

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 (глутаминовая 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 резистентность 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 полипептидной цепи и биологической активностью.

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

3. **Иммунный** или **γ -IFN** - его синтезируют сенсебилизированные T-лимфоциты при повторном контакте с митогенами, 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:

- **этиотропные**, действующие на возбудителя заболевания;
- **иммуномодулирующие**, корригирующие нарушение системы иммунитета, возникающие и развивающиеся в процессе болезни;
- **патогенетические**, направленные на борьбу с интоксикацией, обезвоживанием, сосудистыми поражениями, органными нарушениями, аллергическими реакциями, а также на профилактику бактериальных осложнений;
- **симптоматические**, 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 иммунокомпетентных 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 противoinфекционных 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

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 деградациии 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*.

1. 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 $\text{pH}=5,5$) 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 инаktivации 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

- 3. Полученные вытяжки объединяют, **отстаивают 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 псевдооживления.
- **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 (рН 10) и немедленно подкисляют хлороводородной кислотой до рН 4,5 и добавляют ацетон.

8. Выпавший осадок балластных веществ удаляют.

9. **Инсулин осаждают** раств. цинка-ацетата (рН 6,2).

10. Полученный **цинк-инсулин очищают методом кристаллизации**, после чего растворяют в воде, подкисленной до рН 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 рН раствора:

- раствор подщелачивают до рН 8,5; оставляют на 2-3 мин;
- изменяют рН до 6,8 и перемешивают 1 ч;
- при значении рН 6,5 перемешивают 2 ч;
- при рН 6,2 и 6,0 перемешивают 2 ч и отстаивают 20ч;
- при значении рН 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 стадии)
 - 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, состоящий из:

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

Плазида (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, множественно 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 мочевины и дитиотреитол (ДТТ) для восстановления внутри- и межмолекулярных дисульфидных 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.

