Получение белка в биотехнологическом производстве

Основные продуценты белка используемые в фарм. биотехнологическом производстве:

1. Дрожжи.
2. Бактерии.
3. Водоросли
4. Грибы.

Использование различных микроорганизмов в качестве источников белка и витаминов обусловлено **факторами:**

- а) возможностью использования для культивирования микроорганизмов разнообразных химических соединений, в том числе отходов производств;
- б) относительно несложной технологией производства микроорганизмов, которое может осуществляться круглогодично; возможностью его автоматизации;
- в) высоким содержанием белка (до 60-70%) и витаминов, а также углеводов, липидов в микробиальных препаратах;
- г) повышенным содержанием незаменимых аминокислот по сравнению с растительными белками;
- д) возможностью направленного генетического влияния на химический состав микроорганизмов в целях совершенствования белковой и витаминной

Производство белка микроорганизмами можно разделить на три типа:

1. **Основанное на использовании живой или инактивированной биомассы микроорганизмов**.

К ним относится производство пекарских, винных и кормовых дрожжей, вакцин, белково-витаминных концентратов (БВК), средств защиты растений, заквасок для получения кисломолочных продуктов и силосования кормов, почвоудобрительных препаратов и др.;

2. **Производящее продукты микробного биосинтеза**, к числу которых относятся антибиотики, гормоны, ферменты, аминокислоты, витамины;

3. **Основанное на получении продуктов брожения, гниения**, (например, утилизация целлюлозы и различных отходов с целью получения углеводов, биогаза, биоэтанола). К ним же относятся получение спиртов, органических кислот, растворителей, а также биотехнология утилизации неприродных соединений.

- Для **получения белка** одноклеточных микроорганизмов используют ***различные субстраты***: парафины нефти, метан, водород, метанол, этанол, уксусную кислоту, углекислый газ, молочную сыворотку, мелассу, крахмал и целлюлозосодержащие отходы промышленности и сельского хозяйства.
- Для промышленного использования перспективными являются термофильные микроорганизмы, растущие при высоких (до +50 °С) температурах.
- Благодаря некоторым бактериям микробиологическим способом производится ряд незаменимых аминокислот (глютаминовая кислота, лизин и др.), основная часть которых идет в пищевую промышленность и в животноводство.
- На основе аминокислот готовят искусственные подсластители. Например, подсластитель метиловый

Биотехнология производства интерферона

В *1957г. Айзекс и Линдеман* обнаружили, что клетки животных, инфицированных вирусами, выделяют в сферу фактор, который способен вызывать у гентактных (не обработанных вирусом) клеток устойчивость у вирусной инфекции.

Этот фактор был назван *интерфероном*.

Интерферон относится к протеинам или гликопротеинам, в состав которых включено 146-166 аминокислотных остатков. Молекулярная масса – 20-80 кДальтон.

Эффекты интерферона

- 1. Обладает ***антивирусным действием*** - интерферон не действует на внеклеточный вирус, а стимулирует образование интерлейкина-2, увеличивает синтез ферментов (эндонуклеазы - способны «разрезать» молекулы нуклеиновых кислот вирусов на уровне трансляции; и протеиназы).
- 2. Вызывает ***ингибирование клеточного роста*** (используется как *противоопухолевое средство*) – способен подавлять деление онкогенных клеток при сохранении функции активации всех звеньев иммунной системы.
- 3. Оказывает ***стимулирующее влияние на фагоцитоз***, естественные клетки – ***киллеры и макрофаги***; ***повышает неспецифическую резастентность клеток***.

4. Интерферон обладает ***антимикробной активностью***

5. Оказывает ***радиозащитное действие.***

6. Интерферон является ***иммуномодулятором*** – т. е. регулирует иммунологические реакции, стимулирует иммунную систему организма.

Вырабатывается интерферон клетками позвоночных.

Наиболее активными продуцентами интерферона являются ***лимфоциты*** и ***макрофаги***.

Наиболее активными *индукторами среди вирусов* являются **вирус Ньюкаслской болезни**, **вирус Сендай**, **чумы свиней**.

Классы интерферона

1. ***Лейкоцитарный*** или ***α-IFN*** - получают в культуре лейкоцитов выделенных из крови доноров.

Различают *20 рекомбинантных вариантов*, отличающихся последовательностью аминокислот в полепептидной цепи и биологической активностью.

2. ***Фибробластный*** или ***β-IFN*** - для получения используют культуру фибрабластов.

3. ***Иммунный*** или ***γ-IFN*** - его синтезируют сенсебилизированные *Т-лимфоциты* при повторном контакте с мутогенами, а также с бактериальными и вирусными антигенами.

- Все три класса интерферонов обладают различными физико-химическими свойствами и отличаются друг от друга серологически.

Виды интерферонизации

1. ***Экзогенная*** – введение готового интерферона в организм, использование мазей, содержащих интерферон.

2. ***Эндогенная*** – введение в организм индукторов интерферон, которые стимулируют процесс образования интерферона.

Наиболее активными *индукторами* интерферона являются *синтетические и природные двунитевые РНК*.

Механизм действия индукторов IFN

1. Стимулируют фагоцитоз и биосинтез антител.
2. Тормозят рост и метастазирование опухолей.
3. Проявляют антиклеточную активность.
4. Оказывают радиозащитное действие.
5. Увеличивают чувствительность клеток к действию интерферона.
6. Принимают участие в регуляции биосинтеза белка в клетке.

Биотехнология производства IFN (этапы)

- 1. Выделение иРНК, несущую информацию о структуре молекулы интерферона (РНК выделяют после индукции синтеза интерферона);
- 2. Получение кДНК на матрице иРНК;
- 3. Встраивание кДНК в векторную плазмиду с участием ферментов рестриктаз и лигаз и получение рекомбинантной ДНК (рДНК), содержащей ДНК вектора с генетическими маркерами и ДНК, кодирующую синтез целевого продукта;
- 4. Трансформация рДНК в рецепиентную (пермиссивную) микробную клетку;

- 5.Получение клонов рекомбинантных продуцентов, способных синтезировать интерферон (на плотной питательной среде);
- 6.Размножение клоновой культуры – продуцента в жидкой питательной среде;
- 7.Отделение клеток из культуральной жидкости центрифугированием;
- 8.Выделение целевых белков из нативного раствора или лизата биомассы продуцента, например, осаждением сульфатом аммония;

9. Очистка интерферона после растворения осадка с помощью аффинной хроматографии при использовании сорбента, связанного с моноклональными антителами к интерферону.

При пропускании раствора, содержащего целевой продукт и балластные вещества через колонку с иммуносорбентом происходит высокоспецифическое связывание антигена (интерферона) с моноклональными антителами к нему, все прочие вещества не задерживаются. Затем *интерферон элюируют слабой кислотой*, происходит диссоциация комплекса «антиген-антитело».

Для получения 60 мкг лейкоцитарного интерферона нужно 100 л крови или 1 л культуральной жидкости микроорганизма-рекомбинанта

Другие способы получения интерферона:

1. На основе ***сконструированных рекомбинантных ДНК***, экспрессируемых в клетках *E. coli* (α, β, α-IFN).
2. Возможен ***синтез химическим путем*** β и α-интерферона.
3. Повышение биосинтеза IFN возможно при ***введении в эукариотическую дрожжевую клетку вектора, на основе которого сконструирована рекомбинантная молекула ДНК с ионами*** β и α- интерферонов
4. Производство IFN ***с применением моноклональных антител*** к соответствующему IFN.

По характеру действия и клинической значимости препараты разделены на 4 основные группы:

- ***<u>этиотропные</u>***, действующие на возбудителя заболевания;
- ***<u>иммуномодулирующие</u>***, корригирующие нарушение системы иммунитета, возникающие и развивающиеся в процессе болезни;
- ***<u>патогенетические</u>***, направленные на борьбу с интоксикацией, обезвоживанием, сосудистыми поражениями, органными нарушениями, аллергическими реакциями, а также на профилактику бактериальных осложнений;
- ***<u>симптоматические</u>***, купирующие сопутствующие симптомы заболевания (головная боль, бессонница,

Антивирусные средства делят на 4 группы:

- ***химиопрепараты***;
- ***интерфероны***;
- ***индукторы ИНФ***;
- ***иммуномодуляторы***.

Химиопрепараты – главным образом средства этиотропной терапии.

ИНФ и их *индукторы* обладают комбинированным эффектом (этиотропным и иммуномодулирующим),

Иммуномодуляторы используются для иммунотерапии и иммунокоррекции

Применение интерферона имеет ряд преимуществ:

1. *Широкий спектр действия*, что очень важно при терапии вирусных пневмоэнтеритов.
2. Действие интерферона обуславливается *активацией естественных механизмов защиты* организма на ранних стадиях инфекционного процесса.
3. *Эффект проявляется сразу же после введения препарата*.

Применение интерферона имеет *ряд недостатков*:

- Короткий период сохранения в организме (до 12ч.).
- Препарат применяется в основном только парэнтерально.
- Через 2-3 дня после применения интерферона наблюдается угнетение защитных функций иммунной системы, что может привести к быстрому размножению в организме условно-патогенной микрофлоры.
- Возможны аллергические реакции при длительном применении.

Интерлейкины.

Интерлейкины (ИЛ) **–** вещества белковой или гликопротеидной природы, синтезируемые преимущественно иммунокомпетентными клетками.

В настоящее время выделено и охарактеризовано 15 интерлейкинов.

К интерлейкинам, играющим существенную роль в кооперативных взаимодействиях иммуно-компетентных клеток при развитии иммунного ответа, являются ИЛ 1, ИЛ 2, ИЛ 4, ИЛ 5, ИЛ 6.

- ***ИЛ 1*** – цитокин, выделяемый макрофагами, стимулирующий функции Т и В-лимфоцитов. С участием ИЛ 1 активируются *Т-хелперы*, синтезирующие **ИЛ 2**, а также *β-лимфоциты*, трансформирующиеся в плазматические клетки антителопродуценты. Он является посредником в обеспечении взаимодействия различных защитных противоинфекционных механизмов *на уровне организма*.
- **ИЛ 3** - цитокин, синтезируемый Т-лимфоцитами, стимулирует *β-лимфоциты* при гуморальном иммунном ответе и *созревание Т-эффекторов* в реакциях клеточного иммунного ответа. ИЛ 3 является **ключевым фактором** развития иммунного ответа

- ***ИЛ 4*** – фактор *стимуляции В-клеток* и части *Т-лимфоцитов*. Регулирует ***аллергические реакции*** организма. С помощью ИЛ 4 Т-хелперы влияют на продукцию ***IgE*** в процессе развития иммунного ответа. Основными продуцентами ИЛ 4 являются нормальные Т-лимфоциты и Т-клеточные гибридомы.
- ***ИЛ 5*** – мультифункциональный цитокин, активирующий Т- и В-лимфоциты и эозинофилы; является *продуктом активированных Т-лимфоцитов*.
- ***ИЛ 6*** – один из *ранних цитокинов*, продуцируемый многими типами клеток (*В-стимулирующий фактор, фактор роста гибридом/плазмоцитом, Т-лимфоцитактивирующий фактор*), участвует в *регуляции функций лимфоцитов*, обладает

Биотехнологическое получение интерлейкинов

В качестве ***продуцентов интерлейкинов*** **используют**:

- культуры нормальных лимфоцитов или макрофагов;

- клоны трансформированных (опухолевых) клеток;

- Т-клеточные гибридомы (продукты гибридизации опухолевых лимфоцитов, способных к нормальному росту и Т-клеток, синтезирующих определенный ИЛ;

Биотехнологическое получение интерлейкинов

- Продуценты культивируют in vitro в сосудах определенного объема, затем ИЛ выделяют из культуральной среды, концентрируют, очищают.

- Для увеличения продукции ИЛ культуры клеток стимулируют **митогенами** (веществами, вызывающими митотическое деление клеток).

В качестве митогенов используют глобулярные *растительные белки* (***фитогемаглютинин*** и др.), а также *компонент клеточной стенки бактерий* – ***мурамилдипептид***.

Биотехнологическое получение интерлейкинов

- Для создания рекомбинантных микроорганизмов – продуцентов ИЛ:

  -гены, контролирующие их синтез, вводят в составе вектора в микробную клетку,

  -выделяют и размножают клон рекомбинантов,

  - культивируют полученный продуцент с целью накопления ИЛ.

- В качестве *рекомбинантных организмов* используют клетки *E.coli* (ИЛ 1, ИЛ 2), *дрожжи-сахаромицеты* (ИЛ 2), причем дрожжи более удобны, т.к. клетки *E.coli* накапливают ИЛ внутриклеточно, а дрожжи выделяют в окружающую среду, следовательно, полученный

Гормон роста

Гормон роста:

- обладает *анаболическим* действием,
- *повышает* в клетках *уровень биосинтетических процессов*,
- *усиливает биосинтез* белков, ДНК, РНК и гликогена,
- *способствует мобилизации жиров* из жировых депо и *ускоряет распад* высших жирных кислот и глюкозы,
- *повышает содержание* в крови особых стимулирующих рост факторов – *соматомединов*.

Биотехнологическое получение гормона роста

- При синтезе ДНК на мРНК гормона с последующим превращением ее в двухнитиевую форму получается ген, кодирующий *предшественник соматотропина*, который расщепляется в бактериальных клетках с образованием активного гормона.

Этапы получения гормона роста

- *На первом* этапе клонировали двухнитиевую ДНК-копию мРНК и расщеплением рестрикционными эндонуклеазами получили последовательность, которая кодирует всю аминокислотную последовательность гормона, *за исключением первых 23 аминокислот*.

Биотехнологическое получение гормона роста

- *На втором этапе клонировали синтетический полинуклеотид*, соответствующий аминокислотам от 1-й до 23-й.
- *На третьем этапе два полученных фрагмента объединили вместе*, и «подстроили» к паре промоторов и участку связывания рибосом.

Конечный выход гормона составил *2,4 мкг на 1 мл культуры или 1 % от растворенных белковых клеток этого генетически сконструированного штамма E.coli.*

Инсулин

- Нарушение секреции инсулина вследствие **деструкции** *β-клеток* - **абсолютная недостаточность инсулина** - является ключевым звеном патогенеза **сахарного диабета 1-го типа**.

- Нарушение действия инсулина на ткани - **относительная инсулиновая недостаточность** - имеет важное место в развитии **сахарного диабета 2-го типа**.

Число больных диабетом во всем мире составляет **130 млн. (2,5% населения)**.

Каждые 10-15 лет количество больных **удваивается**.

По оценке Международного института диабета (Австралия), **к 2020 году в мире будет 320 млн. больных**. В действительности число больных в 2-3 раза больше за счет скрытых, недиагностированных

Инсулин человека можно производить четырьмя способами:

1) *полным химическим синтезом*;

2) *экстракцией из поджелудочных желез человека* (оба способа не подходят из-за неэкономичности: недостаточной разработанности первого способа и недостатка сырья для массового производства вторым способом);

3) *полусинтетическим методом* с помощью ферментно-химической замены в положении 30 В-цепи аминокислоты аланина в свином инсулине на треонин;

4) *биосинтетическим способом по генноинженерной технологии*.

Два последних метода позволяют получить человеческий инсулин высокой степени очистки

История открытия инсулина

- вторая половина **19 века** русский врач И.М. Соболев доказал, 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 1 типа.

- **1923 г.** американская фирма «Eli Lilly» выпустила **первый препарат животного инсулина.**

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

- **в 1952 году** были получены первые **кристаллы инсулина**.

- **в 1954 году** английский биохимик Г.Сенджер **расшифровал структуру инсулина**.
- К концу **60-х годов** развитие методов очистки гормона от других гормональных веществ и продуктов деградации инсулина позволили **получить гомогенный инсулин**, называемый **однокомпонентным**.
- В начале **70-х г.г**. А.Юдаевым и С. Швачкиным был предложен **химический синтез инсулина**, однако осуществление данного синтеза в промышленном масштабе было дорогостоящим и нерентабельным.
- **В 80- годах** достижения молекулярной биологии позволили **синтезировать с помощью *E.coli* обе цепи человеческого инсулина**, которые были затем соединены в молекулу биологически активного гормона
- **в начале 90-х** г. в Институте биоорганической химии РАН получен **рекомбинантный инсулин** с использованием генно-инженерных штаммов *E.coli*.

I. Выделение инсулина из животного сырья

Получение инсулина состоит из ряда стадий:

1. Измельчение замороженных поджелудочных желез и экстракция кислым спиртовым раствором.

2. Осаждение балластных белков и освобождение от липидов.

3. Изоэлектрическое осаждение фракций инсулина (при pH=5,5) и осаждение спиртом, ацетоном, эфиром.

4. Очистка инсулина: осаждение солями, фракционирование методами хроматографии, гель-фильтрации.

5. Осаждение инсулина в виде кристаллов.

- 1. замороженные поджелудочные железы **измельчают в мясорубке-волчанке;**
- 2. **экстрагируют** способом **бисмацерации** 1,5-4 часа при постоянном перемешивании (первый раз ***80-85 % этанолом*** в реакторе с мешалкой, второй раз экстрагируют **57% этанолом**, который подкислен ортофосфорной кислотой (хлороводородной или серной) до значения pH 2,8-3).

Подкисленный спирт способствует инактивации фермента трипсина, находящегося в поджелудочной железе, благодаря чему удается сохранить инсулин в неизменном состоянии.

На Минском заводе эндокринных препаратов используют *роторно-пульсационный аппарат* для экстракции, что дает интенсивность экстрагирования и сокращает время до 1,5ч

- 3. Полученные вытяжки объединяют, **отставляют на холоде на 48 ч для освобождения от нежелательных белков**, которые выпадают в осадок.
- **4. Осадок отделяют** центрифугированием и удаляют.
- 5. Для выделения и очистки инсулина применяют **ионообменную хроматографию**. Осуществляют сорбцию инсулина из прозрачной жидкости на макропористом ***сульфокатионите КУ-33-30/100*** при значении **pH 3,0-3,3** в режиме псевдоожижения.
- *6. Жир* **удаляют** путем промывки катионита 65-67% этанолом, а *балластные белки* 0,3М раствором ацетатного буфера.

7. **Десорбцию инсулина** осуществляют с помощью 0,01-0,05 раствора *аммонийного буфера* (pH 10) и немедленно *подкисляют хлороводородной кислотой* до pH 4,5 и *добавляют ацетон*.

8. Выпавший осадок балластных веществ удаляют.

9. **Инсулин осаждают** раств. *цинка-ацитата* (pH 6,2).

10. Полученный **цинк-инсулин очищают** **методом кристаллизации**, после чего *растворяют в воде*, подкисленной до pH 2,8 *лимонной кислотой*. Раствор отстаивают 1ч.

11. Выпавшие балластные вещества удаляют фильтрацией через кизельгур.

12. Фильтрат смешивают с ацетоном, добавляют

13. Для **медленной кристаллизации инсулина** создают условия с последовательным изменением pH раствора:

- раствор *подщелачивают до pH 8,5*; оставляют на 2-3 мин;
- *изменяют pH до 6,8* и перемешивают 1 ч;
- при значении pH 6,5 перемешивают 2 ч;
- при pH 6,2 и 6,0 перемешивают 2 ч и отстаивают 20ч;
- при значении pH 5,8 перемешивают 2ч;
- отстаивают 96 ч при температуре 5 °С.

14. Выпавшие кристаллы инсулина отделяют **центрифугированием**, **промывают** на воронке Бюхнера последовательно холодной водой, ацетоном, эфиром.

15. Досушивание проводят на воздухе, в вытяжном шкафу и эксикаторе.

II.Создание промышленного производства генно-инженерного инсулина.

Технология разработана совместно с немецкой фирмой *Genbiotech GmbH* (Гейдельберг) в 1987—1989 гг.

Процесс был основан на продуцировании генноинженерным штаммом E. coli рекомбинантного белка (молекулярная масса около 17000 Да), содержащего лидерную аминокислотную последовательность, соединенную через аминокислотный остаток метионина с проинсулином человека.

Технологическая схема включала в себя стадии:

Схема 1:

1. *Ферментация* (выращивание штамма-продуцента в ферментере).

2. *Отделение биомассы*.

3. *Разрушение клеток* с выделением телец включения.

4. *Очистка рекомбинантного белка* (2 садии)

- ионообменной хроматографией на DEAE-сефарозе FF

- гель-фильтрацией на сефадексе G-25M.

5. *Расщепление рекомбинантного белка* **бромцианом**.

6. *Окислительный* ***сульфитолиз*** *проинсулина*.

7. *Хроматографическая* ***очистка гексасульфоната проинсулина (3 стадии)***:

- *гель-фильтрацией* на Сефадексе G-50 F,
- *ионообменной хроматографией* на DEAE-сефарозе FF
- *гель-фильтрацией* на сефадексе G-25M).

8. ***Ренатурация проинсулина***.

9. Хроматографическая ***очистка нативного проинсулина*** ионообменной хроматографией на DEAE-сефарозе FF.

10. ***Ферментативное расщепление проинсулина***.

11. Хроматографическая **очистка инсулина:**

- ионообменная хроматография на S-сефарозе FF,
- ультрафильтрация,
- гель-фильтрация на сефадексе G-50 SG.

12. ***Лиофильная сушка*** Na-соли инсулина человека.

Технологическая схема включала в себя стадии:

Схема 2 (с 2012 г.):

1. Получение посевного материала штамма-продуцента

1.1. Оживление консервированной культуры.

1.2. Выращивание маточной культуры.

1.3. Выращивание инокулята.

2. Биосинтез гибридного белка

2.1. Выращивание продуцента в ферментере (ферментация).

2.2. Получение биомассы (сепарирование).

2.3. Дезинтеграция клеточной суспензии.

2.4. Выделение и отмывка телец включения (центрифугирование).

Технологическая схема включала в себя стадии:

Схема 2 (с 2012 г.):

3. Выделение и очистка рекомбинантного белка

3.1. Солюбилизация телец включения и восстановление рекомбинантного белка.

3.2. Ренатурация рекомбинантного белка.

3.3. Хроматографическая очистка рекомбинантного белка.

4. Ферментативное расщепление рекомбинантного белка

5. Хроматографическая очистка инсулина 1

6. Хроматографическая очистка инсулина 2

7. Хроматографическая очистка инсулина 3

8. Получение кристаллического инсулина

В **основе процесса** биосинтеза — использование штамма-продуцента ***E. coli JM 109*** с рекомбинантной плазмидой ***pPINS 07***.

Рекомбинантная плазмидная ДНК содержит искусственный ген, кодирующий гибридный полипептид, состоящийиз:

- одного *IgG-связывающего домена белка А* из ***Staphylococcus aureus***,
- пептидного линкера ***His6GlySerArg,***
- и проинсулина человека.

Плазмида (5051 п. о.) содержит в качестве маркера **ген β- лактамазы** (*устойчивости к ампициллину*).

Экспрессия рекомбинантного белка индуцируется **изопропил- β-D-тиогалактозидом** и достигает 30% от суммарного клеточного белка.

1. Клетки продуцента рекомбинантного препроинсулина человека *отделяют сепарированием*, *дезинтегрируют* при высоком давлении для сбора телец включения, *многократно отмывают* полученные тельца включения от водорастворимых белков и иных клеточных компонентов.

За 1 цикл получают ***15—25 кг*** *влажных телец включения, содержащих более 13% рекомбинантного белка.*

2. Полученные тельца включения *солюбилизируют* в буферном растворе, содержащем мочевину и дитиотреитол (ДТТ) для восстановления внутри- и межмолекулярных ди-сульфидных связей в рекомбинантном белке.

3. Восстановленный рекомбинантный белок *подвергают воздействию кислорода воздуха при сильном разбавлении*, при этом белок окисляется с образованием дисульфидных связей, соответствующих нативной конформации инсулина (***рефолдинг***). Происходит **ренатурация рекомбинантного белка**.

4. Ренатурированный рекомбинантный **белок очищают** ионообменной хроматографией.

5. Белок подвергают **ферментативному расщеплению трипсином и карбокси-пептидазой Б** в массовом соотношении 4000 : 2 : 1.

6. После осаждения и предварительной обработки **получают инсулин-сырец** 86—88%-ной чистоты.

7. Очистка.

- На первой **стадии очистки** гидрофобной хроматографией содержание инсулина достигает 96%,

- на второй стадии очистки ионообменной хроматографией проводится окончательное освобождение от иммуногенных фракций,

- финишная гель-фильтрация *проходит в стерильных условиях* и позволяет довести качество препарата до фармакопейного.

7. В завершении процесса получают кристаллический цинк-инсулин, который высушивают до необходимой степени влажности.

Выход продукта составляет не менее 100 г с 1000 л культуральной жидкости штамма-продуцента.

Преимущества процесса:

- одностадийная очистка ренатурированного рекомбинантного белка;
- совместное ферментативное расщепление рекомбинантного белка трипсином и карбоксипептидазой Б;
- эффективное использование хроматографии низкого давления для очистки инсулина.

Требования к качеству субстанции инсулина человека изложены в соответствующих разделах Американской Фармакопеи (Ф. США) и Европейской Фармакопеи (ЕФ).

Инсулин должен быть охарактеризован качественно.

Первый показатель определяется **методом ВЭЖХ** в сравнении со стандартом, сравнением хроматографических профилей инсулина и инсулина-стандарта, расщепленных специфическим ферментом на 4 фрагмента **(«метод пептидных карт»)** и **определением биоидентичности** (in vivo, на кроликах, по сравнительному содержанию глюкозы в крови).

Количественное определение проводится также **методом обращенно-фазовой ВЭЖХ**.

Количество гормона принято оценивать в международных единицах (МЕ), при этом ***1 МЕ (IU) = 0,0347 мг*** инсулина.