

Министерство образования и науки

Российской Федерации

Санкт – Петербургский национальный исследовательский университет
информационных технологий, механики и оптики

Факультет пищевых биотехнологий и инженерии

Рекомбинантный инсулин



Получение
рекомбинантного
инсулина



ВЫПОЛНИЛА СТУДЕНТКА

ГРУППЫ Т4130: КОПЫЛОВА ТАТЬЯНА

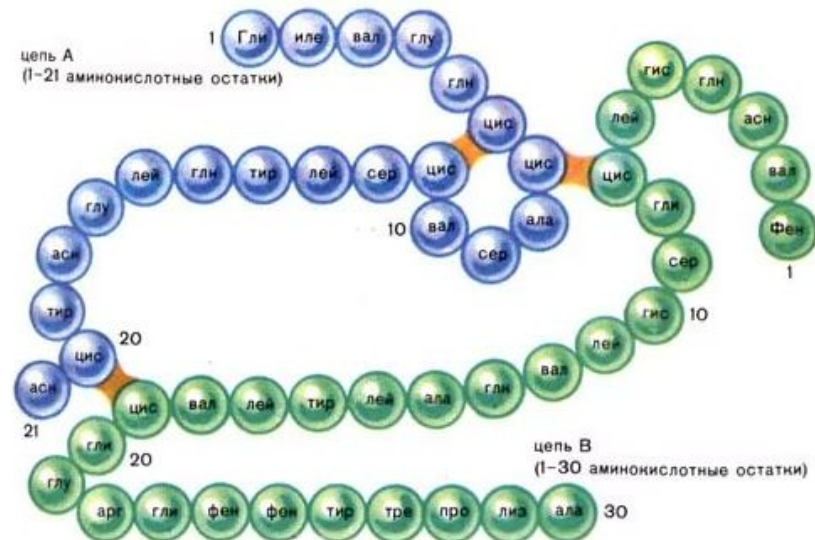
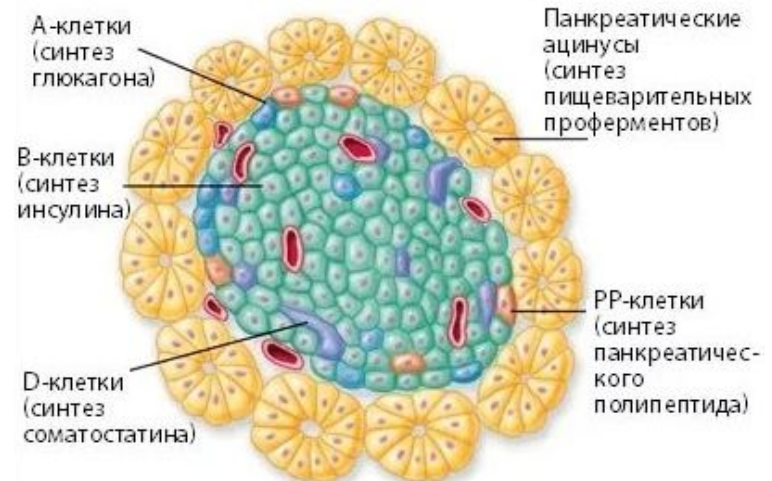
ПРИНЯЛ ПРЕПОДАВАТЕЛЬ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ:

СКВОРЦОВА Н.Н.

Инсулин - пептидный гормон, выделяемый β -клетками о. Лангенгарса.

Состоит из двух пептидных цепей: А-цепь - из 21 аминокислотных остатков. В-цепь содержит 30 аминокислотных остатков. Эти две цепи связаны бисульфидными $-S-S-$ связями, которые обеспечивают пространственную структуру белка инсулина.

Островки Лангерганса поджелудочной железы

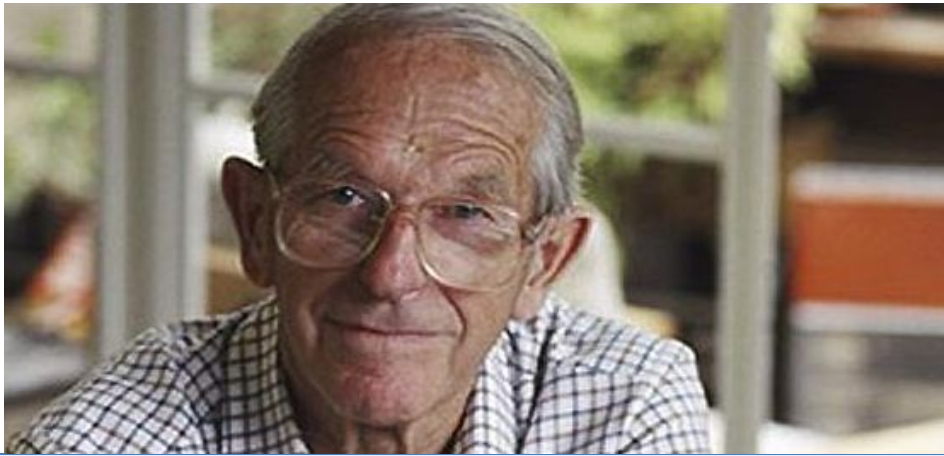


История открытия инсулина связана с именем русского врача **И. М. Соболева** (вторая половина 19 века), доказавшего, что уровень сахара в крови человека регулируется специальным гормоном поджелудочной железы.



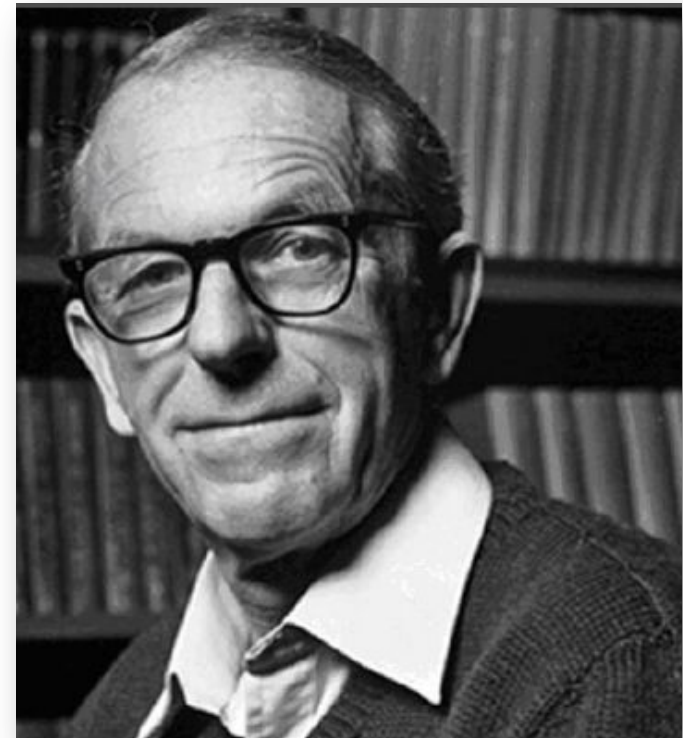
В **1922** году инсулин, выделенный из поджелудочной железы животного, был впервые введен десятилетнему мальчику, больному диабетом. Результат превзошел все ожидания, и уже через год американская фирма «**Eli Lilly**» выпустила первый препарат животного инсулина.





В **1935** году датский исследователь *Хагедорн* оптимизировал действие инсулина в организме, предложив пролонгированный препарат.

Первые кристаллы инсулина были получены в **1952** году, а в **1954** году английский биохимик *Г. Сэнджер* расшифровал структуру инсулина. Развитие методов очистки гормона от других гормональных веществ и продуктов деградации инсулина позволили получить гомогенный инсулин, называемый **однокомпонентным**.





Инсулин был открыт Фредериком Бантингом и Чарльзом Бестом, работавшими в лаборатории Дж. Маклеода в *Торонто в 1921 г.*

Исследователи выделили инсулин из поджелудочной железы собаки и ввели его панкреатэктомизированному животному с клиническими проявлениями СД, что привело к нормализации уровня сахара и купировало симптомы диабета. *Нобелевская премия 1923 г.* по медицине была присуждена Бантингу и Маклеоду.

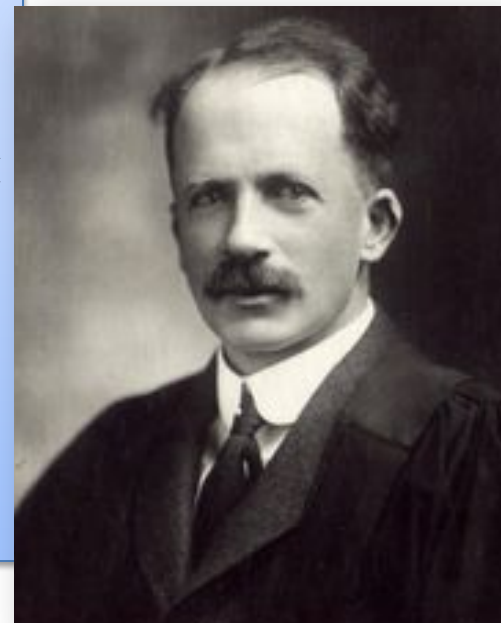




Таблица 1. Различия аминокислотных последовательностей у некоторых млекопитающих

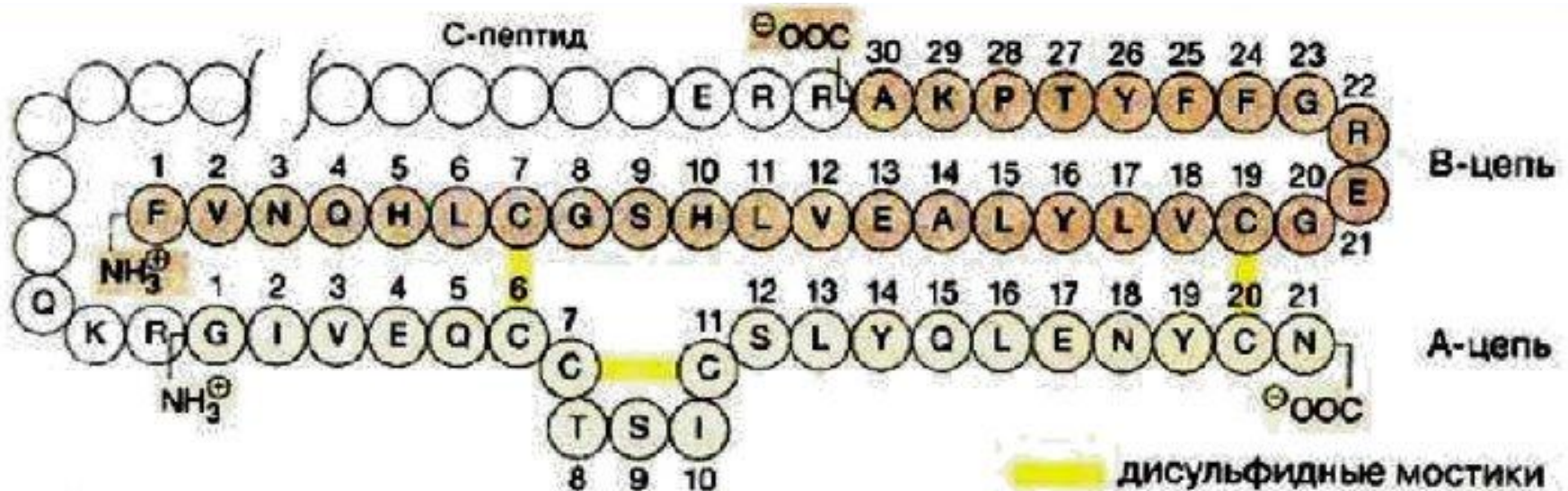
Положение аминокислот				
Инсулин	А-цепь			В-цепь
	8	9	10	30
Человек	треонин	серин	изолейцин	треонин
Свинья	треонин	серин	изолейцин	аланин
Кролик	треонин	серин	изолейцин	серин
Крупный рогатый скот	аланин	серин	валин	аланин
Овца	аланин	глицин	валин	аланин
Собака	треонин	серин	изолейцин	аланин
Кит	аланин	серин	треонин	аланин

Этапы разви



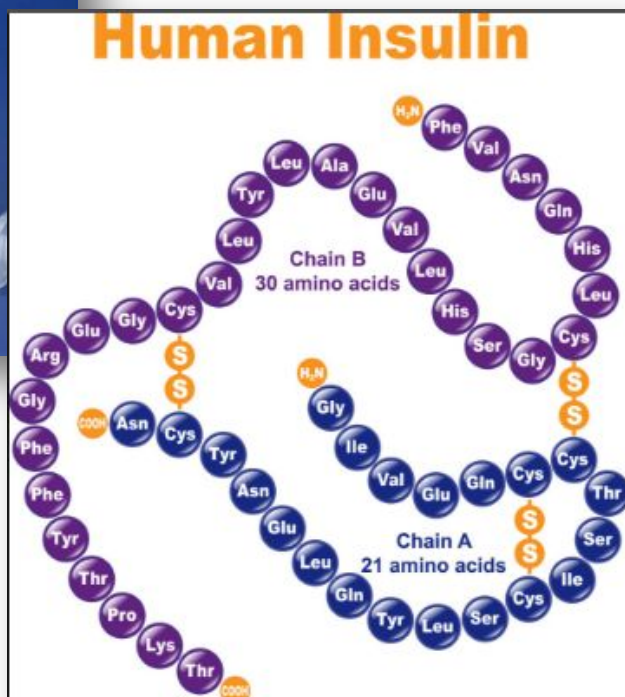
При синтезе инсулина в поджелудочной железе вначале образуется предшественник инсулина - проинсулин. Он состоит из А-цепи, В-цепи и С-пептида, состоящего из 35 аминокислотных остатков.

С-пептид отщепляется под действием карбоксипептидазы и трипсина и проинсулин переходит в активный инсулин.



А. Инсулин: первичная структура

Инсулин был первым лекарственным рекомбинантным препаратом, полученным в промышленных масштабах еще в *1982 г.*

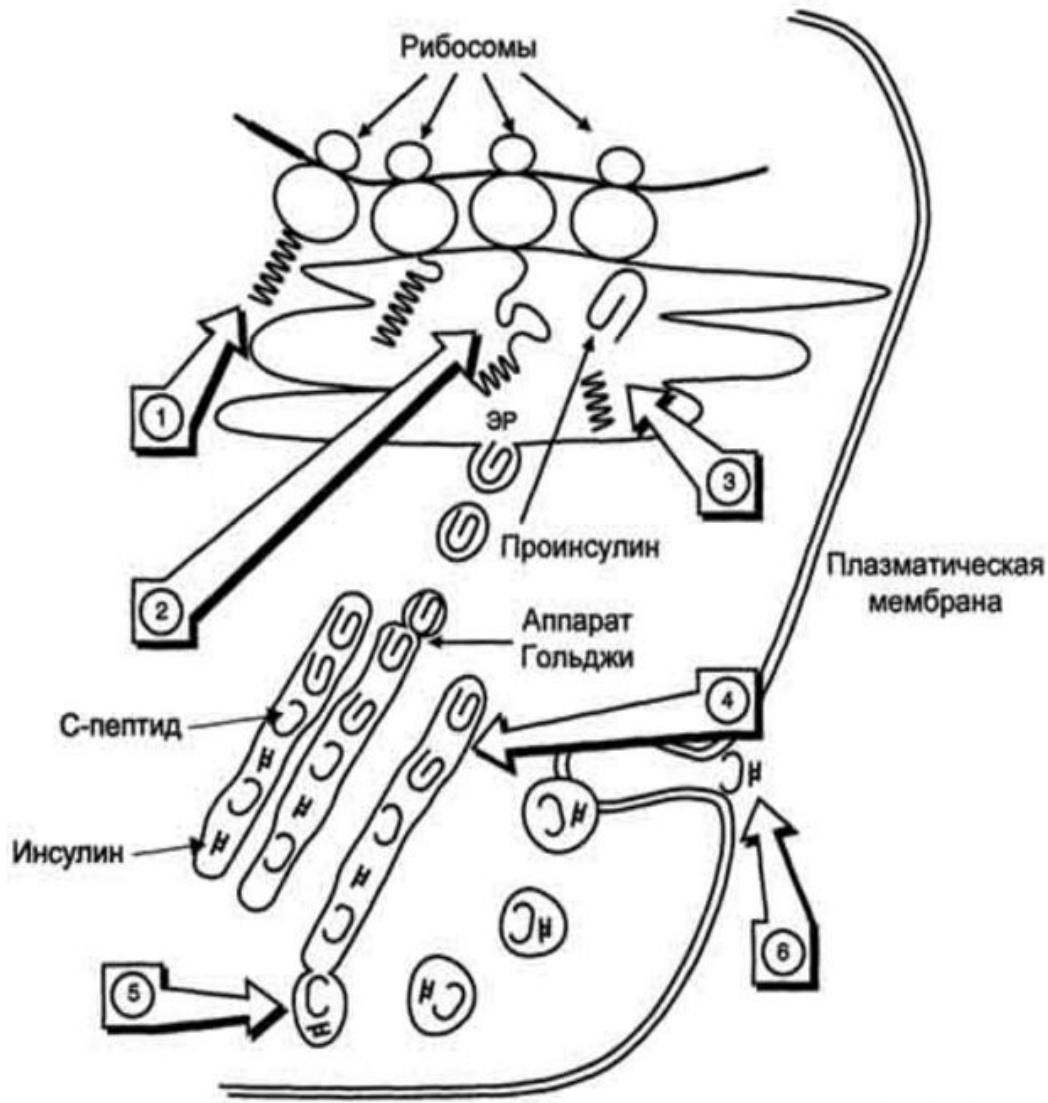




До получения рекомбинантного инсулина препарат получали из поджелудочной железы свиней и крупного рогатого скота. Однако такой способ получения инсулина имел целый ряд недостатков:

- недостаток поголовья скота;
- сложности хранения и транспортировки сырья;
- трудности выделения и очистки гормона;
- возможность развития аллергических реакций.

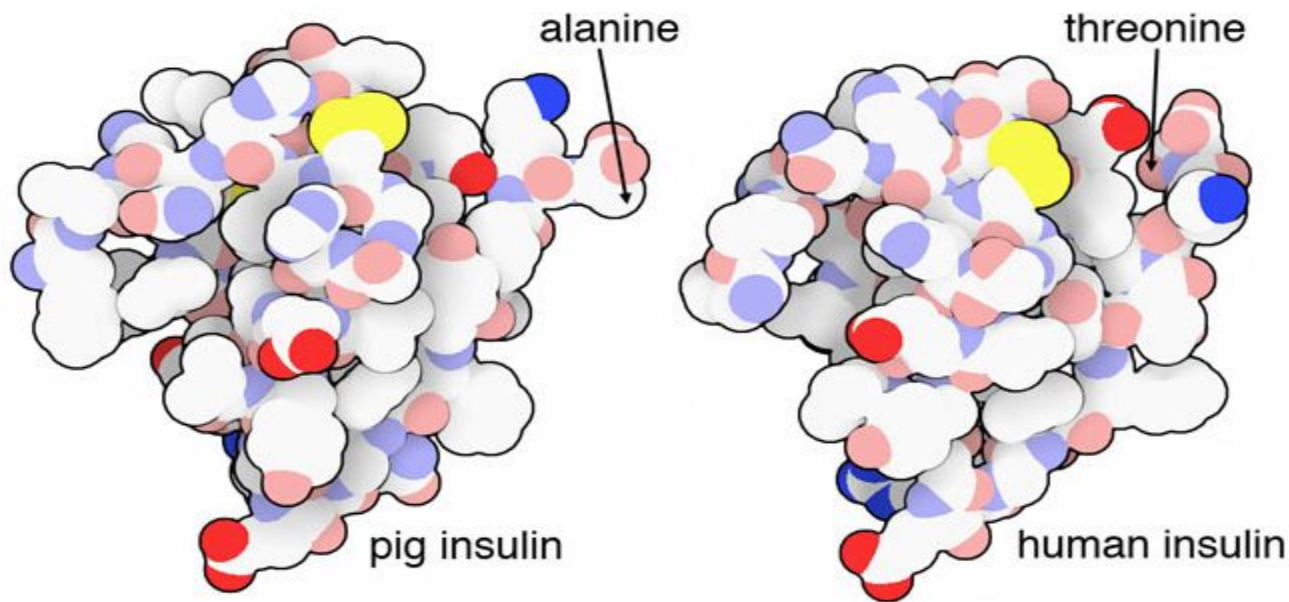
Схема биосинтеза инсулина в β -клетках островков Лангерханса.



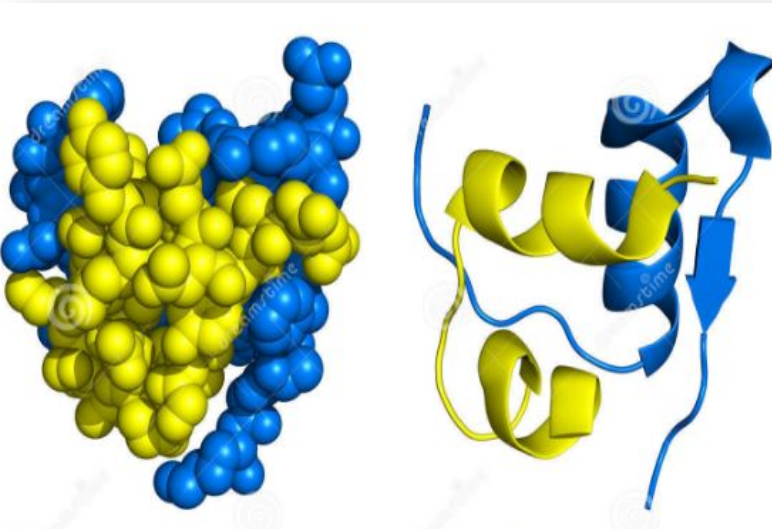
ЭР - эндоплазматический ретикулум.
1 - образование сигнального пептида;
2 - синтез пропроинсулина;
3 - отщепление сигнального пептида;
4 - транспорт проинсулина в аппарат Гольджи; 5 - превращение проинсулина в инсулин и С-пептид и включение инсулина и С-пептида в секреторные гранулы; 6 - секреция инсулина и С-пептида.

Модификация свиного инсулина синтетико-ферментативным методом

Метод основан на том, что свиной инсулин отличается от инсулина человека одной заменой на **С-конце В-цепи** *Ala30Thr*. Замену аланина на треонин осуществляют путем катализируемого ферментом отщепления аланина и присоединение вместо него защищенного по карбоксильной группе остатка треонина, присутствующего в реакционной смеси в большом избытке. После отщепления защитной *О*-трет-бутильной группы получают инсулин человека.

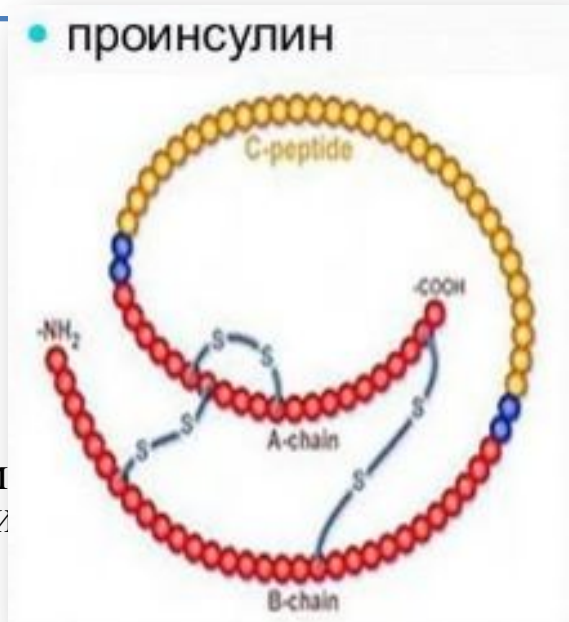


Генно – инженерный способ



изоформ

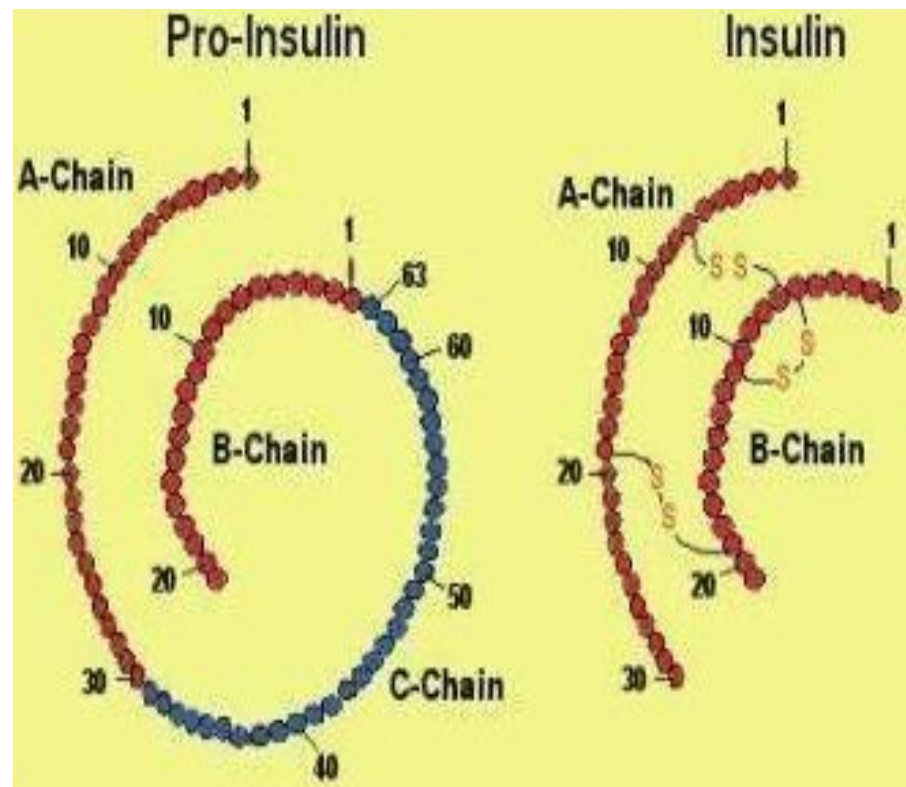
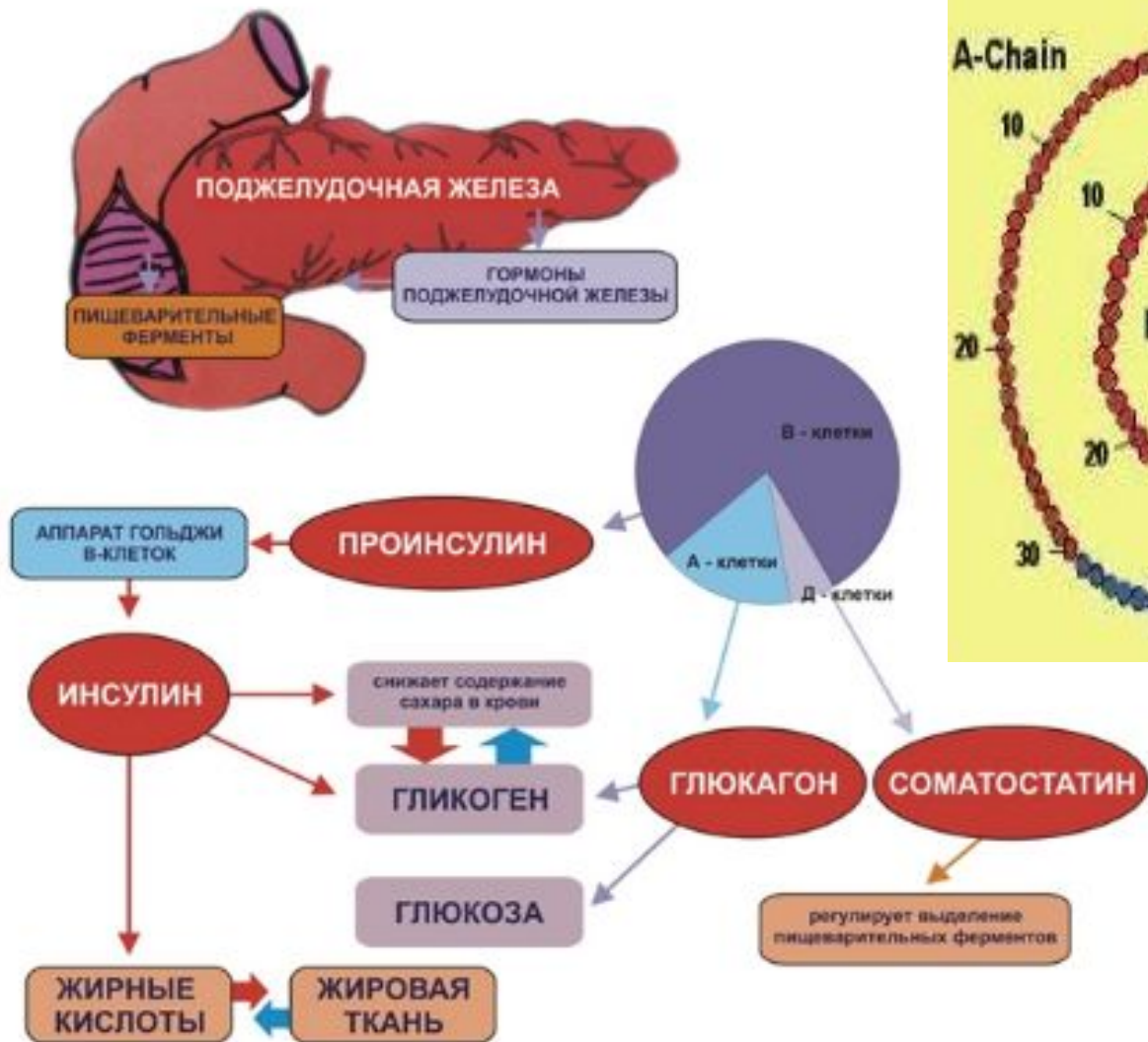
к цепей (разные штам
образование дисульфи



e

- Получение в виде предшественника (проинсулина) с последующим ферментативным расщеплением трипсином и карбоксипептидазой В до активной формы гормона

Проинсулин



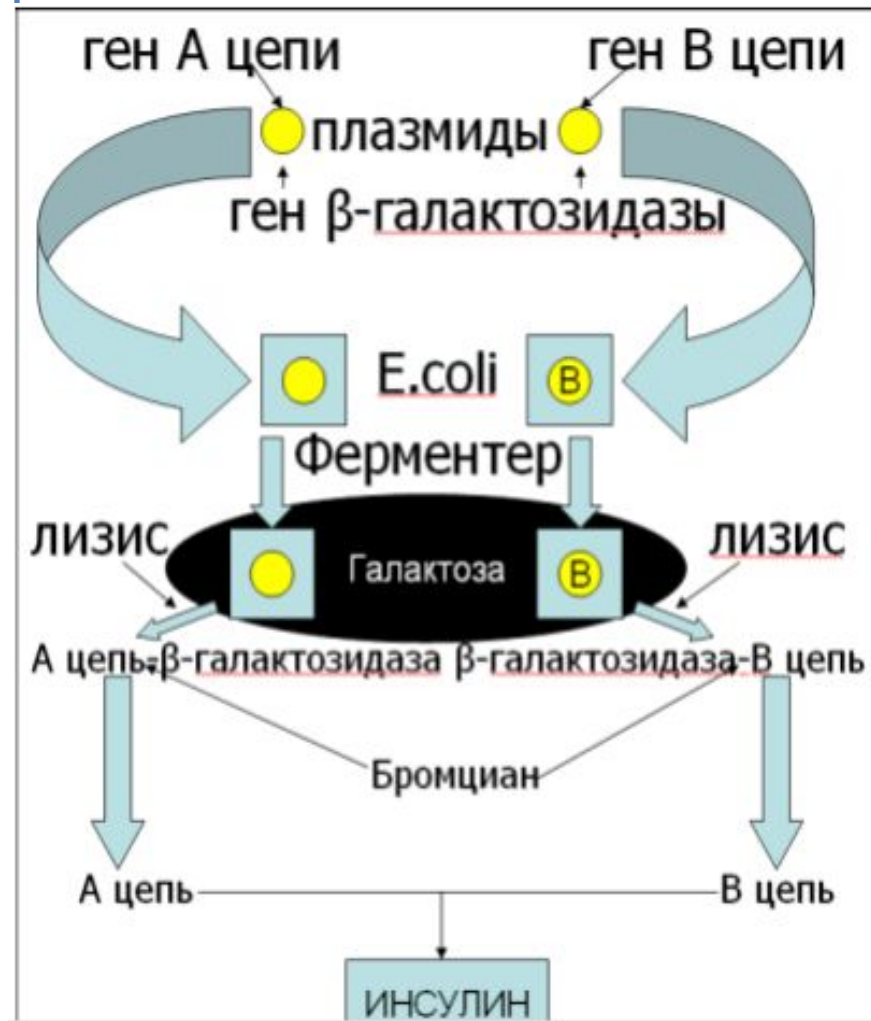
Химический синтез

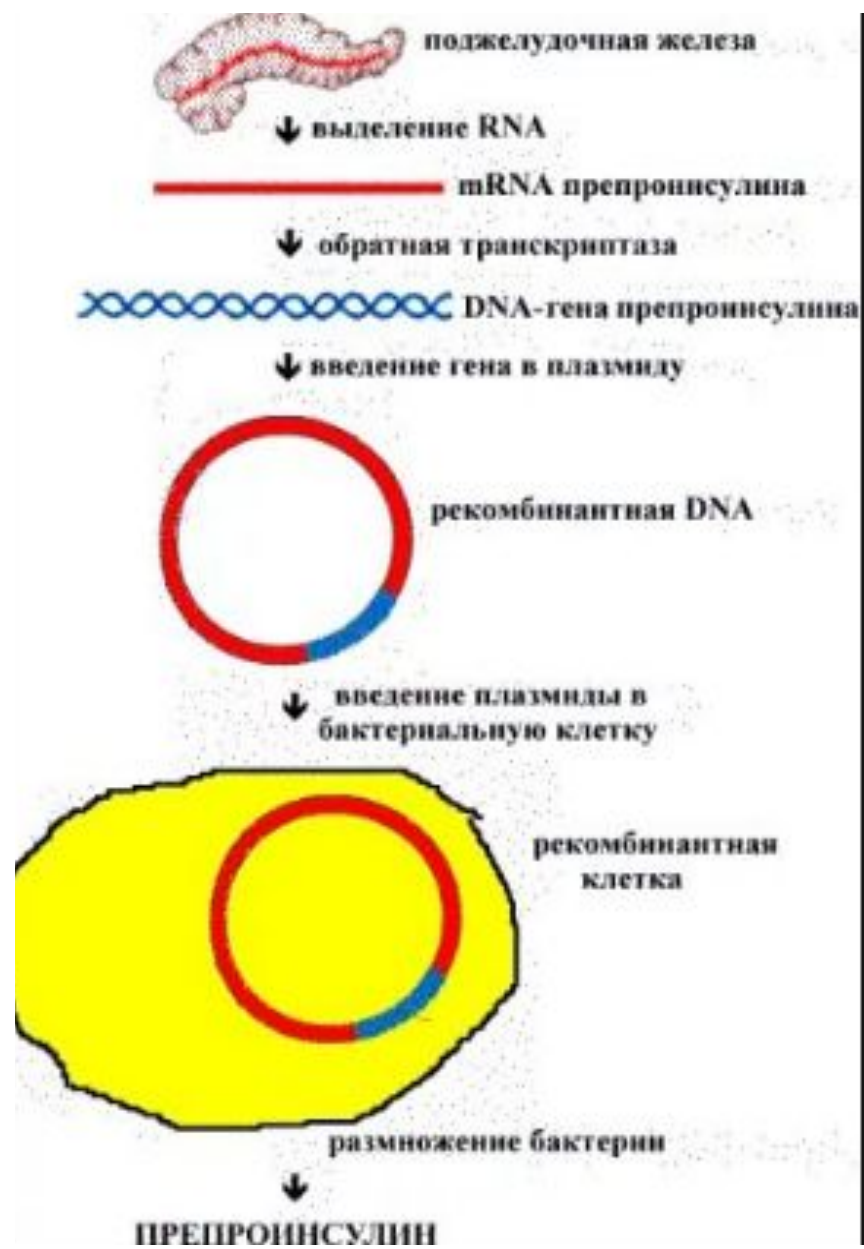
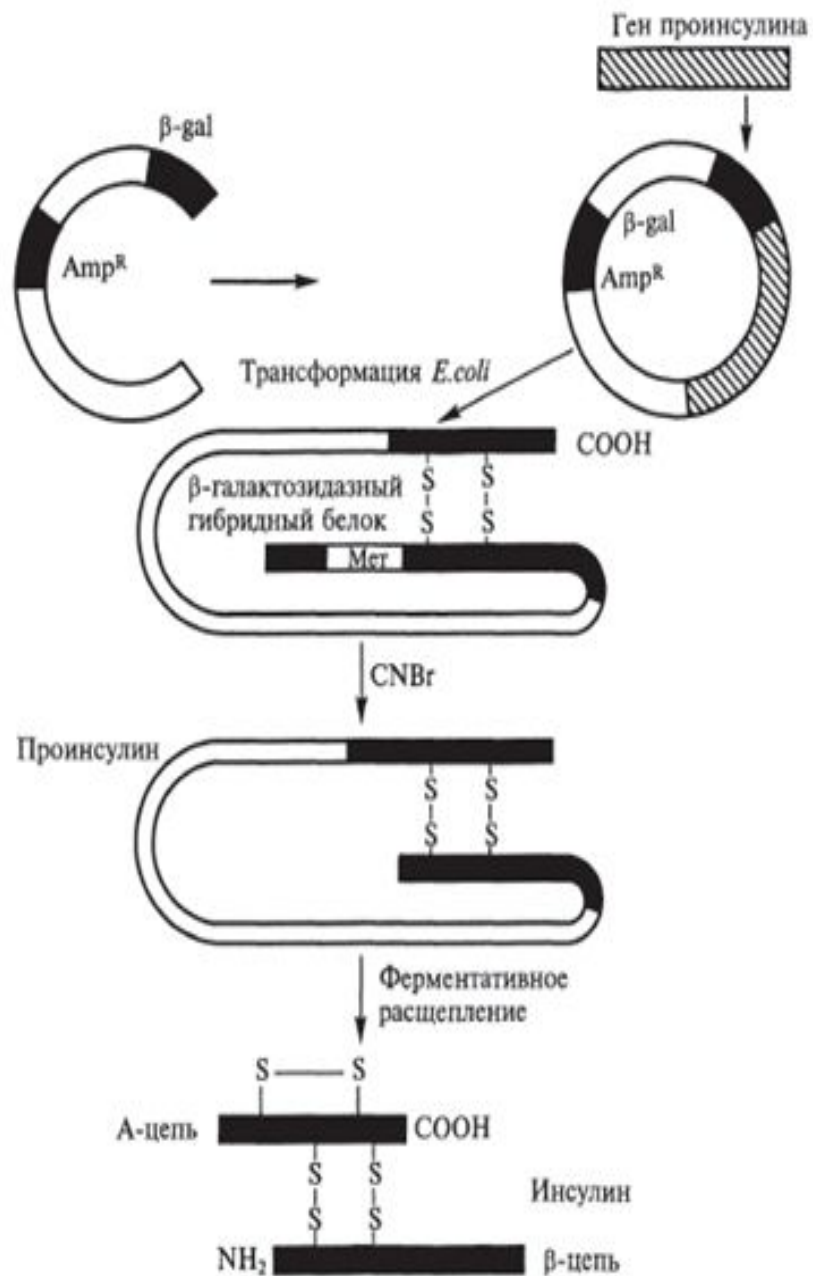
1. Путем химического синтеза создаются последовательности нуклеотидов, которые кодируют образование А и В цепей (создание синтетических генов).
2. Каждый из синтетических генов вводят в плазмиды (в одну плазмиду вводят ген, синтезирующий цепь А, в другую плазмиду вводят ген, синтезирующий цепь В).
3. Вводят ген, кодирующий образование фермента бетагалактозидазы. Этот ген включают в каждую плазмиду для того, чтобы добиться активной репликации плазмид.
4. Плазмиды вводят в клетку *E. coli*- кишечной палочки и получают две культуры продуцента, одна культура синтезирует А-цепь, вторая В-цепь.
5. Помещают две культуры в ферментер. В среду добавляют галактозу, которая индуцирует образование фермента бетагалактозидазы. При этом плазмиды активно реплицируются, образуя много копий плазмид и, следовательно, много генов, синтезирующих Аи В цепи.

6. Клетки лизируют, выделяют А и В цепи, которые связаны с бетагалактозидазой. Все это обрабатывают бромцианом и отщепляют А и В-цепи от бетагалактозидазы. Затем производят дальнейшую очистку и выделение А и В цепей.

7. Окисляют остатки цистеина, связывают и получают инсулин.

Недостатки подобного метода: надо получать два отдельных штамма-продуцента, проводить две ферментации, две процедуры выделения и очистки, а самое главное, трудно обеспечить правильное замыкание дисульфидных связей, то есть получить активный инсулин.





В 1975 г. У.Гилберт предложил следующую схему синтеза инсулина:

Из опухолевых клеток поджелудочной железы выделяется мРНК инсулина.

С помощью обратной транскриптазы мРНК получают кДНК.

Полученную кДНК встраивают в плазмиду рBR322 E. Coli в среднюю часть гена пенициллинадазы.

Рекомбинантная плазида содержит информацию о структуре проинсулина.

В результате трансляции мРНК в клетках синтезируется гибридный белок, содержащий последовательности пенициллинадазы и проинсулина.

Проинсулин выщепляли из данного белка трипсином.

Из проинсулина выделяется инсулин.

Уолтер Гилберт

Walter Gilbert



Способ синтеза инсулина человеческого с помощью *E. coli* позволяет получить инсулин более высокого качества и степени очистки с чистотой не ниже 96% и активностью не ниже 26 Е/мг.



- Следующий этап – включение гена предшественника инсулина (или генов цепей порознь) в геном *E.coli* – особого штамма кишечной палочки, выращенного в лабораторных условиях. Эту задачу выполняет генная инженерия.
- Из *E.coli* вычленяют плазмиду соответствующей рестриктазой. синтетический ген встраивается в плазмиду (клонированием с функционально активной С-концевой частью β -галактозидазы *E.coli*). В результате *E.coli* приобретает способность синтезировать белковую цепь, состоящую из галактозидазы и инсулина. Синтезированные полипептиды отщепляют от фермента химическим путем, затем проводят и очистку. В бактериях синтезируется около 100000 молекул инсулина на бактериальную клетку.



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук



Институт биоорганической химии РАН (бывшее здание Института гор

С.Илюхина Наталья / Фотобанк Лори



- В институте биоорганической химии РАН получен рекомбинантный инсулин (инсуран) с использованием генно-инженерных штаммов *E.coli*. Из выращенной биомассы выделяется предшественник, гибридный белок, экспрессируемый в количестве 40% от всего клеточного белка, содержащий препроинсулин. Превращение его в инсулин *in vitro* осуществляется в той же последовательности, что и *in vivo* – отщепляется лидирующий полипептид, препроинсулин превращается в инсулин через стадии окислительного сульфитолиза с последующим восстановительным замыканием трех дисульфидных связей и ферментативным вычленением связывающего С-пептида. После ряда хроматографических очисток, включающих ионообменные, гелевые и ВЭЖХ, получают человеческий инсулин высокой чистоты и природной активности.

Получение рекомбинантного инсулина

Культивирование штамма продуцента *E.coli* JM109/pPINS07 осуществляют в промышленном ферментере объемом 200-1500 л.

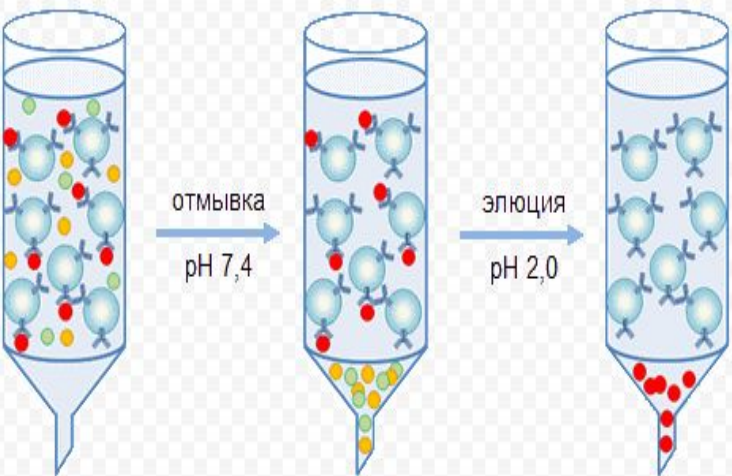
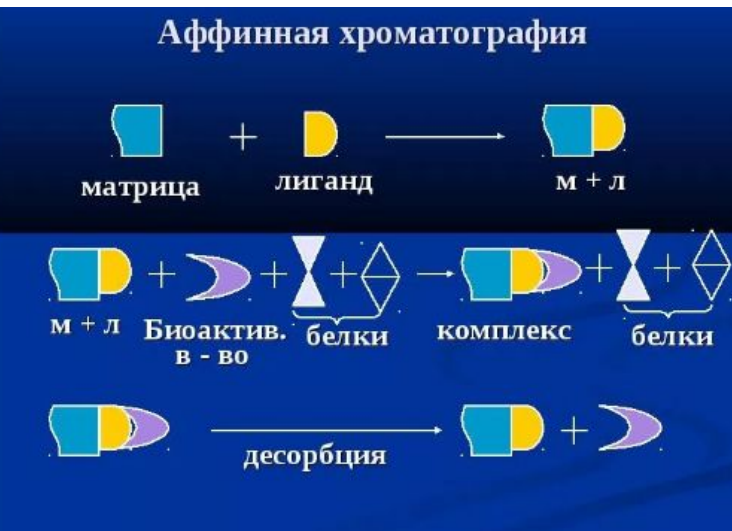
Концентрацию растворенного кислорода поддерживают на уровне $40 \pm 15\%$. После разрушения клеток дезинтеграцией тельца включения растворяют в буфере, содержащем 8 М мочевины, затем добавляют дитиотреитол. Ренатурацию гибридного белка инсулина проводят в одну стадию путем инкубации в 5-10-кратном объеме буфера до стадии очистки путем кислотного осаждения.

Гибридный белок хроматографируют на КМ-сефарозе. Ферментативное расщепление осуществляют последовательно при соотношении трипсин : гибридный белок и карбоксипептидаза Б : гибридный белок - 1:(500-1000).

Между стадиями расщепления гибридного белка трипсином и карбоксипептидазой Б проводят хроматографию на СП-сефарозе. Инсулин очищают методом препаративной обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с последующей гель-фильтрацией и выделением в присутствии солей цинка. Изобретение позволяет упростить получение высокоочищенного рекомбинантного инсулина человека и повысить его выход в промышленном масштабе.



Известен способ получения рекомбинантного инсулина человека, предложенный J.Nilsson с соавторами



Способ заключается в культивировании штамма-производителя *E. coli*, продуцирующего проинсулин, содержащий два синтетических IgG связывающих домена стафилококкового белка А.

Выход проинсулина составлял 3 г/л питательной среды. Схема выделения заключалась в разрушении бактериальных клеток, получении телец включения, содержащих проинсулин, растворении телец включения, окислительного сульфитолиза проинсулина, его ренатурации, очистке ренатурированного белка аффинной хроматографией на IgG-Sepharose, расщеплении проинсулина протеолитическими ферментами (трипсином и карбоксипептидазой В) и заключительной очистке инсулина высокоэффективной обращенно-фазовой жидкостной хроматографией.

Недостатками данного способа являются:

использование богатой питательной среды для выращивания микроорганизма, длительное (около 34 ч) время выращивания, высокая себестоимость целевого продукта, обусловленная использованием для очистки аффинного сорбента, дорогого в производстве и недолговечного при промышленном использовании. Недостатком можно также считать использование в технологии получения инсулина детергента Tween 20. Известно, что использование детергентов при выделении белков приводит к их сорбции на белок и присутствию детергента в конечном продукте.

«+»:

- Идентичен по составу человеческому инсулину → нет аллергических реакций.
- Более экономичен по сравнению с животным инсулином (1 кг инсулина можно получить в 25 кубовом ферментере, используя кишечную палочку, или необходимо 35 тыс. голов с/х животных).

«-»:

- Тщательный контроль выделения и очистки, т.к. примесь микробных липо- и глико-протеинов, обладают пирогенными свойствами.



Примеры препаратов инсулина, полученные путем генной инженерии:

- Хумулин Р
- Хумулин-цинк
- Хумулин-Н
- Инсуран Р
- Инсуран НПХ
- Инсуман Комб
- Генсулин М
- и др.



