

Выделение и очистка гормональных препаратов

Гормоны (от греч. hormao – приводить в движение, возбуждать) – биологически активные вещества разной химической природы, образующиеся специализированными клетками желез внутренней секреции, которые выделяются непосредственно в кровь, лимфу и регулируют обмен веществ.

Гормональные препараты чаще классифицируются по химической структуре:

1. Гормоны белковой природы: простые (инсулин, пролактин, гормон роста) и сложные (фолатропин, лютропин, тиротропин) белки.
2. Гормоны пептидной природы: глюкоген, кальцитонин, соматостатин, вазопрессин, окситоцин.
3. Гормоны липоидной природы (стероидные гормоны): котикостероиды, андрогены, эстрогены, простагландины.
4. Парагормоны, тканевые гормоны: гастрин, секретин, гепарин.

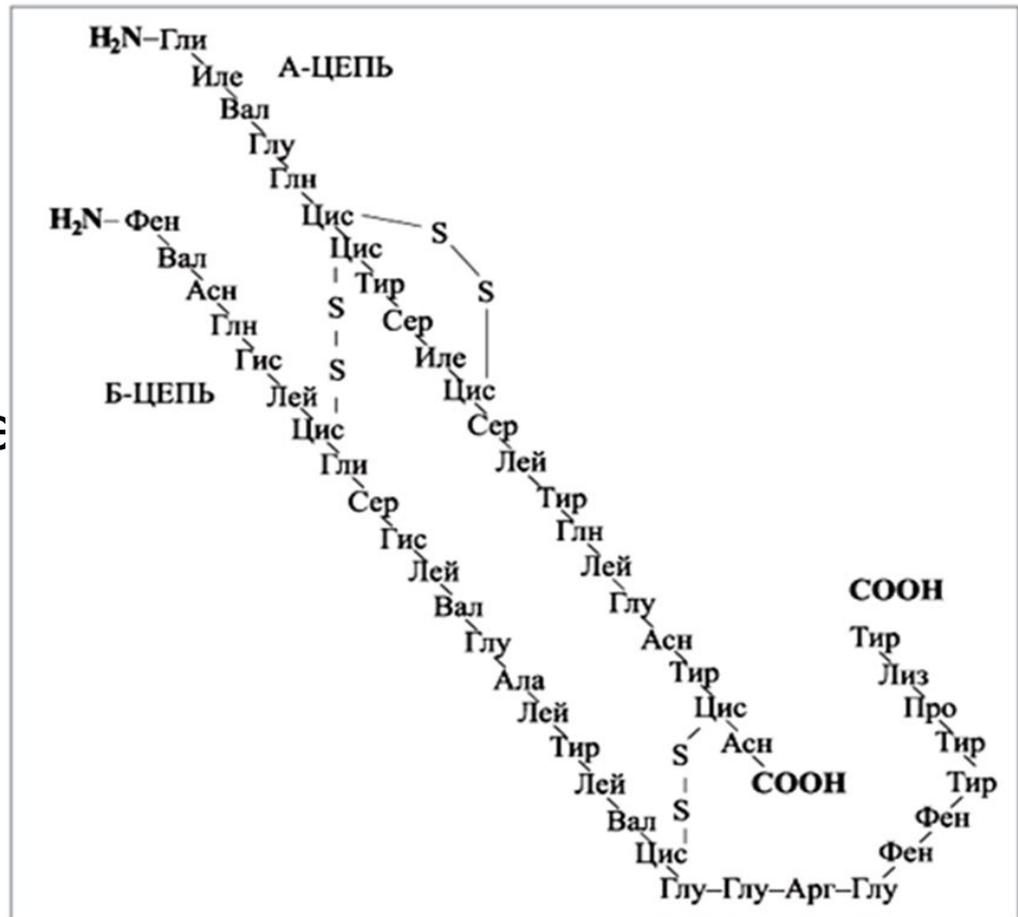
Получают гормоны эндокринных желез:

- *путем химического синтеза;*
- *методами генной инженерии;*
- *выделением из сырья животного происхождения;*
- *с помощью методики биотрансформации.*

Получение инсулина

Инсулин – гормон поджелудочной железы, вырабатываемый β -клетками островков Лангерганса, играет важную роль в углеводном обмене.

Молекула инсулина, как установил Сенгер, состоит из двух полипептидных цепей – А и В, соединенных двумя дисульфидными связями. А цепь состоит из 21, а В-цепь – из 30 аминокислотных остатков.



- Впервые инсулин удалось выделить из поджелудочных желез телят и сделать инъекцию человеку канадскому учёному Фредерику Батингу в 1921 году. Начиная с этого времени и до 80-х годов, было налажено производство инсулина из поджелудочных желез крупного рогатого скота и свиней.
- Инсулин в кристаллическом виде впервые сумел получить в 1926 г. Дж.Абель. Именно благодаря его работам удалось наладить промышленное производство препарата. Абель также определил, что вещество представляет собой белковую молекулу.
- В 1981 году впервые был создан человеческий инсулин способом генной инженерии, путём встраивания человеческого гена, отвечающего за выработку инсулина в ДНК дрожжевой бактерии.
- В 1982 году человеческий инсулин был создан методом замены аминокислоты аланин на

Степени очистки:

- **традиционные** — экстракция этанолом, а в процессе очистки фильтрация, высаливание и многократная кристаллизация (метод не позволяет очистить препарат от примесей других гормонов, содержащихся в поджелудочной железе)
- **монопиковые (MP)** — после традиционной очистки фильтрация на геле (при проведении гельхроматографии образуют всего один «пик»: содержание вышеперечисленных примесей не более $1 \cdot 10^{-3}$)
- **монокомпонентные (MC)** — ещё более глубокая очистка с помощью молекулярного сита и метода ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе, что позволяет добиться 99 % степени их чистоты ($1 \cdot 10^{-6}$)

Инсулин человека можно производить 4 способами:

- 1) полным химическим синтезом;
- 2) экстракцией из поджелудочных желез человека;
- 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

- 1 и 2 способы не подходят для производства из-за неэкономичности, недостаточной разработанности первого способа и недостатка сырья для массового производства вторым способом;
- В настоящее время инсулин человека получают двумя способами: модификацией свиного инсулина синтетико-ферментативным методом(3) и генно-инженерным способом(4).

Данные методы позволяют получить человеческий инсулин высокой степени

Выделение инсулина из животного сырья

Стадии получения инсулина:

- 1) Измельчение замороженных поджелудочных желез.
- 2) Экстракция кислым спиртовым раствором.
- 3) Осаждение балластных белков.
- 4) Освобождение от липидов.
- 5) Десорбция инсулин.
- 6) Осаждение раствором цинка-ацетата (рН 6,2).
- 7) Очистка методом кристаллизации,
- 8) Очистка инсулина: осаждение, гель-фильтрации.
- 9) Перекристаллизация.
- 10) Сушка.

Модификация свиного инсулина синтетико-ферментативным методом

Замена остатка аланина, в цепи В на остаток треонина достигается путем ферментативного замещения с последующей хроматографической очисткой продукта, в результате чего получается однокомпонентный инсулин человека, с 99% содержанием чистого препарата.

Получение генно-инженерного инсулина

Схема технологического процесса:

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).
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

Конечные стадии получения генно-инженерного инсулина

2.2. Получение биомассы (сепарирование).

2.3. Дезинтеграция клеточной суспензии.

2.4. Выделение и отмывка телец включения (центрифугирование).

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

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 $1 \text{ МЕ (IU)} = 0,0347 \text{ мг инсулина}$.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ