

На правах рукописи

**Купцов
Василий Николаевич**

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА
ОТЕЧЕСТВЕННОГО ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОГО
ИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА**

03.00.23 – Биотехнология

Автореферат
диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2007 г.

Работа выполнена на Федеральном государственном унитарном предприятии «22 Центральный научно-исследовательский испытательный институт Минобороны России».

Научный руководитель: доктор медицинских наук,
профессор Степанов Алексей Вячеславович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
Машко Сергей Владимирович

доктор биологических наук,
Лахтин Владимир Михайлович

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение науки «Научно-исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства, Московская область,
г. Серпухов.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2007 г. в __ часов на заседании специализированного совета Д 208.046.01 в ФГУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212 Москва ул. Адмирала Макарова, 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУН «МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора.

Автореферат разослан «__» _____ 2007г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Комбарова С.Ю.

Список сокращений

ВЭЖХ	–	обращеннофазная высокоэффективная жидкостная хроматография;
ГБ	–	гибридный белок;
ГИИЧ	–	генно-инженерный инсулин человека;
ДАИ	–	диаргинининсулин;
ДТИ	–	В30- дезтреонининсулин;
МАИ	–	моноаргинининсулин;
СД	–	сахарный диабет;
ТФУ	–	трифторуксусная кислота;
HINS11	–	ренатурированный гибридный белок, полученный при культивировании штамма-продуцента <i>Escherichia coli</i> JM109 с рекомбинантной плазмидной ДНК pHINS11;
PINS07	–	ренатурированный гибридный белок, полученный при культивировании штамма-продуцента <i>Escherichia coli</i> JM109 с рекомбинантной плазмидной ДНК pPINS07.

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы.

Инсулин – гормон белковой природы, вырабатываемый β -клетками поджелудочной железы для поддержания гомеостаза глюкозы в крови. Недостаток инсулина в крови вследствие приобретенных или наследуемых факторов приводит к заболеванию сахарным диабетом (СД) (Овчинников Ю.А., 1987; Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В., 1993). Это системное заболевание, неизбежно ведет к ухудшению качества жизни, а без лечения – к смерти (Доклад комитета экспертов ВОЗ по сахарному диабету, 1987; Roman S.H., Harris M.I., 1997; Tuomilehto J., Sacciotollo J., Vassallo A. et all., 1988). Ежегодно умирает 5,5% больных СД, уровень смертности среди них в 2-4 раза выше, а продолжительность жизни на 7-10 лет меньше, чем среди лиц без нарушений углеводного обмена (Gu K., Cowie C.C., Harris M., 1998; Roman S.H., Harris M.I., 1997; Кудрякова С.В., Сунцов Ю.И. 2001). В Российской Федерации зарегистрировано около 2 млн. больных сахарным диабетом, из которых более 300 тыс. человек нуждаются в ежедневном приеме препаратов

инсулина. Однако истинная заболеваемость сахарным диабетом значительно выше и, вероятно, составляет 6-8 млн. человек (Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Креминская В.М., 1999). Специалисты прогнозируют удвоение количества больных СД каждые 12-15 лет (Дедов И.И., 1998; Amos A., McCarty D., Zimmet P., 1997). Отсутствие современного, конкурентоспособного отечественного производства инсулина ставит нашу страну в зависимость от зарубежных производителей. В результате производство препаратов на основе инсулина становится важной государственной задачей.

Впервые инсулин был выделен в чистом виде и применен для лечения в 1921 г.. С 1923 г. инсулин промышленно получали, выделяя его из поджелудочных желез крупного рогатого скота и свиней. Только в конце 50-х, начале 60-х годов XX века были выяснены отличия структуры человеческого инсулина от инсулинов животного происхождения, которые вызывали аллергические реакции (Sanger F., Tuppy H., 1951; Brown H., Sanger F., Kitai R., 1955). Результаты данных исследований легли в основу разработок промышленного получения инсулина человека. В настоящее время основными способами получения инсулина, идентичного человеческому, являются полусинтетический и генно-инженерный (Дедов И.И., 1998).

Наиболее прогрессивным методом является биотехнологический, при котором потребляются только энергоресурсы и используются высокопродуктивные генетически измененные микроорганизмы, вырабатывающие инсулин в виде неактивного предшественника (Коледова Е.А. 2001). Получение генно-инженерного инсулина является сложным многостадийным процессом, основанным на нескольких этапах трансформации и препаративной очистке промежуточных продуктов и инсулина (Баирамашвили Д.И., 2005). Поэтому основными направлениями по оптимизации технологии производства являются поиск легко вписываемых в существующую технологию, дающих заметный выигрыш по времени, уменьшающих себестоимость и легко масштабируемых решений на основе существующего оборудования.

Цель исследования

Усовершенствование технологии получения генно-инженерного инсулина человека с целью снижения себестоимости и увеличения выхода конечного продукта.

Задачи исследования:

1. разработать методы оценки пригодности ферментативных препаратов протеаз для нужд биотехнологического производства;
2. найти более экономически выгодные и доступные отечественные препараты трипсина, для применения в процессе производства инсулина;
3. разработать оптимальную технологию хроматографической очистки инсулина и его предшественников на SP-Sepharose FF с использованием буферных растворов с меньшим содержанием мочевины, при сохранении объемов расходуемых буферных систем;
4. разработать технологическую схему совместного гидролиза гибридного белка трипсином и карбоксипептидазой В в инсулин;
5. разработать технологию получения инсулина человека, основанную на использовании нового, более экономически выгодного штамма-продуцента.

Научная новизна:

1. изучено влияние температуры, рН и количества ферментов на результаты триптического и совместного гидролизом PINS07;
2. определено, что динамика накопления продуктов гидролиза при триптическом гидролизе ренатурированного гибридного белка, постоянна при условии, что гибридный белок состоит из лидерной последовательности, пептидного линкера GlySerHis₄₋₆GlySerArg и проинсулина человека;
3. показано, что при очистке инсулина и его производных на сорбентах с сильными катионообменными свойствами (например SP-Sepharose FF) можно использовать буферные системы на основе ацетата аммония с низким содержанием мочевины (до 2 М и менее) без увеличения временных затрат при получении полупродукта той же чистоты, как и при использовании буферных систем с высоким содержанием (6 М и более) мочевины. Данных результатов можно добиться путем увеличения ионной силы гидролизата и увеличения концентрации аммоний ацетата в используемых буферных растворах;
4. предложен универсальный метод получения инсулина при использовании штаммов-продуцентов ГБ, имеющих различные лидерные последовательности;
5. разработан новый метод одновременного (совместного) гидролиза ГБ карбоксипептидазой В и трипсином в соотношении (1,25÷10):1, в котором для

уменьшения количества трудноотделимых примесей используется трипсин, инкубированный 24 часа при 4 °С в 0,01 Н НСl.

Практическая значимость работы

Предложен метод ферментолиза и последующей хроматографической очистки, позволяющий повысить выход инсулина с единицы гибридного белка и значительно снизить себестоимость продукта за счет применения 2-х М мочевины и замены импортных ферментов на отечественные.

Разработанная технология получения инсулина применяется при производстве генно-инженерного инсулина (ГИИЧ) на ОАО «Национальные биотехнологии» (изменения к регламенту на производство субстанции генно-инженерного инсулина человеческого № ПР-50159728-01-02). Получена приоритетная заявка на патент РФ № 2006137635 от 25.10.2006 на способ получения ГИИЧ. Использование результатов работы в производстве привело к увеличению производства ГИИЧ в 2 раза и снижению себестоимости продукта на 63%.

Новые способы гидролиза и очистки позволили получать конечный продукт, соответствующий требованиям международных фармакопей на субстанцию инсулина. Разработанный алгоритм позволил статистически достоверно определять пригодность различных ферментных препаратов для нужд биотехнологического производства с наименьшими временными и денежными затратами. Использование нового метода очистки инсулина и его предшественников на SP-Sepharose FF с использованием буферных растворов на основе 2 молярной мочевины привел к снижению потребления мочевины в три раза не снижая чистоты получаемого полупродукта. Разработанные технологические приёмы легли в основу новой технологии получения генно-инженерного инсулина на основе нового штамма-продуцента *E. coli* JM109/pHINS11.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработан алгоритм позволяющий определить пригодность ферментативных препаратов протеаз для нужд биотехнологического производства генно-инженерных препаратов.
2. Показана возможность использования буферной системы на основе 2М мочевины при хроматографической очистке инсулина и его производных на SP-

sepharose FF при том же расходе буферных растворов и с той же эффективностью, что и при использовании буферной системы на основе 6М мочевины. Для этого необходимо увеличить ионную силу наносимого материала и увеличить содержание буферной соли в буферных растворах.

3. Доказано, что проведение одновременного гидролиза гибридного белка ГИИЧ, состоящего из лидерной последовательности, пептидного линкера GlySerHis₄₋₆GlySerArg и проинсулина человека, трипсином и карбоксипептидазой В необходимо проводить при $t=5\pm 1$ °С, $pH=7,2\pm 0,1$, и при соотношении гибридный белок:трипсин:карбоксипептидаза В = 1000:1,25:1. Перед использованием необходимо раствор трипсина в 0,01Н НСl с концентрацией 10 мг/мл инкубировать в течении 24 часов при 4 °С.

4. Разработана новая универсальная и масштабируемая технология получения ГИИЧ на основе штамма-продуцента E. coli JM109/pHINS11.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены на заседаниях секции Ученого света «Медицинская биотехнология» ФГУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора РФ» (Москва, 2007).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе одна статья в издании, рекомендованном ВАК, и одна приоритетная заявка на патент.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 137 страницах. Текст содержит 18 таблиц и 37 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов, пяти глав с изложением собственных результатов, обсуждения результатов и выводов. Библиографический указатель содержит 31 отечественную и 96 иностранных работ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исходным материалом в работе был раствор в 0,1М TrisНСl 0,1М КСl ($pH=5,5\pm 0,05$) ренатурированного гибридного белка, который получали при

культивации рекомбинантных штаммов *E. coli* JM109/pPINS07 и JM109/pHINS11. Чистота белка составляла $70 \pm 20\%$, концентрация 8 ± 2 г/л. Штаммы-продуценты хранятся в музее предприятия ОАО «Биопрепарат».

В работе были использованы следующие реактивы: аммоний ацетат (ч), мочеви́на (ч), трифторуксусная кислота (ч), хлорид калия (ч), ацетонитрил (осч), трис(гидроксиметил) аминометан (хч), натрий сернокислый (осч).

Для реакций ферментативного гидролиза применяли трипсин Trpck Treated фирм «Worthington» (США) с активностью 239 ед/мг и ГосНИИ «Генетика», карбоксипептидазу В с активностью 200 ед/мг производства ГосНИИ «Генетика».

Очистку продуктов гидролиза проводили с использованием сорбента SP-Sephарose FF «Amersham Pharmacia Biotech».

В экспериментах по определению критериев пригодности ферментов, поиску оптимальной буферной системы для очистки диаргининина сулина на SP-Sephарose FF и при подборе оптимальных условий проведения совместного гидролиза использовали ренатурированный ГБ, полученный при культивировании штамма-продуцента *E. coli* JM109/pPINS07, имеет следующую первичную структуру:

Лидерная последовательность

MetAlaAspAsnLysPheAsnLysGluGlnGlnAsnAlaPheTyrGluIleHisLeuProAsnLeuAsnGluGluGlnArgAsnGluPheGlnSerLeuLysAspAspProSerGlnSerAlaAsnLeuLeuAlaGluAlaLysLysLeuAsnAspAlaGlnAlaProLysAlaAspAsnLysGlySerHisHisHisHisHisHisGlySerArg

В-цепь

PheValAsnGlnHisLeuCysGlySerHisLeuValGluAlaLeuTyrleuValCysGlyGluArgGlyPhePheTyrThrProLysThrArgArg

С - пептид

GluAlaGluAspLeuGlnGlyGlyGlnValGluLeuGlyGlyGlyProGlyAlaGlySerLeuGlnProLeuAlaLeuGluGlySerLeuGlnLysArg

А - цепь

GlyIleValGluGlnCysCysThrSerIleCysSerLeuTyrGlnLeuGluAsnTyrCysAsn

Проинсулин
человека

Данный ГБ (далее PINS07) состоит из 160 аминокислотных остатков из которых 74 приходится на лидерную последовательность, 35 – на соединительный С-пептид, а 51 – на инсулин. Первичная последовательность С-пептида и инсулина идентичны человеческим. Лидерная последовательность данного ГБ состоит из IgG-связывающего домена белка А *Staphylococcus aureus* и пептидного линкера GlySerHis₆GlySerArg.

При поиске экономически выгодных новых штаммов использовали ренатурированный ГБ, продуцентом которого является *Escherichia coli*

JM109/pHINS11. Отличительной особенностью данного ГБ (далее HINS11) является лидерная последовательность, которая имеет следующую первичную структуру:
MetGlnAspProTyr

ValLysGluAlaGluAsnLeuLysLysTyrPheAsnAlaGlyHisSerAspValAlaAspAsnGlyThrLeuPheLeuGlyIleLeuLysAsnTrpLysGluGluSerAspHisProGlySerHisHisHisHisGlySerArg

Лидерная последовательность данного ГБ содержит 53 аминокислотных остатков и состоит из N-концевого фрагмента гамма-интерферона человека и пептидного линкера GlySerHis₄GlySerArg. Остальная часть представляет собой последовательность человеческого проинсулина. За счет укороченной лидерной последовательности молекула ГБ состоит из 139 аминокислотных остатков.

Основным методом определения количества и чистоты получаемых продуктов является аналитическая обращеннофазная высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Для этих целей используется система ВЭЖХ фирмы «Dionex», под управлением программного обеспечения «Chromeleon 6.4».

Подвижной фазой при анализах является смесь буферных растворов (фаз) А и Б на основе водного раствора 0,1 М Na₂SO₄ и ацетонитрила. Все анализы проводили при температуре колонки 40 °С. Рабочий поток подвижной фазы составлял 1 мл/мин. Все представленные в виде рисунков ВЭЖХ - хроматограммы основывались на регистрации поглощения волны с длиной 214 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Отбор препаратов трипсина, удовлетворяющих требованиям производства генно-инженерного инсулина человека

В мировой биотехнологической практике для расщепления ГБ наиболее часто используется трипсин зарубежных фирм «Worthington» и «Merck», которые отвечают всем предъявляемым требованиям по чистоте и специфичности. Но при крупномасштабном производстве цена данных ферментов составляла более 2% себестоимости конечного продукта не рентабельна. В связи с этим был проведен поиск отечественного фермента, отвечающего предъявляемым требованиям, но с лучшим соотношением цена/качество.

В ГосНИИ «Генетика» были разработаны и представлены на испытания несколько препаратов трипсина, выделенных из поджелудочных желез крупного

рогатого скота. Данные препараты различались методами очистки, удельной активностью и содержанием примесей. В табл. 1 представлены основные различия полученных препаратов трипсина.

Таблица 1.

**Свойства препаратов трипсина, предоставленных ГосНИИ «Генетика»
в сравнении с трипсином фирмы «Worthington»**

№ п/п	Способ очистки	Уд. активность/ мг	
		трипсин	химотрипсин
1	трипсин производства ООО «Самсон» после аффинной хроматографии	2,03	0,0096
2	аффинная хроматография при комнатной температуре частично очищенного препарата	2,4	0,0044
3	после одной кристаллизации	1,73	0,043
4	аффинная хроматография при 10 ⁰ С частично очищенного препарата	1,29	0,00324
5	двойная кристаллизация	1,4	0,00633
«Worthington»	не известен	2,03	0,00636

Для определения качества исследуемых препаратов трипсина проводили экспериментальные трипсинолизы ГБ. В качестве контроля параллельно производился трипсинолиз референсным образцом трипсина (производства фирмы «Whorthington») при тех же условиях.

Во время эксперимента 2 одинаковые емкости, с равными объемами раствора ГБ, помещали на магнитные мешалки. Раствором 1 М Tris pH доводили до 7,2±0,05. После этого в оба сосуда с ГБ добавляли одинаковое количество трипсина. Количество трипсина рассчитывали по формуле [1]:

$$Q_{\text{Трипс}} = \frac{Q_{\text{ГБ}} \cdot \omega}{500}$$

где: $Q_{\text{Трипс}}$ - масса трипсина, г; $Q_{\text{ГБ}}$ - масса ГБ, г, ω - коэффициент учитывающий содержание примесей в растворе ГБ. При проведении экспериментов $\omega=1,6$.

Сравнительный гидролиз проводили при $t=8\pm 2$ °С.

Основным методом контроля динамики процессов гидролиза являлось сравнение ВЭЖХ-хроматограмм продуктов гидролиза ГБ в исследуемом и стандартном образцах. Окончание процесса трипсинолиза определяли по завершению

роста или началу падения концентрации диаргининсулина (ДАИ) - основного продукта при трипсинолизе, после чего в реакционную смесь добавляли 20% трифторуксусную кислоту (ТФУ), с помощью которой рН понижали до $3,3 \pm 0,1$ и гидролиз останавливался. По завершении обоих процессов гидролиза результаты анализировали на одном аппарате ВЭЖХ для сравнения. После чего делали вывод о соответствии качества трипсина требованиям производства.

В результате трипсинолиза ГБ образуются три белка, являющимися основными продуктами реакции. Ими являются: ДАИ, моноаргинининсулин (МАИ) – побочный продукт и неидентифицированная примесь. Данная примесь была трудноотделима от инсулина человека методами ВЭЖХ и ионообменной хроматографии. Так как время выхода этой примеси при анализе методом ВЭЖХ было немного ($0,5 \div 1$ мин) больше, чем у инсулина человека. Результаты дополнительных исследований позволили однозначно идентифицировать данный белок как В30- дезтреонининсулин (ДТИ). В дальнейшем при анализе результатов внимание уделяли именно этим трем белкам (рис. 1).

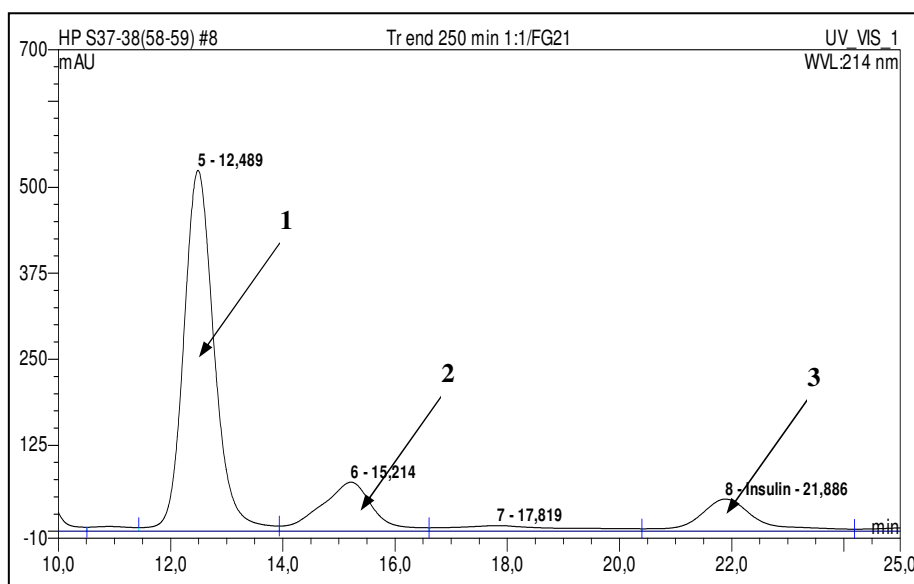


Рис. 1. ВЭЖХ - хроматограмма результатов трипсинолиза ГБ, полученная при использовании изократической элюции. Примечание: 1 – ДАИ, 2 – МАИ, 3 – ДТИ.

Для статистической достоверности полученных результатов с каждым из исследуемых ферментов было проведено 10 сравнительных трипсинолизом по выше проведенной методике.

Во время поиска оптимальных для производства отечественных препаратов трипсина были найдены и статистически подтверждены:

- оптимальные условия проведения трипсинолиза;

- критерии пригодности ферментов;
- метод тестирования препаратов трипсина.

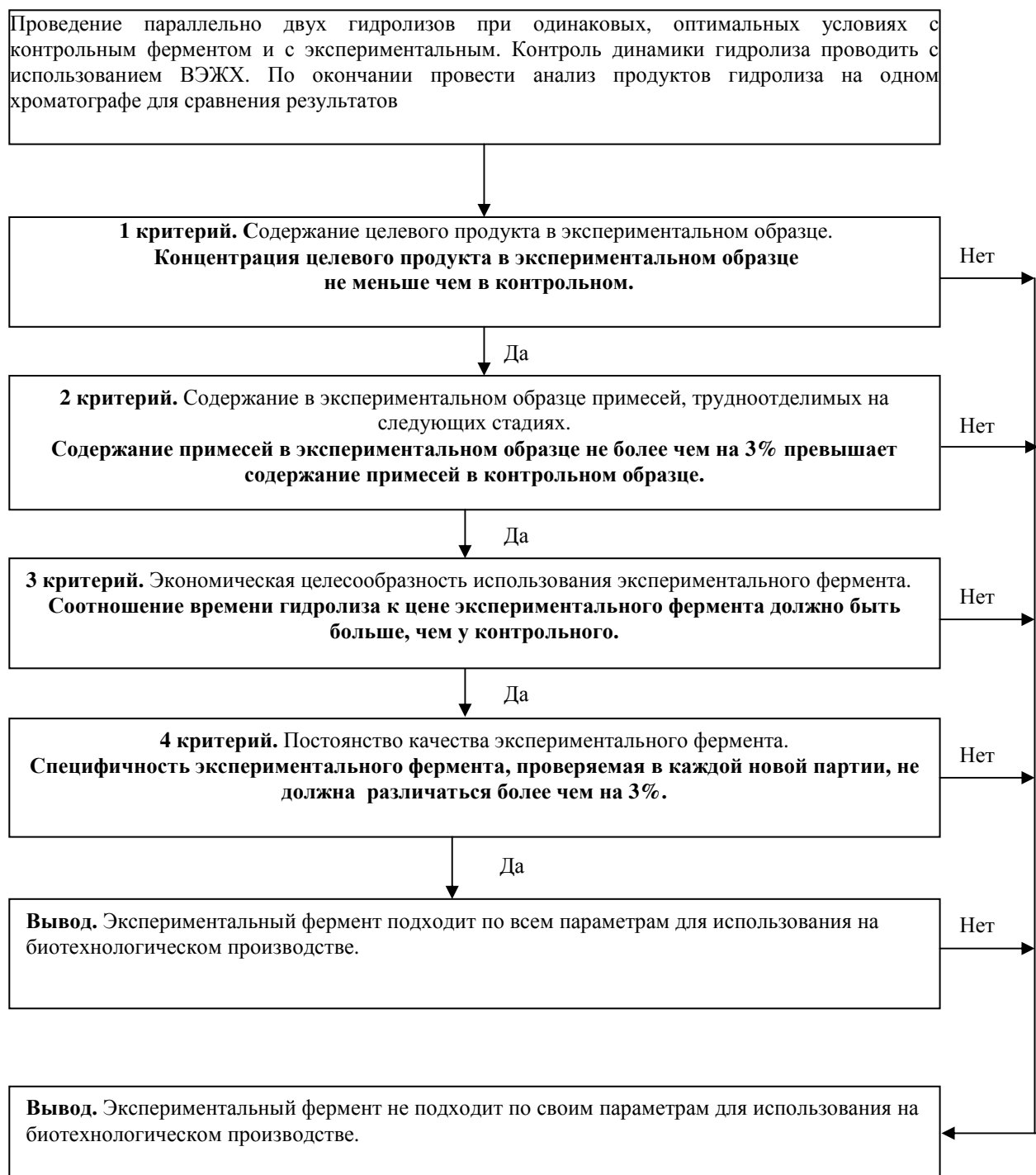


Рис. 2. Алгоритм определения соответствия качества ферментативных препаратов требованиям биотехнологического производства.

Таким образом, на основе полученных нами данных была разработана не имеющая аналогов методика и составлен алгоритм определения пригодности ферментов для нужд биотехнологического производства.

По этому алгоритму (рис. 2) было испытано пять препаратов трипсина.

В результате проведенных исследований для производственных целей был выбран отечественный фермент производства ГосНИИ «Генетика», отвечающий всем

критериям (табл. 2), получаемый методом двойной кристаллизации.

Таблица 2.

Результаты тестирования образцов трипсина

Тип фермента	Относительные различия концентраций белков, полученных при использовании исследуемого и стандартного ферментов, %			Чистота ДАИ, %	Время гидролиза, мин	Цена 1г, руб.	Решение
	ДАИ	МАИ	ДТИ				
1 фермент	-21,0±0,1	30,8±0,1	4,5±0,1	42,4±0,2	510±25	5600	низкое содержание ДАИ
2 фермент	-1,5±0,1	76,9±0,1	79,1±0,1	35,4±0,2	480±25	3800	большое содержание примесей
3 фермент	-2,6±0,1	-3,8±0,1	-2,4±0,1	54,0±0,2	500±25	4200	непостоянство качества
4 фермент	0,4±0,1	-1,9±0,1	1,5±0,1	55,1±0,2	500±20	8000	большая цена
5 фермент	1,1±0,1	-1,9±0,1	0,3±0,1	55,5±0,2	620±30	5000	принято
Worthington	0	0	0	55,3±0,2	500±20	7700	

Оптимизация условий хроматографической очистки диаргининсулина.

Для производства ГИИЧ важное значение имеет качество мочевины. В России последнее время выпуск мочевины категорий х, чда, осч практически прекращен. Используемая в технологической схеме мочевины фирм «Merck» и «Panreac» соответствует предъявляемым требованиям, но очень дорога (65 руб./кг). Для производства 1 кг инсулина по существовавшей технологии необходимо было более 2 тонн мочевины, что не рентабельно. Большой расход реагента был обусловлен использованием при хроматографической очистке ДАИ на SP-sephrose FF буферных растворов на основе 6М мочевины. Также использование высококонцентрированных растворов мочевины приводит к быстрому выходу из строя дорогостоящего хроматографического оборудования.

В связи с этим был проведен ряд исследований, позволивший значительно снизить концентрацию мочевины, и как следствие, ее расход.

Для проведения хроматографического разделения предшественников инсулина в производстве используется хроматографический модуль «Quantasep 1000LXR», и колонки серии «Versaflo» фирмы «Sepragen». В производстве применяется 40 литровая колонка «Versaflo - 250 column» с 25 литрами сорбента. Данная колонка имеет внутренний диаметр 250мм. Высота слоя сорбента составляет

около 50 см. Рабочий поток равен 500 мл/мин.

Для проведения экспериментов хроматографический модуль настраивали на работу с потоками от 8 до 100 мл/мин. Экспериментальные хроматографии проводили в колонке НК 26 фирмы Pharmacia. Диаметр колонки составляет 25 мм, т.е. в 10 раз меньше, чем у препаративной колонки «Versaflo - 250 column». Для облегчения дальнейшего масштабирования результатов экспериментальных хроматографий на производственные условия высоту слоя сорбента в экспериментальной колонке оставили 50 см, что соответствует 250 мл сорбента, или в 100 раз меньше, чем в промышленной колонке. Таким образом нагрузка должна быть в районе 10 г исходного ГБ. В связи с ограничениями хроматографа удалось уменьшить поток только в 62,5 раза (8 мл/мин).

Исходя из результатов предварительных исследований и экономической целесообразности было решено, что необходимо использовать буферную систему на основе 2 М мочевины и ацетата аммония.

Первой буферной системой на основе 2М мочевины была предложена система, представлена в табл. 3.

Таблица 3.

Состав буферной системы на основе 2М мочевины с 50 мМ ацетата аммония

Компоненты	Уравновешивающий буфер	Элюирующий буфер
хаотроп	2 М мочевины	2 М мочевины
буферная соль	50 мМ NH ₄ Ac	50 мМ NH ₄ Ac
элюирующий агент	-	1М KCl
pH	3,6±0,05	3,6±0,05

При проведении хроматографии было выяснено, что:

1. элюирующей силы буферной смеси вполне достаточно для полной элюции всего материала;
2. основной примесью, мешающей очистке ДАИ при данной буферной системе является ДТИ, так как данный белок присутствовал практически во всех фракциях и сильно понизил выход чистого продукта;
3. концентрация ДАИ в целевых фракциях была 1,1±0,3 г/л, что достаточно для производственных условий;

4. последовательность элюции продуктов трипсинолиза сохраняется той же, что и при использовании 6 М мочевины.

Таблица 4.

Градиенты, использованные при препаративных и экспериментальных очистках диаргининсулина

Название градиента	Молярность мочевины, М/ молярность буферной соли, мМ/	Изменение процента ЭБ на участке градиента, % / продолжительность участка			Продолжительность градиента, мин
		1 участок	2 участок	3 участок	
препаративная очистка, поток 500 мл/мин					
градиент №1	6М 30 мМ NH ₄ Ac	30-40/250	40-55/150	55-65/440	840
градиент №2	2М 50 мМ NH ₄ Ac	30-50/960	50-70/700	-	1660
экспериментальная очистка, поток 8 мл/мин					
градиент №3	2М 50 мМ NH ₄ Ac	30-55/600	55-75/460	-	1060

После серии экспериментов был подобран оптимальный для данной буферной системы градиент (градиент №3, табл. 4), позволивший достичь заданного выхода (75±5%) продукта с чистотой более 90%. Но из-за низкой растворимости белков время градиентной элюции пришлось увеличить почти в 2 раза по сравнению с 6 М буферной системой при тех же выходах.

Масштабирование данного процесса в производственных условиях оказалось экономически невыгодным из-за большей (в 2 раза) продолжительности хроматографической очистки (градиент №2, табл. 4).

Расход буферных растворов на основе 6М мочевины на 1 хроматографию составлял около 450л. Хроматографическая очистка ДАИ таким объемом буферных растворов на основе 2М мочевины и 50мМ аммоний ацетата позволила достичь выхода 52%, что не рентабельно.

Следующим шагом по оптимизации условий хроматографии стало использование буферов на основе 2М мочевины и 100 мМ NH₄Ac. Повышенная концентрация аммоний ацетата привела к увеличению скорости элюции примесей и к уменьшению времени хроматографии. Также, из-за большей ионной силы использовавшихся буферов повысилась элюирующая сила буферной системы, что позволило понизить содержание в элюирующем буфере KCl до 0,5 М.

Хотя данная система и позволила уменьшить расход буферных растворов до заданного, но выход составил только 69%. Дальнейшее увеличение содержания в

буферных растворах аммоний ацетата было не приемлемо, так как приводило к значительному повышению коррозионной активности. Поэтому было решено оптимизировать другие важные процессы хроматографической очистки.

Было решено увеличить ионную силу раствора трипсинолизата таким образом, чтобы часть примесей не задерживалась на сорбенте, а зоны сорбированных белков были больше разнесены по колонке для их лучшего разделения при дальнейшей хроматографии.

Таблица 5.

Сравнение эффективности применения различных буферных систем на основе 2 М мочевины при очистке диаргининсулина из трипсинолизата

Серия экспериментов, №	Концентрация NH ₄ Ac в буферных растворах, mM	Молярность KCl в элюирующем буфере, M	Количество добавленного KCl в трипсинолизат, mM	Суммарный расход буферов, л	Чистота ДАИ, %	Объем собранных фракций, л	Концентрация ДАИ, г/л	Количество ДАИ в чистых фракциях, г	Выход чистого ДАИ %
1	50	1	0	5,2	93,7	0,65	2,99	1,94	90
2	100	1	0	3,3	91,3	1,08	1,26	1,36	63
3	100	0,5	0	3,6	92,9	1,16	1,28	1,49	69
4	100	0,5	20	3,8	93,8	1,36	1,24	1,68	78
5	100	0,5	40	3,2	90,1	1,13	1,30	1,47	68
6	100	0,5	40	3,5	92,8	1,62	1,16	1,88	89

Увеличения ионной силы трипсинолизата достигали добавлением KCl, который уже присутствовал в трипсинолизате.

Проведение нескольких серий экспериментов с добавлением различных количеств KCl, оптимальная концентрация которого оказалась 40мМ. Во время экспериментов были скорректированы профили градиентов.

Результаты и исходные данные серий экспериментальных хроматографий представлены в табл. 5 (серым выделены эксперименты проведенные при использовании одного градиента).

Таким образом, путем увеличения элюирующей силы наносимого трипсинолизата и концентрации буферной соли в используемых буферных растворах поставленная задача была решена.

Оптимизация процесса трансформации гибридного белка при получении инсулина человека

Использование для получения инсулина человека метода отдельного гидролиза, включающего в себя трипсинолиз ГБ с получением ДАИ, его хроматографическая очистка на SP-sepharose FF, концентрирование с последующей трансформацией очищенного ДАИ карбоксипептидазой В до инсулина имеет как ряд преимуществ, так и свои недостатки. Так ДАИ за счет двух остатков аргинина имеет большой положительный заряд, чем молекула инсулина и при ионообменной хроматографии ДАИ легко очищается от белков, трудноотделимых в дальнейшем (например, ДТИ) от инсулина. Но большая продолжительность процесса (около 50 часов), большие потери инсулина, в виде МАИ, ДТИ и остатков ГБ, на стадии трипсинолиза (до 20%) и во время последующих манипуляций (до 25%), приводят к тому, что практический выход очень низок. Более совершенным и экономически выгодным является метод совместного гидролиза, при котором ГБ одновременно обрабатывается трипсином и карбоксипептидазой В с получением инсулина в одну стадию. Такая схема производства, в следствии полного гидролиза ГБ до инсулина, исключает потери в виде побочных продуктов реакции и неполного гидролиза ГБ. Трансформация ГБ в инсулин за одну стадию кроме увеличения выхода позволяет значительно снизить временные затраты, тем самым повышая производительность производства и снижая себестоимость. Основным недостатком данного метода является образование во время гидролиза примесей, трудноотделимых от инсулина (В30-дестреонининсулина и др.). Таким образом при разработке метода совместного гидролиза ГБ главной задачей являлся поиск оптимальных физико-химических условий, при которых нарабатывается незначительные количества трудноотделимых примесей.

Для рассмотрения возможности перехода на более технологичную схему был проведен ряд экспериментов по поиску оптимизации условий проведения совместного гидролиза.

Совместный гидролиз ГБ протекает в две стадии: трипсинолиза ГБ до промежуточных продуктов (диаргинининсулина и моноаргинининсулина) и их карбоксипептидолиза до инсулина. Таким образом, трипсинолиз является определяющей, а карбоксипептидолиз – зависимой стадией совместного гидролиза.

Следовательно, все продукты, образующиеся при трипсинолизе ГБ, обязательно будут образовываться и во время реакции совместного гидролиза.

В начале было использовано стандартное соотношение «фермент/субстрат» как и при отдельном гидролизе, а количество ферментов рассчитывалось по формулам [1] и [2]:

$$Q_{\text{Carb}} = \frac{Q_{\text{ГБ}} \cdot \alpha}{750} \quad [2]$$

где: $Q_{\text{ГБ}}$ - масса гибридного белка, г; α - содержание инсулина в PINS07 оно равно 0,3; Q_{Carb} - масса карбоксипептидазы В, г.

В результате проведения гидролиза при данном соотношении фермент: субстрат и при $\text{pH}=7,2\pm 0,1$; $t=8\pm 1$ °С был получен инсулин с примесью ДТИ более 20%, что недопустимо.

Для определения оптимальной pH и температуры при совместном гидролизе были проведены серии экспериментов, в результате которых была замечена зависимость увеличения количества ДТИ при повышении температуры (рис. 3).

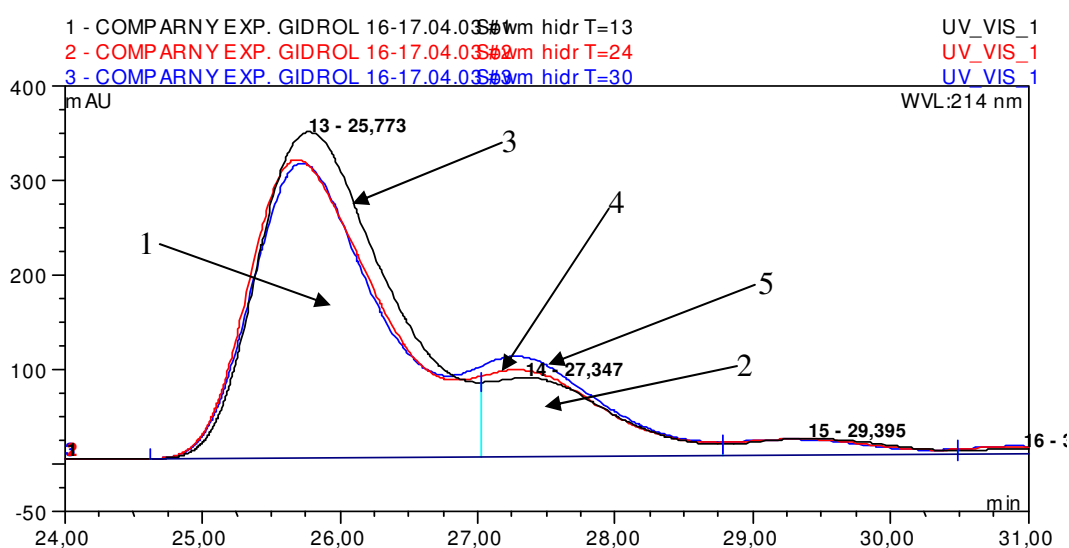


Рис. 3. Зависимость результата совместного гидролиза от температуры.

Примечание: 1 – инсулин; 2 – ДТИ; 3 – хроматограмма гидролиза при 13 °С; 4 – хроматограмма гидролиза при 24 °С; 5 – хроматограмма гидролиза при 30 °С.

При определении оптимума pH была получена схожая картина увеличения количества ДТИ от увеличения pH.

Полученные зависимости не линейны и при проведении экспериментов при низких температурах (1 – 6 °С) и значениях pH в районе $7,1\pm 0,1$ было выяснено, что

результаты гидролиза практически не изменяются, но содержание ДТИ все еще велико (5-10%).

Таким образом был найден оптимум проведения совместного гидролиза: $pH=7,1\pm 0,1$ и $t=5\pm 1^{\circ}C$.

В результате проведенных экспериментов было выяснено, что соотношение ГБ: фермент влияет только на время гидролиза, но не на качество получаемого продукта. Таким образом главным при поиске оптимальных концентраций ферментов было определение оптимального соотношения трипсин : карбоксипептидаза В.

При анализе динамики накопления продуктов во время трипсинолиза было замечено, что если во время не остановить реакцию, то концентрация ДАИ начнет падать, а ДТИ – расти. При проведении совместного гидролиза накопление ДТИ происходило одновременно с ростом концентрации инсулина и по завершении гидролиза концентрации белков оставались неизменными. В результате было выдвинуто предположение о том, что ДТИ – продукт побочного воздействия трипсина (или его примесей) на ДАИ, уменьшение времени нахождения которого в растворе приведет к снижению концентрации ДТИ. Этого можно достичь увеличением содержания карбоксипептидазы В. Также было выдвинуто предположение, что инкубация перед гидролизом трипсина в неблагоприятных условиях, позволит снизить содержание примесей и, тем самым, приведет к снижению конечной концентрации ДТИ.

В результате проведенных экспериментов выдвинутые предположения были подтверждены (рис. 4). Доказано, что при массовом соотношении карбоксипептидаза В : трипсин $\geq 1,25:1$ и при $pH=7,1\pm 0,1$ и $t=5\pm 1^{\circ}C$ содержание в гидролизате ДТИ равно $2,5 \pm 0,5\%$.

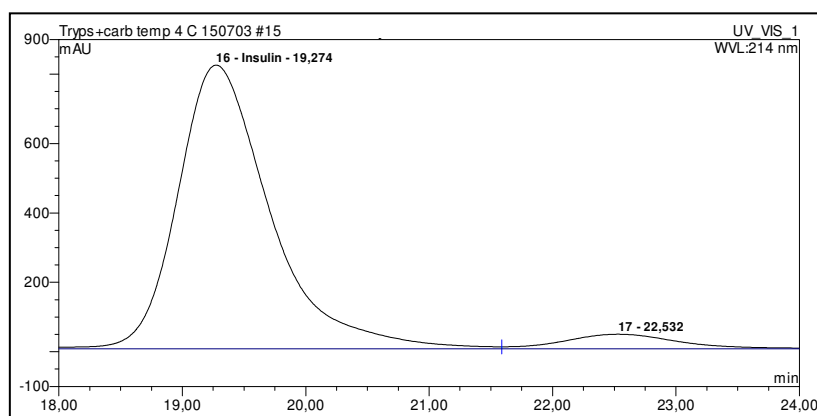


Рис. 4. Результат совместного гидролиза при $pH=7,0$ и при $t=6^{\circ}C$ и соотношении карбоксипептидаза В : инкубированный трипсин = 1,25:1.

Эксперименты по инкубированию трипсина в различных условиях показали, что количество ДТИ уменьшается. Инкубация раствора трипсина с концентрацией 10 мг/мл в 0,01Н HCl 24 часа при 4 °С позволила значительно уменьшить содержание ДТИ и не привела к потере активности фермента.

Уменьшение температуры и pH ниже 5°С и 7,0 соответственно, приводило к значительному увеличению времени гидролиза, что не компенсировалось небольшим (менее 0,2%) уменьшением содержания ДТИ. Увеличение относительного содержания карбоксипептидазы В также не приводило к значительному уменьшению содержания ДТИ, но значительно увеличивало себестоимость продукта.

В результате проведенной работы были определены оптимальные физико-химические условия проведения совместного гидролиза ГБ:

1. Температура реакционной среды $\leq 6^{\circ}\text{C}$;
2. $\text{pH} \leq 7,1 \pm 0,1$;
3. соотношение карбоксипептидаза В : трипсин $\geq 1,25:1$;
4. использование подготовленного трипсина путем инкубации его раствора с концентрацией 10 мг/мл в 0,01Н HCl 24 часа при 4 °С.

При масштабировании процесса на производственные мощности в целях снижения себестоимости и ограниченности технологического процесса по времени было найдено оптимальное соотношение ГБ : карбоксипептидаза В : трипсин = 1000:1,25:1. При таком соотношении гидролиз ГБ с концентрацией 8 ± 2 г/л при $\text{pH} = 7,1 \pm 0,1$ и $t = 5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ продолжается 14 ± 3 часа, степень гидролиза при этом не менее 95%.

Инсулин, полученный по разработанной технологии, содержит ДТИ и чистоту около 65% (по данным ВЭЖХ), недостаточную для достижения приемлемого выхода на последующей стадии очистки методом препаративной ВЭЖХ. Буферная система на основе 6М мочевины не подходила для очистки инсулина на сорбенте SP-sepharose FF в следствии высокой себестоимости получаемого продукта. Разработанная нами методика очистки ДАИ на SP-sepharose FF, включающая предварительное увеличение ионной силы гидролизата добавлением 40 мМ KCl и использование буферной системы на основе 2М мочевины и 100мМ ацетата аммония, оказалась оптимальна и для очистки инсулина. Это позволило использовать метод совместного гидролиза в промышленных условиях и получать инсулин с чистотой не менее 94% при выходе с

хроматографии не менее $80\pm 5\%$. Таким образом, разработанный метод вписался в технологическую схему производства ГИИЧ на ОАО «Национальные биотехнологии» не требуя использования нового оборудования и дополнительных стадий.

В результате перехода на разработанную нами технологическую схему выход инсулина с чистотой более 94% можно поднять, при увеличении производства на предыдущих стадиях, в 3 раза до 4,7 кг/мес. (табл. 6).

Таблица 6.

**Сравнение экономической эффективности методов получения
генно-инженерного инсулина человека**

Метод производства	Количество процессов в цикле	Время 1 цикла, ч	Себестоимость 1гр, руб	Производство инсулина за цикл, гр	Циклов за месяц, шт	Объем продукции гр./мес
раздельный гидролиз	4	94	738	216	7	1512
совместный гидролиз	2	36	274	238	20	4760

В результате проведенной нами работы производство ГИИЧ удалось увеличить в 2 раза, и оно достигло 3 кг/мес. Себестоимость получаемого инсулина уменьшилась на 464 руб./г (63%). Экономическая выгода составила 16.7 млн. руб. в год, при производстве 36 кг/год.

Разработка стадии гидролиза и хроматографической очистки генно-инженерного инсулина человека при использовании нового гибридного белка

Использование рекомбинантного белка PINS07 с низким (около 30%) содержанием инсулина не позволяет кардинально увеличить выход при существующих мощностях. Применение нового штамма-продуцента, экспрессирующего белок с более высоким содержанием инсулина, при прочих равных условиях, позволяет значительно снизить себестоимость ГИИЧ и повысить выход конечного продукта. С этой целью были проведены исследования по использованию более высокоэффективных штаммов-продуцентов инсулина, одним из которых является штамм *E. coli* JM109/pHINS11 – продуцент гибридного белка HINS11.

Данный ГБ отличался от использовавшегося ранее PINS07 более короткой лидерной последовательностью. За счет этого относительное содержание инсулина в

ГБ повысилось с 33% до 38%. Сайты протеолитического расщепления ферментов были сохранены прежними за счет чего основные продукты гидролиза не должны были отличаться. Но новые сайты протеолитического расщепления трипсина были внесены в лидирующую последовательность, что могло сказаться на стадии хроматографической очистки.

Экспериментальный трипсинолиз проводили при тех же условиях, что и трипсинолиз PINS07.

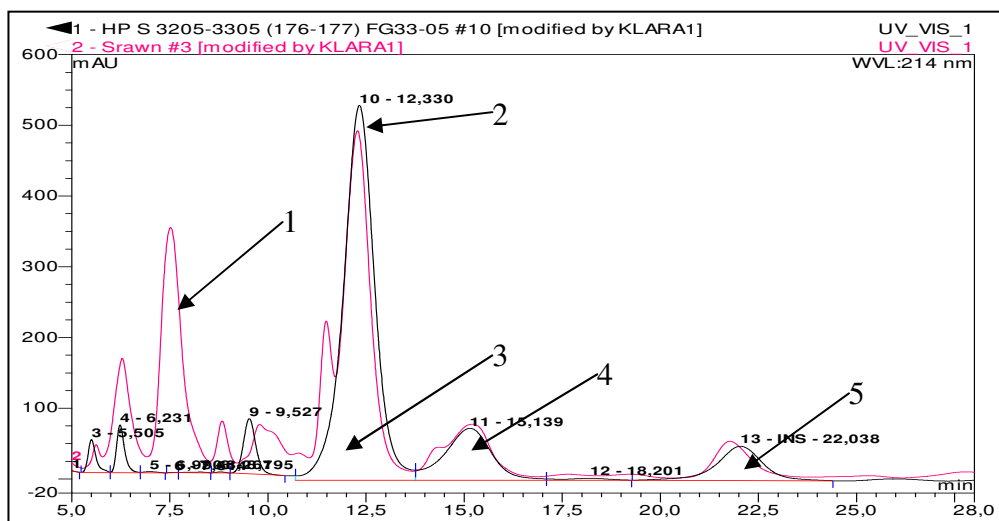


Рис. 5. Сравнение результатов трипсинолиза HINS11 и PINS07.

Примечания: 1 – результат трипсинолиза HINS11; 2 – результат трипсинолиза PINS07; 3 – ДАИ; 4 – МАИ; 5 – ДТИ.

На рис. 5 приведена сравнительная хроматограмма результата трипсинолиза HINS11 наложенная на результат трипсинолиза PINS07 с примерно равными концентрациями целевого ДАИ. Хорошо видно, что кроме ДАИ в растворе присутствуют также основные белки, получаемые при трипсинолизе PINS07: МАИ и ДТИ.

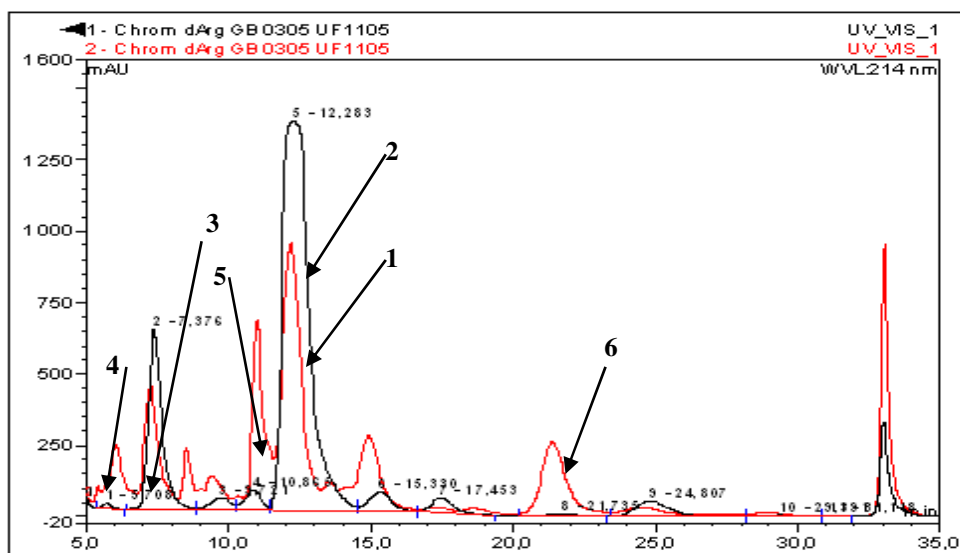


Рис. 6. Результат хроматографической очистки ДАИ, из трипсинолизата HINS11. Примечание: 1– хроматограмма исходного трипсинолизата HINS11; 2 – хроматограмма наиболее чистой фракции, полученной при хроматографической очистке ДАИ; 3 – трудноотделимая примесь; 4,5 – легко отделимые примеси; 6 – В30- дезтреонинсулин.

Сопоставляя данные о конечных концентрациях белков в растворе трипсинолизата было установлено, что динамика процесса гидролиза идентична у обоих ГБ. Основное различие результатов гидролиза отмечено при рассмотрении левой части рис.5. Так при трипсинолизе HINS11, кроме приведенных выше белков, присутствует большое количество примесных белков. При последующей попытке очистить полученный ДАИ на сорбенте SP-sepharose FF оказалось, что один из примесных белков со временем выхода на ВЭЖХ хроматограмме около 7,5 мин (№3 на рис. 6), элюируется в одно и тоже время, что и ДАИ, причем максимумы концентраций ДАИ и этого белка также совпадают (рис.6). Ввиду явного равенства рI у ДАИ и белка №3 (рис. 6) был сделан вывод о невозможности очистки ДАИ из трипсинолизата HINS11 с приемлемой чистотой и выходом. Дальнейшие эксперименты в этом направлении были прекращены.

Анализ полученных результатов позволил провести эксперимент по совместному гидролизу HINS11. Как уже было отмечено, при проведении трипсинолиза HINS11 образуются те же самые белки (ДАИ, МАИ и ДТИ) и с той же самой динамикой, что и при трипсинолизе PINS07. Так как при совместном гидролизе ведущей является реакция именно трипсинолиза, а ведомой – карбоксипептидолиз, то ожидали, что и при совместном гидролизе динамика процесса образования продуктов реакции останется прежней. Поэтому для проведения совместного гидролиза HINS11 использовали те же условия, что и при гидролизе PINS07.

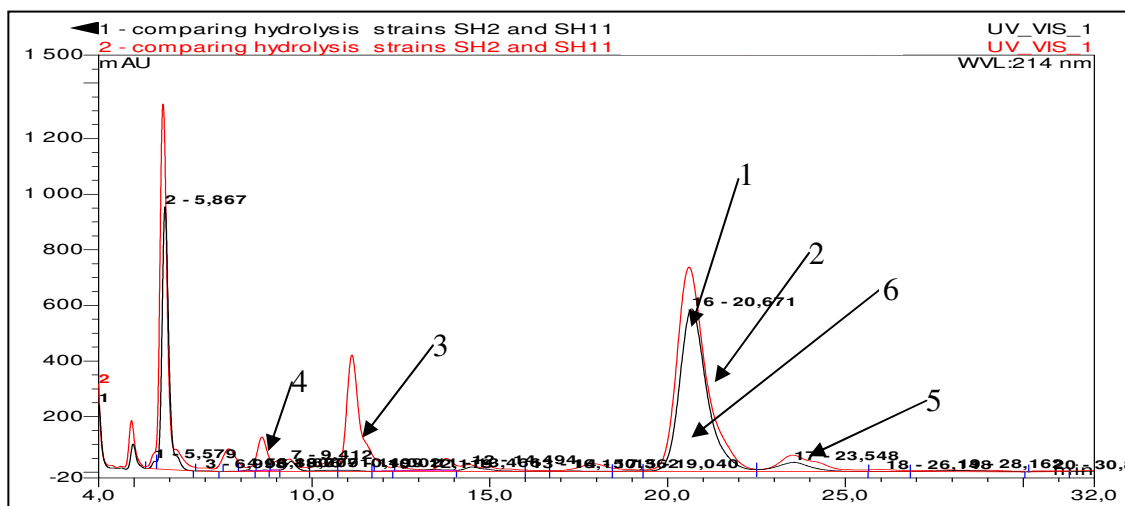


Рис. 7. Результат совместного гидролиза HINS11.

Примечание: 1 – хроматограмма результата совместного гидролиза PINS07; 2 – хроматограмма результата совместного гидролиза HINS11; 3 – примесный белок; 4 – белок, мешающий ионообменной хроматографической очистке ДАИ; 5 – А21-дезамидоинсулин.

Результаты эксперимента приведены на рис. 7, где сравнены результаты совместных гидролизом PINS07 и HINS11, имевших одинаковую концентрацию ГБ. Видно, что при совместном гидролизе HINS11 также образуется много примесей, которых нет при гидролизе PINS07, но выход значительно выше: 45% и 32%, соответственно. Основными примесями, полученными при совместном гидролизе были те же самые белки (пики 3 и 4 на рис. 7), что и при трипсинолизе (пики 5 и 3 на рис.6), соответственно. Данные белки, как уже говорилось, элюируются при разной ионной силе подвижной фазы и не загрязняют фракции с ДТИ, а, следовательно, не мешают при хроматографии инсулина.

Проведенные эксперименты по гидролизу HINS11 и последующей хроматографической очистке полученного ГИИЧ на сорбенте SP-sepharose FF статистически достоверно показали возможность применения данного ГБ для производства ГИИЧ методом совместного гидролиза, разработанным в ходе этой работы. Так, при гидролизе HINS11 образуется почти на 30% больше инсулина на единицу массы ГБ, чем при гидролизе PINS07. При последующей хроматографической очистке гидролизата выигрыш снижается, но, тем не менее, составляет более 20%. Расчетная экономическая выгода использования данного штамма-продуцента составила более 1,7 млн. рублей в год при увеличении производства до 43,3 кг/год.

ВЫВОДЫ

1. Усовершенствована технология производства инсулина человека, позволившая увеличить выход готового продукта в 2 раза при снижении его себестоимости более чем на 60%.
2. Разработана новая схема очистки продуктов гидролиза в ГБ на сорбенте SP-sepharose FF с применением буферной системы на основе 2 М мочевины. Добавление в гидролизат ГБ KCl до концентрации 140 мМ и использование буферной системы на основе 2М мочевины и 100мМ NH₄Ac позволило, не уменьшая выход и степень

очистки, оставить расход буферных растворов при хроматографической очистке на том же уровне, что и при использовании 6М мочевины.

3. Создана оригинальная методика проведения совместного гидролиза ГБ трипсином и карбоксипептидазой В, в разработке которой использованы данные полученные при поиске оптимальных условий процесса трипсинолиза ГБ. В результате были определены и статистически достоверно доказаны промышленные условия совместного гидролиза ГБ: $t=5\pm 1$ °С, $pH=7,1\pm 0,1$, соотношение белок: карбоксипептидаза В: трипсин = 1000:1,25:1. Перед использованием необходимо инкубировать раствор трипсина с концентрацией 10 мг/мл в течении 24 часов в 0,01N HCl при 4 °С.

4. Впервые была разработана технологическая схема получения ГИИЧ, основанная на использовании нового штамма *E. coli* JM109/pHINS11, продуцента рекомбинантного белка HINS11.

5. Технология получения инсулина, основанная на проведении совместного гидролиза ГБ и последующей хроматографической очистке инсулина человека на SP-Sephadex FF с применением буферных растворов на основе 2М мочевины, является универсальной для использования в биотехнологическом производстве ГИИЧ и масштабируемой в производственных условиях.

6. Получен алгоритм определения пригодности различных препаратов протеолитических ферментов для нужд биотехнологического производства, основанный на выявленном наборе критериев.

Практические рекомендации

1. Для определения пригодности нового препарата протеолитического фермента необходимо с ним и контрольным (например, используемом ранее) препаратом фермента провести серию параллельных экспериментов по гидролизу субстрата при оптимальных условиях. Контроль процесса и сравнение результатов гидролиза необходимо осуществлять с использованием аналитических систем ОФ ВЭЖХ.

2. Для получения ГИИЧ с минимальным количеством трудноотделимых примесей при проведении совместного гидролиза ренатурированного ГБ, содержащего аминокислотную последовательность проинсулина человека,

пептидный линкер His₄₋₆GlySerArg и лидерный пептид, необходимо использовать смесь карбоксипептидазы В и трипсина в массовом соотношении не менее 1,25:1 и поддерживать $t=5\pm 1$ °С, $pH=7,2\pm 0,1$. Перед использованием необходимо инкубировать раствор трипсина с концентрации 10 мг/мл в течении 24 часов в 0,01N HCl при 4 °С.

3. При снижении концентрации хаотропа (мочевины, гуанидинхлорида и т.д.) в буферных системах, используемых для очистки белков и пептидов на ионообменных сорбентах типа SP-sepharose FF для сохранения прежних объемов расхода буферных растворов при равном выходе готовой продукции необходимо повышать концентрацию буферной соли и увеличивать ионную силу наносимого материала путем добавления солей щелочных металлов, например KCl.

4. При производстве генно-инженерного инсулина человека перспективно использовать в качестве продуцента штамм E. coli JM109/pHINS11, который позволяет увеличить выход инсулина-сырца и снизить себестоимость препарата.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Купцов В.Н., Горкун Т.А., Борисов Н.В., Борисова Т.Ю., Шматченко Н.А., Байдусь А.Н., Степанов А.В. Оценка влияния физикохимических факторов и состава буферных растворов на выход инсулина человека. // Материалы Третьего московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, март 2005 г.), с. 110.
2. Купцов В.Н., Горкун Т.А., Борисов Н.В., Борисова Т.Ю., Шматченко Н.А., Степанов А.В. Оценка качества трипсина, используемого при производстве генноинженерного инсулина человека. // Материалы Третьего московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, март 2005 г.), с. 111.
3. Купцов В.Н., Горкун Т.А., Борисова Т.Ю., Шматченко Н.А., Честухина Г.Г., Степанов А.В. Разработка критериев оценки качества трипсина, используемого в биотехнологическом производстве. // Материалы 2-ой Международной конференции «Наука-бизнес-образование» «Биотехнология-Биомедицина-Окружающая среда» (г.Пущино, МО, май 2005 г.) с. 27-28.

4. Купцов В.Н., Горкун Т.А., Шматченко Н.А., Байдусь А.Н., Степанов А.В. Оптимизация условий стадии хроматографической очистки диаргинининсулина при производстве генноинженерного инсулина человека. // Материалы 2-ой Международной конференции «Наука-бизнес-образование» «Биотехнология-Биомедицина-Окружающая среда» (г.Пушино, МО, май 2005 г.) с. 85-87.
5. Купцов В.Н., Байдусь А.Н., Шматченко Н.А., Борисов Н.В., Горкун Т.А., Борисова Т.Ю., Степанов А.В. Оптимизация условий ферментативного гидролиза при производстве генно-инженерного инсулина человека. // Биотехнология № 4 2006г.
6. Шматченко В.В., Шматченко Н.А., Байдусь А.Н., Купцов В.Н., Ноздрин В.Н., Степанов А.В. Рекombинантная плазмидная ДНК рHINS11, кодирующая гибридный белок - предшественник инсулина человека, клетка *Escherichia coli*, трансформированная рекombинантной плазмидной ДНК рHINS11, штамм бактерий *Escherichia coli* JM109/рHINS11 - продуцент гибридного белка - предшественника инсулина человека, и способ получения инсулина человека. Заявка на патент РФ № 2006137635, 25.10.2006.