческой. Но вовсе не замысловатый сюжет повести Еремея Парнова «Ларец Марии Медичи» привлек наше внимание к ней. Дело здесь в ином, во вполне банальной жизненной ситуации, в которой по воле автора оказываются главные герои. Их, как и положено, двое — он и она, Вера Фабиановна и Лев Минеевич. Она — высокая, властная и по сей день замечательно красивая старуха, он — маленький, пухленький старичок с детскими ручонками. И тот и другой не раз и не два задумывались на склоне лет, почему же, собственно, так и не соединились их судьбы?
- А виной тому была так, безделица, совсем пустячок — маленький рост Льва Минеевича. Стоит ли дальше рассуждать по этому поводу? Или и так всем все понятно?



Между тем беде Льва Минеевича, пояись он на свет лет эдак на 65 попозже, вполне можно было б помочь. По крайней мере, искусственно синтезируемый *соматотропин* (гормон роста), *продуцируемый в организме гипофизом*, важнейшей железой эндокринной системы, сегодня — реально существующий препарат. И, как очевидно из вышеприведенной информации, производство его весьма доходное, а сам он — предмет коммерции многих фирм, занимающихся сбытом биотехнологической

«Открытие» соматотропина произошло задолго до XX столетия. Правда, врачи и алхимики средневековья не предполагали, какое именно активное начало содержится в экстракте, приготовленном из железы, что расположена у самого основания черепа. Но зато они знали, как из него сделать экстракт и как с его помощью вырастить чудовищно гигантских крыс.

Экспериментировали с гипофизом и в XIX столетии, а в XX веке гипофизы умерших или погибших по разным причинам людей стали для медиков и фармакологов единственным источником соматотропина, с помощью которого они возвращали нуждающимся в помощи детям, в некотором смысле обделенным природой, высокий рост. А вместе с ним — красоту и уверенность в себе.

Но курс лечения долог и эффективен только при наличии нужных количеств дефицитного гормона. Под словами «нужных количеств» здесь имеются в виду вполне конкретные цифры: **полный курс лечения**, обеспечивающий мальчику или девочке нормальное развитие, предполагает такое количество соматотропина, которое в состоянии наработать **100—150 человеческих гипофизов**. А где их столько взять?

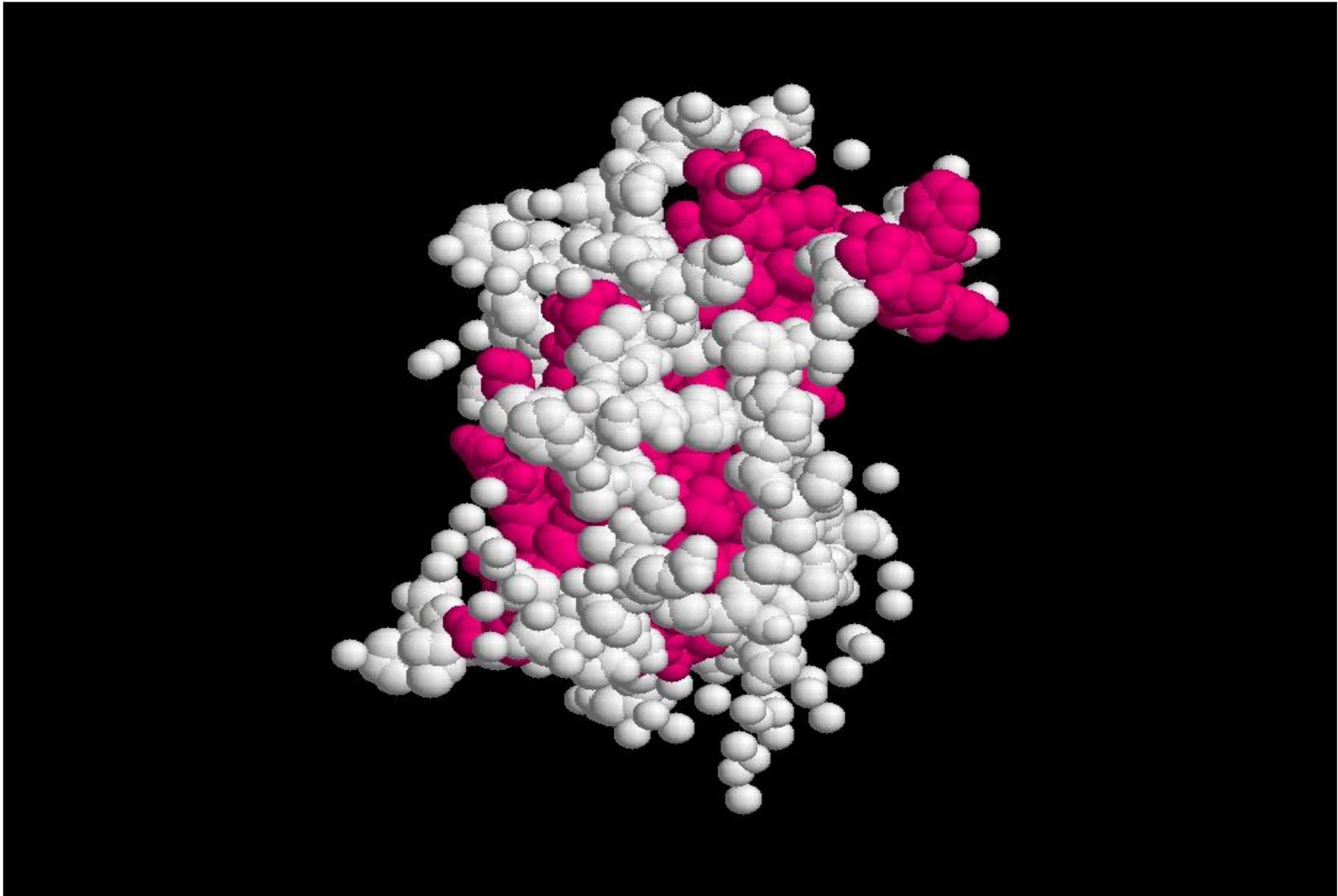
Ну зачем же так категорично ставить вопрос, возможно, поправит меня читатель, ведь никто не запрещает специалистам воспользоваться гипофизами животного происхождения, они ведь тоже продуцируют соматотропин.

В том-то и дело, что человеку нужен только человеческий гормон роста. Препарат животного происхождения (точнее, выделенный из гипофиза крупного рогатого скота) ему не подходит, поскольку гормон роста — видоспецифический.

Правда, как и во всяком правиле, здесь тоже есть исключение. Крыса, например, на соматотропин любого происхождения реагирует как на свой собственный, столь пластична и легко приспособляема ее природа.

Но человек — не крыса; его «любой» гормон не устраивает. Значит, уповать придется только на чужью белку. Вот почему до недавнего времени все

Рукотворный синтезатор белков (*метод Меррифилда — твердофазного синтеза белков. Вспомните, ученый «пришивал» к поверхности твердого носителя собираемые в определенной последовательности аминокислоты полипептидов*) ПОКА НЕ ИДЕТ НИ В какое сравнение с естественным, природным синтезатором — живой клеткой, в котором белки производятся по аналогичной схеме, а вот ошибки исключаются вовсе. Ведь в клетке без усталости трудится, не зная ни смен, ни вахт, собственное ОТК — самоконтроль. Вот почему по точности и эффективности с клеточным производством не может сравниться ничто на свете — в ней молекула управляет молекулой.



**Структура гормона передней доли гипофиза
(СТГ),**

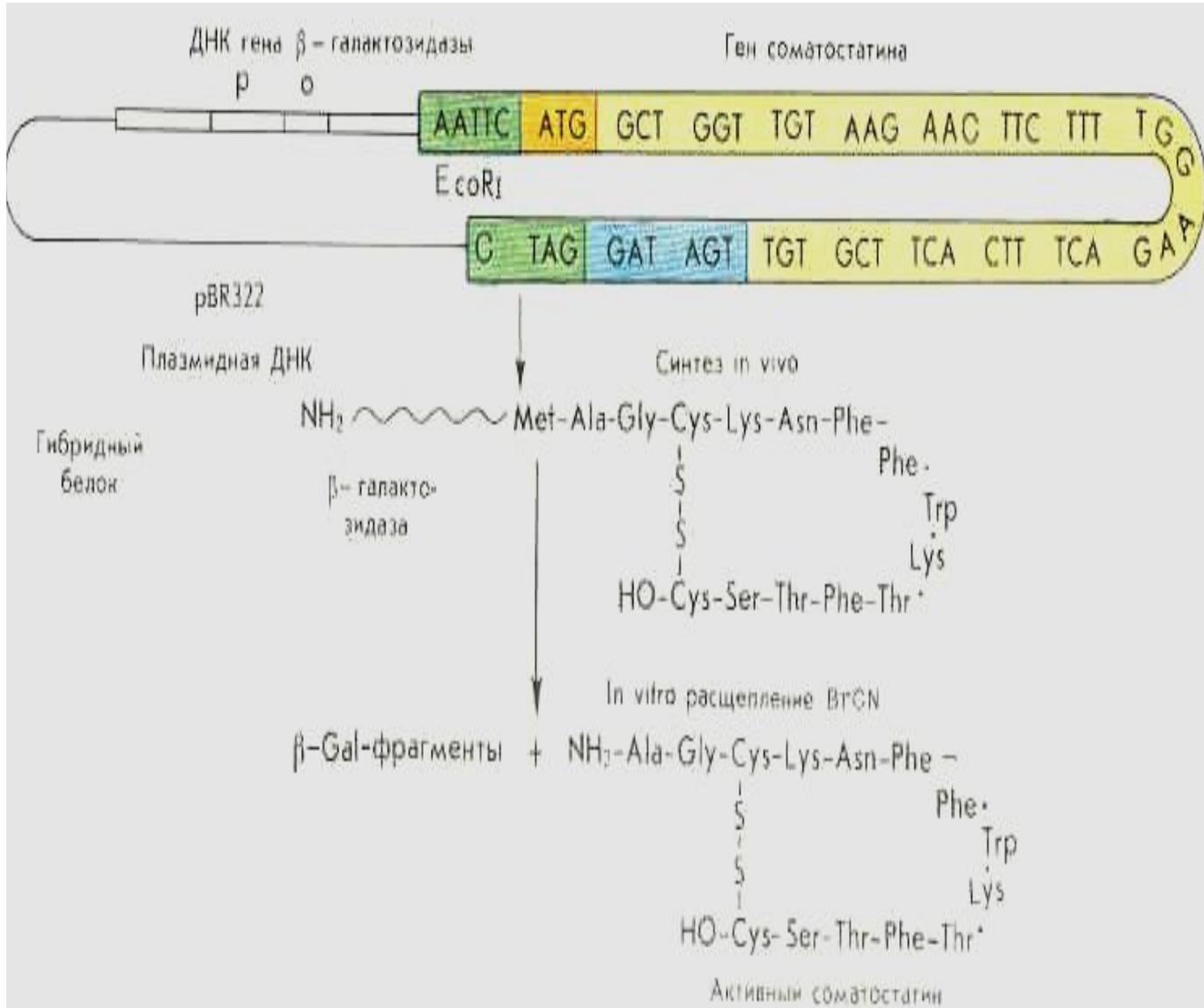
СОМАТОТРОПНЫЙ ГОРМОН (СТГ)

- Состоит из 191 амк. Регулирует рост человека, применяется и для лечения ожогов, переломов, язв.
- 1963 – получали из трупного материала, всего 4-6 мг соматотропина из 1 трупа. Этого количества катастрофически не хватало.
- Кроме того были частыми явления заражения гипофизарного материала нейротоксическим вирусом с очень длительным инкубационным периодом. Этот вирус нередко приводил к летальному исходу реципиентов гормона трупного происхождения. В **1985** г. ВОЗ запретила применение СТГ, выделяемого из трупных человеческих гипофизов.
- В 1980 г. фирмой «Genentech» получен **рекомбинантный СТГ – соматрем**. Отличается более высокой активностью от искусственно получаемого гипофизарного ввиду более высокой степени очистки.

- *Схема экспрессии чужеродных генов довольно проста, но на практике возникают следующие проблемы.*
- ***Регуляторные сигналы эукариот сильно отличаются от регуляторных сигналов бактерий и не узнаются бактериальными РНК-полимеразами и рибосомами. При клонировании в бактериях ДНК эукариотической клетки экспрессия не происходит, поскольку в бактериальной клетке отсутствует система "сплайсинга".***
- *Поэтому для осуществления экспрессии эукариотического гена соответствующая кДНК присоединяется в составе векторной молекулы к регуляторным элементам бактерии - промотору и рибосом-связывающему участку.*
- *Присоединение ведется таким образом, что кодирующая часть эукариотического гена присоединяется к кодирующей части бактериального гена так, чтобы сохранялась "рамка" считывания. В этом случае образуются гибридные белки, содержащие в N-концевой части бактериальный белок или его часть, а в С-концевой части - эукариотический белок. Примером использования такого способа экспрессии является получение зонда для гормона*

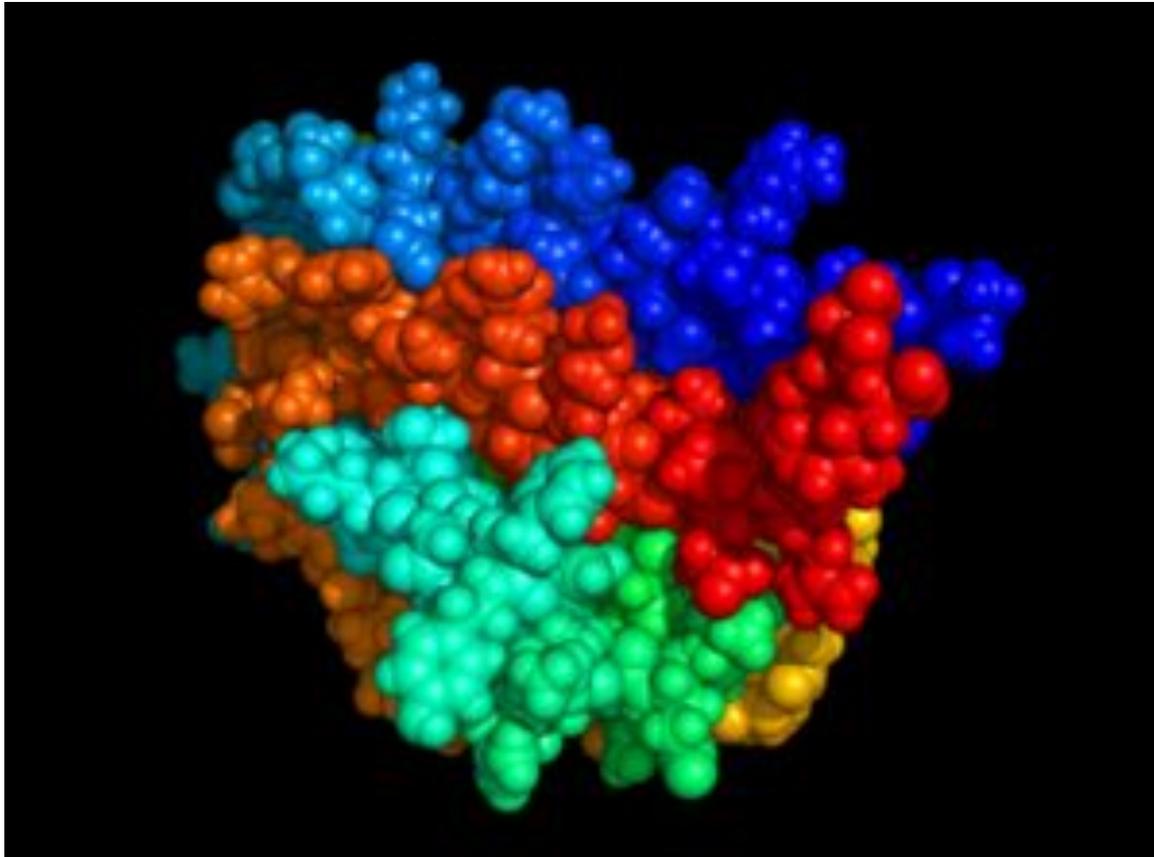
- *Получение гонадотропного гормона в клетках E. Coli разработано К. Итакурой и Г. Бойером.*
- *Аминокислотная последовательность этого гормона была известна биотехнологам, и исходя из нее, согласно генетическому коду, была выведена структура соответствующего искусственного гена.*
- *После этого был осуществлен его синтез: ген содержал на N-конце кодон АТС, кодирующий метионин, и липкий конец, соответствующий расщеплению рестриктазой EcoRI - **AATT**, а на С-конце - два стоп-кодона.*
- *Этот фрагмент ДНК был присоединен к фрагменту гена бета-галактозидазы E. coli, содержащему в С-концевой части участок расщепления EcoRI, и вместе со своим промотором и оператором был встроен в плазмиду pBR322. В результате такого соединения получен гибридный ген, в котором С-концевая часть гена бета-галактозидазы заменена "геном" соматостатина. **Между геном бета-галактозидазы и собственно геном соматостатина находится кодон метионина.***

Получение гонадотропного гормона соматостатина через гибридный белок - бета-галактозидазу



- В образующемся химерном белке соматостатин отделен от галактозидазной части остатком метионина.
- Поскольку соматостатин (ЛВ) не содержит метиониновых остатков, то химерный белок расщепляют бромцианом и отделяют соматостатин в виде целого пептида

Эритропоэтин



Структура молекулы эритропоэтина (схема)

Эритропоэтин

- Гормон гликопротеиновой природы, 165 амк, м.м. 30400. Эритропоэтин вырабатывается в почках в ответ на тканевую гипоксию. Он воздействует на специфические рецепторы костного мозга и стимулирует пролиферацию, [МИТОЗ](#) и созревание [эритроцитов](#). Секреция эритропоэтина почками усиливается при кровопотере, различных [анемических](#) состояниях (железо-, фолат- и В12-дефицитных анемиях, анемиях, связанных с поражениями [костного мозга](#) и др.), при гипоксических состояниях.
- Как ЛС показан больным с почечной недостаточностью и выраженной анемией. Повышает уровень гемоглобина, полезен при СПИДе и раке.
- Получение значимых количеств эритропоэтина человека из почек невозможно из-за низкого его содержания.
- Рекомбинантный человеческий эритропоэтин получают в культуре клеток млекопитающих. Очистка производится ионно-обменной и иммунно-афинной хроматографией, производитель - фирма Amgen (США).
- В РФ НПО «Микроген» выпускает высокоочищенный рекомбинантный эритропоэтин человека с сывороточным альбумином в виде раствора на изотоническом цитратном буфере под названием «Эритростим».