

# Курский государственный медицинский университет



**КАФЕДРА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ  
ТЕХНОЛОГИИ**

# Лекция

## Генно-инженерные лекарственные препараты

# **ЦЕЛЬ ЛЕКЦИИ:**

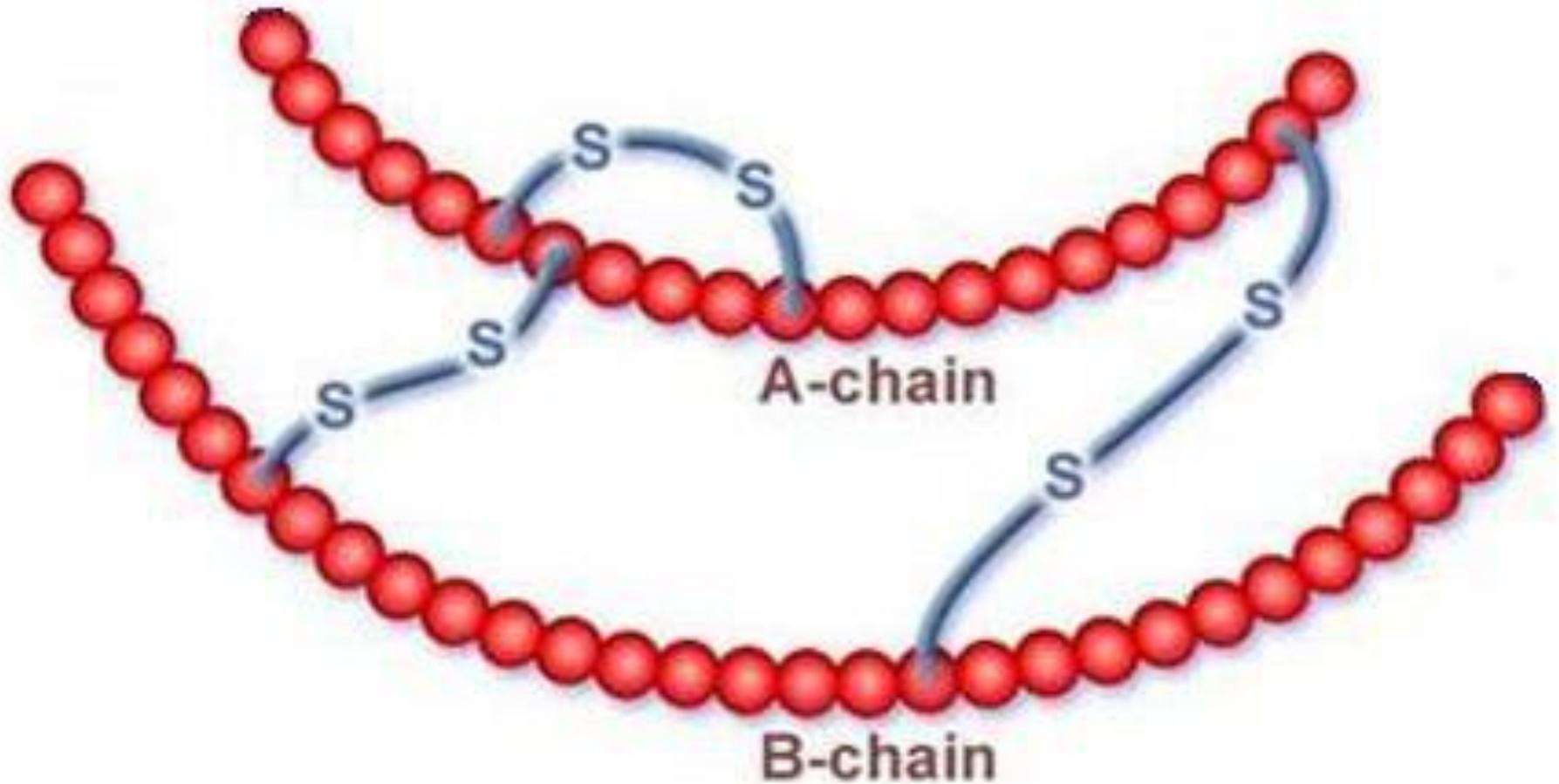
**изучение технологии производства и ассортимента лекарственных препаратов, выпускаемых с помощью рекомбинантной ДНК-биотехнологии (генной инженерии).**

# **П Л А Н   Л Е К Ц И И**

- 1. Получение инсулина генно-инженерными способами. Препараты инсулина.**
- 2. Гормон роста (соматотропин).**
- 3. Эритропоэтин.**
- 4. Пептидные факторы роста.**
- 5. Цитокины: интерлейкины и интерфероны.**

**I. Получение инсулина  
генно-инженерными  
способами. Препараты  
инсулина**

# ИНСУЛИН

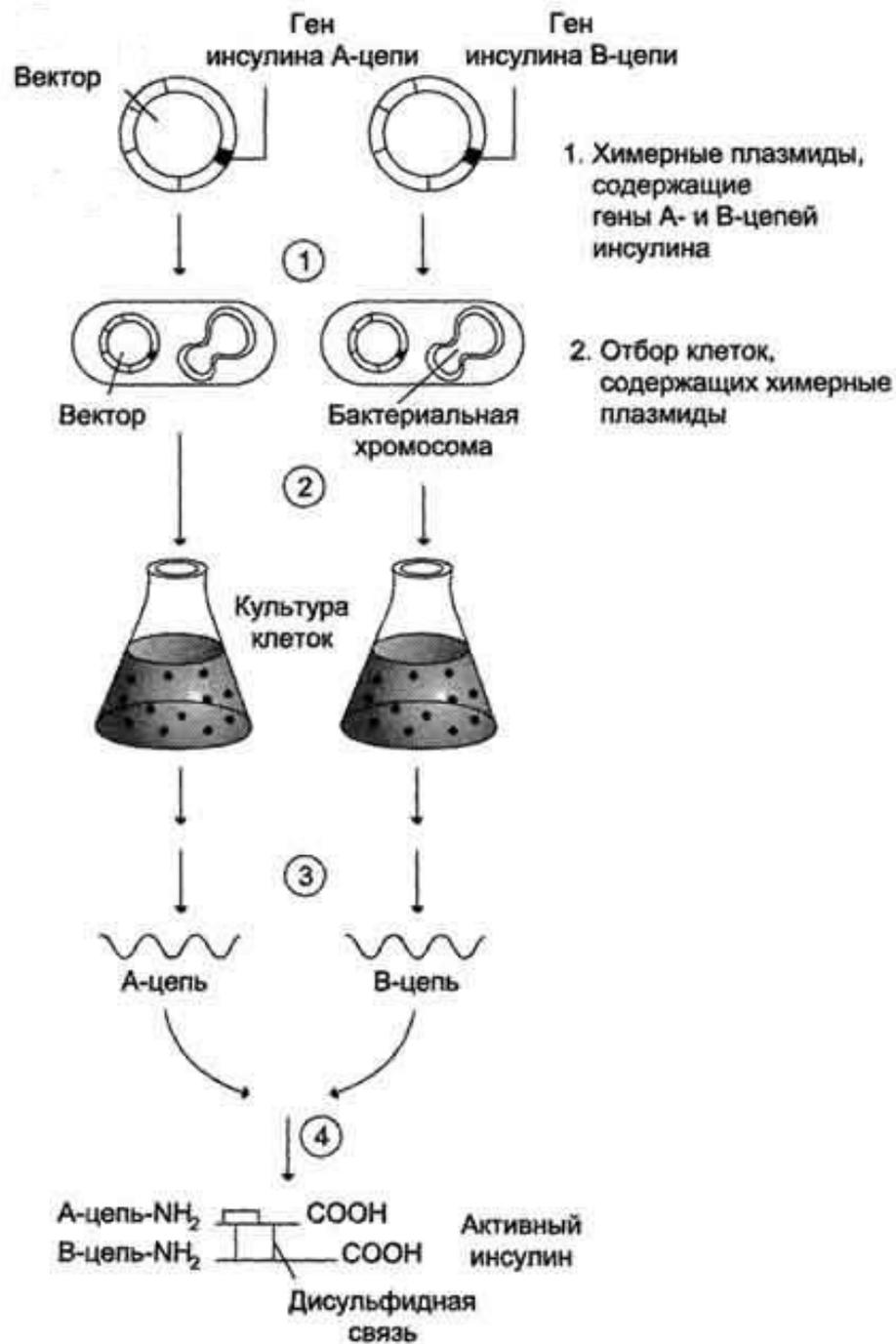


# 1. Генно-инженерный метод через синтез цепей А и В человеческого инсулина

1. Химический синтез генов, кодирующих цепи А и В человеческого инсулина.
2. Введение синтетических генов с помощью плазмиды в структуру E.coli.
3. Продуцирование двух цепей белка инсулина.
4. Отрезание метиониновых остатков бромцианом.
5. Соединение цепей А и В дисульфидными мостиками через образование S-сульфоната

Выход составляет 50%.

**Недостаток метода:** необходимость химического синтеза генов, большое число подготовительных операций, высокие затраты



## **2. Генно-инженерный метод через проинсулин**

**Имитирует природный процесс и включает в себя:**

- 1. Введение в *E.coli* или *S. cerevisiae* гена одноцепочечного проинсулина.**
- 2. Экспрессию гена с получением проинсулина.**
- 3. Выделение белка с последующим окислением трипсином или карбоксипептидазой для перевода проинсулин в инсулин.**

**Этот метод упрощает технологический процесс, снижает производственные затраты.**

**Получаемые человеческие инсулины по**

### **3. Комбинация генноинженерного и ферментативного метода**

**Включает:**

- 1. Получение свиного инсулина в E.coli по рДНК технологии.**
- 2. Ферментативное превращение свиного инсулина в инсулин человека.**

**При данной технологии исключается зависимость от сырьевой базы (животного сырья).**

## 4. Культивирование гибридных клеток

Этим методом, разработанным в США и Японии, человеческий инсулин получают из ферментативной жидкости при крупномасштабном культивировании гибридных клеток, продуцирующих инсулин.

Из хомяков, зараженных раком поджелудочной железы, выделяют клетки островков Лангерганса и после слияния их с клетками, продуцирующими человеческий инсулин, культивируют полученные гибридные клетки в бессывороточной среде.

# Фирмы-производители:



«Eli Lilly» (США)



«Genentech» (США)



«Novo nordisk» (Дания)



«Sanofi - Aventis»  
(Франция – Германия)

Инсулин, полученный по выше перечисленным технологиям, обязательно подвергают очистке (хроматографическими методами), что дает возможность получить инсулин высокой чистоты и природной активности.

## **Отечественные производители инсулина, использующие импортную субстанцию**

- **ОАО «Биотон-Восток», г. Орел – совместное российско-польское производство;**
- **ОАО «Уфа-Вита» – одно из подразделений «Фармстандарта»;**
- **ОАО «Национальные биотехнологии», г. Оболенск, Московская обл. – экспериментальные разработки инсулина на основе собственного генно-инженерного штамма.**

# История создания препаратов инсулина

Свиной и говяжий инсулины **аморфные**



Инсулины **кристаллические** (цинк-инсулин  
водные растворы с рН 2,8-3,5)



**Высокоочищенные кристаллические** свиной,  
говяжий и человеческий (биосинтетический)  
инсулины (нейтральные растворы для  
инъекций – подкожно и **внутривенно** –  
**непродолжительное действие**)



# Пролонгированные препараты инсулина

1. Суспензии цинк-инсулин аморфная, кристаллическая и смешанная (3:7)
2. Суспензия протамин-цинк-инсулин кристаллическая (изофан-инсулин) (протамин – белок, получаемый из молок осетровых рыб)
3. Суспензия инсулин аминохиноуринид - свиной инсулин, модифицированный аминохиноуринидом гидрохлоридом.

# Классификация препаратов инсулина

## 1. По составу:

- Монокомпонентные (свиной, говяжий, человеческий)
- Смешанные (свино-говяжий, кристаллический и аморфный).

## 2. По степени загрязненности проинсулином:

- Обычные инсулины (более 1% проинсулина)
- Монопиковые (менее 0,3%)
- Улучшенные монопиковые (менее 0,005%)
- Монокомпонентные (менее 0,001%)

# Классификация препаратов инсулина



## 3. По продолжительности действия:

- Инсулины короткого действия (инсулин раствор для инъекций человеческий – Хумулин, Актрапид НМ; свиной – Актрапид, Илетин II)

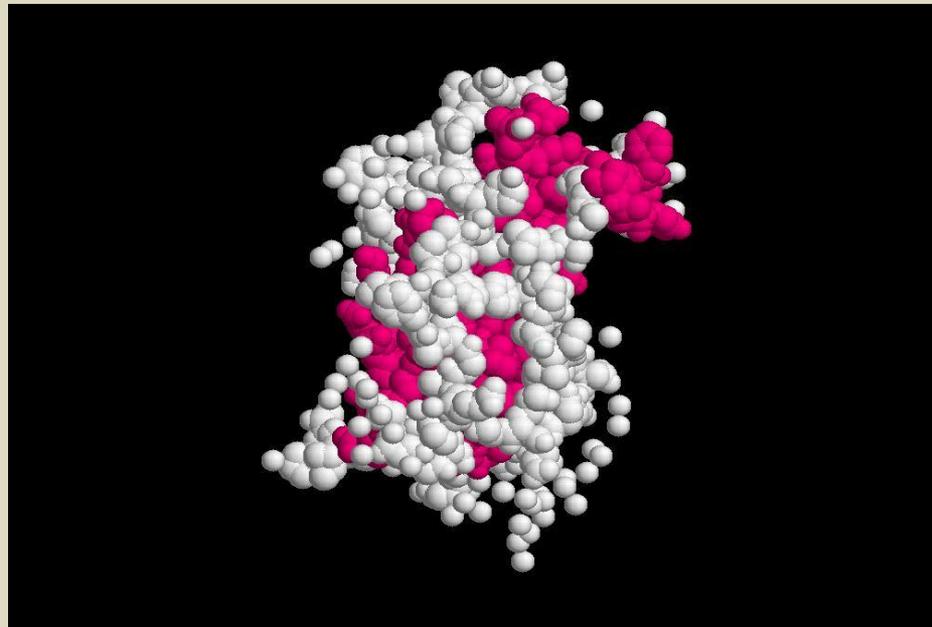
- Инсулины средней продолжительности действия – Хумулин НПХ, Депо-инсулин-Инсулин Ленте



- Инсулины длительного действия – Инсу суперленте (суспензия цинк-инсулин кристаллическая монокомпонентная)



## II. ГОРМОН РОСТА (СОМАТОТРОПИН)



В 1979 г американскими учеными был разработан **генно-инженерный метод** получения гормона роста человека. Рекомбинантный соматотропин отличается от нативного дополнительным остатком метионина на  $\text{NH}_2$  конце молекулы.

В настоящее время ведется разработка способов получения гормона роста человека при **культивировании клеток млекопитающих**, измененных методами генной инженерии.

# Фирмы-производители:



США - «Хуматроп»



США - «Протропин»



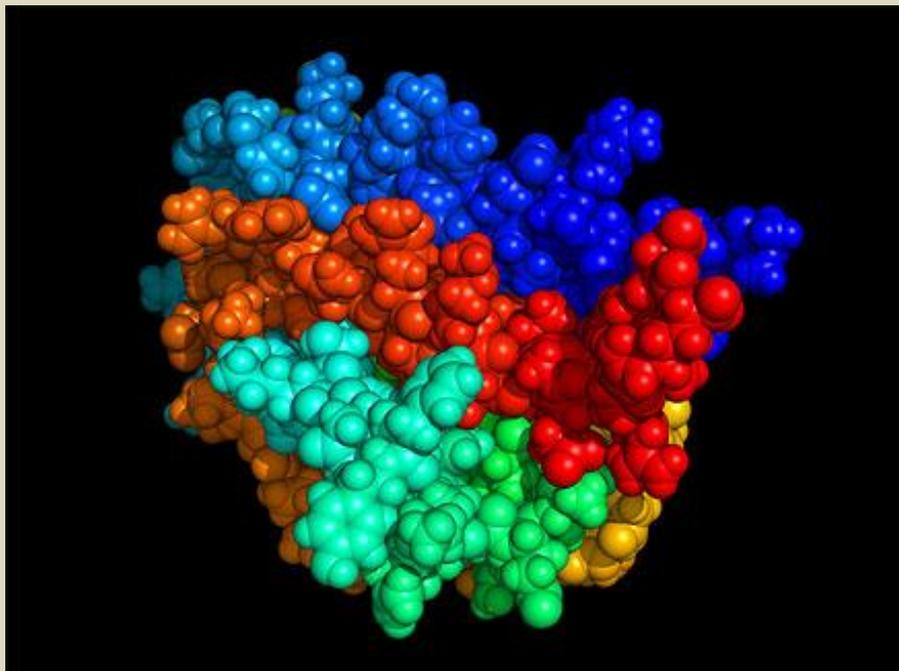
Дания -  
«Нордитропин»



Швеция -  
«Генотропин»



# III. ЭРИТРОПОЭТИН



Американская фирма «Amgen» первой клонировала ген человеческого эритропоэтина и добилась его экспрессии в бактериях, дрожжах и животных клетках. В настоящее время эритропоэтин получают при культивировании яйцеклеток китайского хомячка. Дальнейшая иммуноаффинная и ионо-обменная хроматографии позволяют получить гомогенный мономерный белок, не содержащий примесей.

В России НПО «Микроген» выпускает инъекционный препарат «Эритроestim», очищенный до 99,5% в сывороточном альбумине на изотоническом цитратном буфере.



# **IV. ПОЛИПЕПТИДНЫЕ ФАКТОРЫ РОСТА**

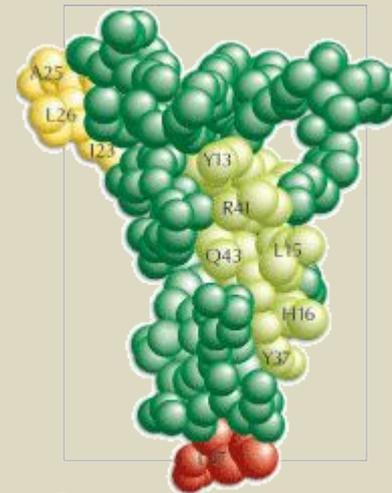
**Пептидные факторы роста представляют собой большую группу клеточных полипептидов, влияющих на рост и деление клеток различных типов путем взаимодействия со специфическими рецепторами на их поверхности.**

### **Группы факторов роста:**

- 1. Ранозаживляющие;**
- 2. Колониестимулирующие.**

# Ранозаживляющие факторы

1. **Эпидермальный фактор роста** (ранозаживляющее действие при трансплантации кожи, роговицы).



Пространственная структура эпидермального фактора роста человеческого

1. **Фибринобластный фактор роста** (стимулятор роста капилляров и фибробластов).

# Ранозаживляющие факторы

3. **Тромбоцитарный фактор роста** (стимулятор деления клеток гладких мышц и фибробластов).
4. **Инсулиноподобный фактор роста** (регулятор роста соединительной ткани).



# Колониестимулирующие факторы

1. Макрофагальный
2. Гранулоцитарный
3. Гранулоцитарно-макрофагальный

Пример.

Препарат «Нейпоген» содержит филграстим, который является стимулятором лейкопоэза и вырабатывается лабораторным штаммом *Escherichia coli*, в которую методами генной инженерии введен ген гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека.



**Колонистимулирующие факторы являются противоопухолевыми средствами.**

**Ранозаживляющие и колонистимулирующие факторы получают методами генной инженерии и культивированием клеток млекопитающих.**

**Основные производители этих групп препаратов – США и Япония.**



# **V. ЦИТОКИНЫ**

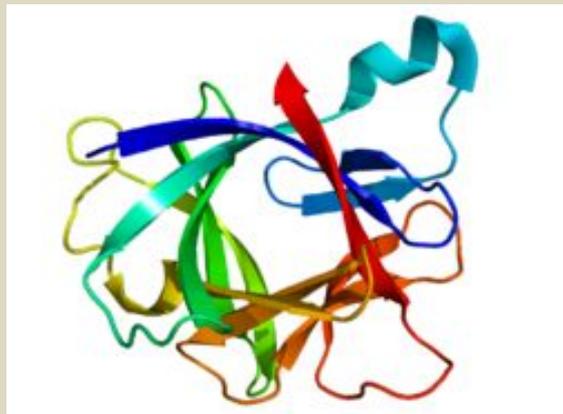
**Цитокины** - большая гетерогенная группа белков, синтезируемая лимфорециркулярными клетками.

Они обеспечивают функционирование иммунной системы, контроль гемопоэза, действуют на сосудистую, нервную и эндокринную системы.

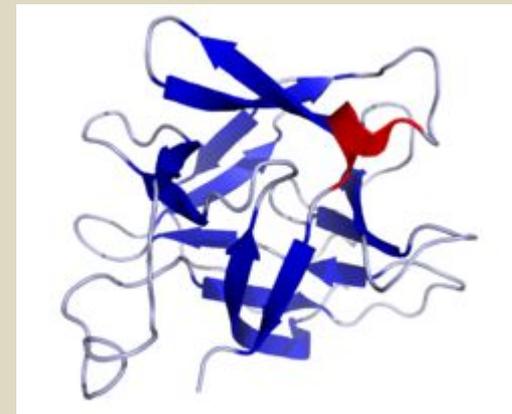
Наиболее изученными цитокинами являются

- **интерлейкины** и
- **интерфероны.**

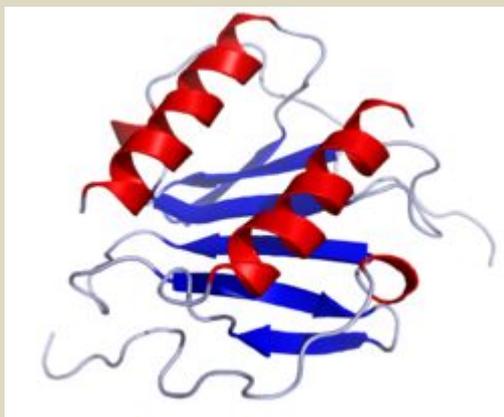
# ИНТЕРЛЕЙКИНЫ



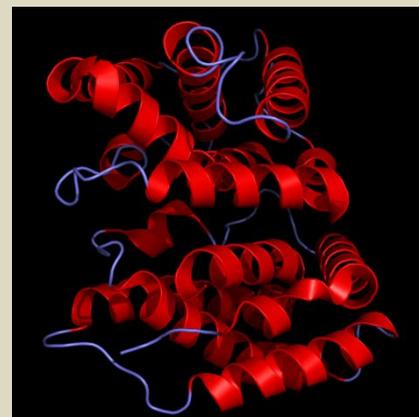
IL-1(бета  
)



IL-18



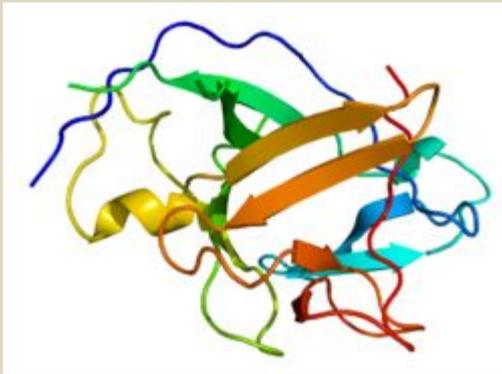
IL-8



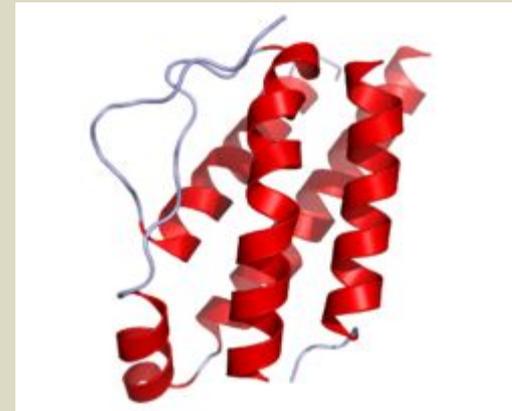
IL-22

**Интерлейкины** – вещества белковой или гликопротеидной природы, синтезируемые макрофагами, Т- и В-лимфоцитами.

В настоящее время выделено и охарактеризовано более 20 интерлейкинов (ИЛ-1, ИЛ-2 и т.д.).



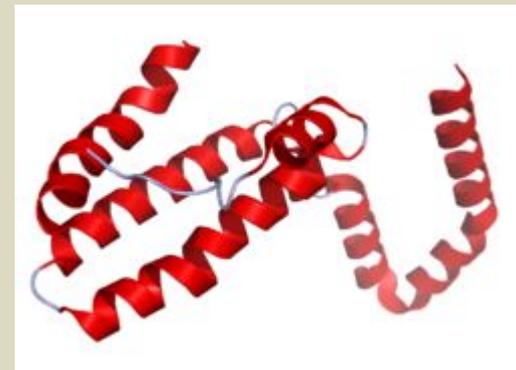
ИЛ-1(альфа)



ИЛ-2

# Схема получения интерлейкинов

1. Активация клеток-продуцентов.
1. Выделение интерлейкинов из культуральной среды.
1. Концентрирование.
1. Очистка.



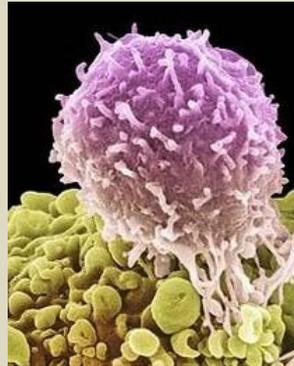
IL-10

# Клетки-продуценты интерлейкинов

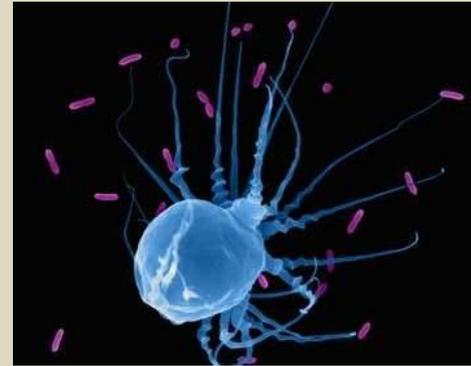
- культуры нормальных лимфоцитов или макрофагов;



Т-лимфоцит



В-лимфоцит



макрофаг

- рекомбинантные микробные клетки;
- клоны трансформированных клеток;
- Т-клеточные гибридомы.

Для увеличения продукции интерлейкинов, культуры клеток стимулируют **МИТОГЕНАМИ** – веществами, вызывающими митотическое деление клеток.

**В качестве митогенов используют:**

**1 - глобулярные растительные белки**

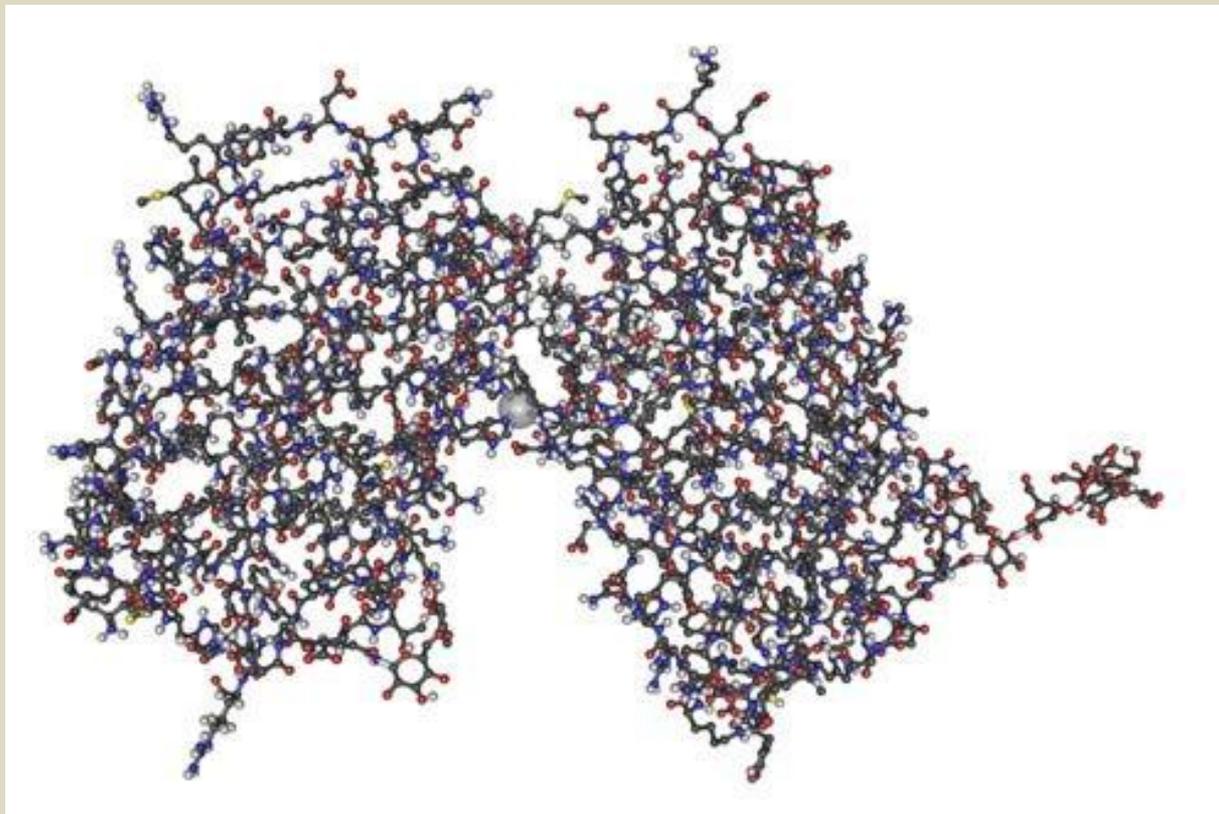
**фитогемаглютинин и**

**конканавалин;**

**2 - компоненты клеточной стенки бактерий**

**мурамилдипептид.**

# ИНТЕРФЕРОНЫ



Интерферон  
бета

**Интерфероны** – группа биологически активных белков или гликопротеинов, синтезируемых клетками организма в ответ на воздействие **интерфероногенов** или в ходе иммунной реакции.

К **интерфероногенам** относятся:

- вирусы,
- бактерии,
- продукты их метаболизма.

Интерфероны характеризуются **видоспецифичностью**.

# Биологическая роль интерферонов

- активация интерфероногенеза и защита организма от вирусной инфекции;
- стимуляция антителообразования;
- торможение роста опухолевых клеток за счет усиления цитостатической активности лимфоцитов и макрофагов;
- снижение активности некоторых ферментов (гидролаз, эстераз);
- подавление синтеза гормонов, участвующих в регуляции и коррекции состояния организма в норме, а при патологиях, связанных с нарушениями функции иммунной системы.

# Классификация интерферонов в зависимости от химической природы и клеток-продуцентов

- ***α-интерферон.*** Является белком. Получают из лейкоцитов крови человека, подвергнутых действию вирусов-интерфероногенов.
- ***β-интерферон.*** Является гликопротеином. Получают из культуры клеток фибробластов, обработанных вирусом или 2-х цепочечной РНК.
- ***γ-интерферон.*** Является гликопротеином. Получают из лимфобластов, выделенных от больных злокачественной лимфомой Беркита и стимулированных митогенами.

# Классификация интерферонов по способу получения

- **Природные**, получаемые из культуры клеток лейкоцитов человека, стимулированных вирусами.
- **Рекомбинантные**, продуцируемые бактериями со встроенным геном интерферона.

# **Традиционная технология получения $\alpha$ -интерферона**

- 1. Получение лейкоцитов из свежей донорской крови.**
- 2. Культивирование лейкоцитов в среде, содержащей сыворотку крови, казеин молока и вирус**

**Синдай 16-20 ч.**

- 1. Центрифугирование, снижение рН до 2,5 для инактивации вируса.**
- 2. Осаждение аммония сульфатом интерферона.**
- 3. Хроматографическая очистка и концентрирование.**
- 4. Стандартизация по противовирусной активности.**

# Традиционная технология получения $\beta$ -интерферона

Культивирование фибробластов  
поверхностным методом на питательной среде  
с добавлением интерфероногенов  
(двухцепочечной РНК) и антибиотика  
актиномицина Д.

Выход 1 мг на 10 л культуральной жидкости.

Культура клеток живет 2-ое суток.

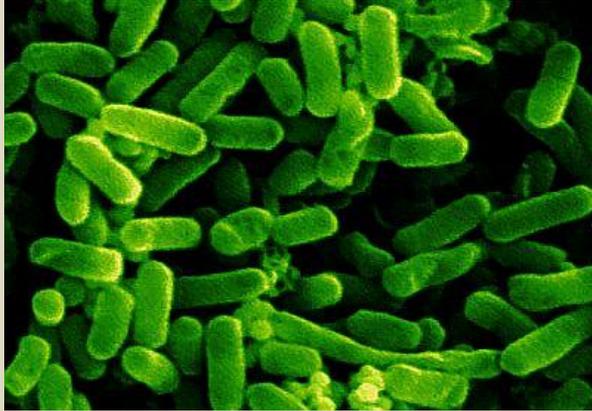
# Традиционная технология получения $\gamma$ -интерферона

Культивирование лимфобластов глубинным методом на питательной среде с добавлением интерфероногенов (вируса Синдая), кортикостероидов и 5-бромдезоксимуридина (замедление всех реакций метаболизма клеток).

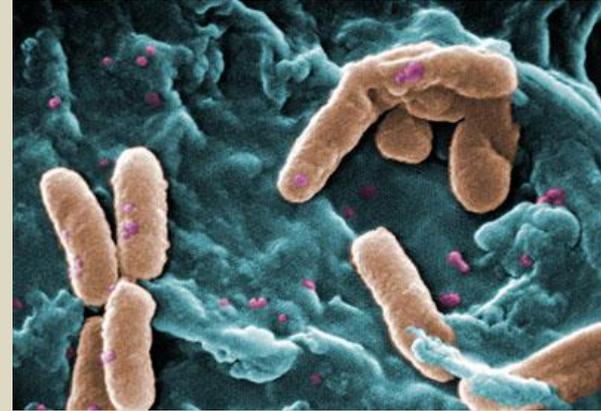
Выход 1 мг на 10 л культуральной жидкости.

Культура клеток живет мало.

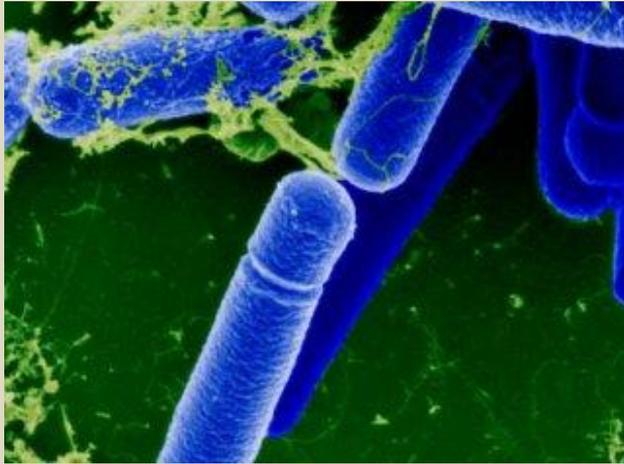
# Рекомбинантные микробы-продуценты интерферонов



**Escherichia coli**



**Pseudomonas aeruginosa**



**Bacillus subtilis**



**Saccharomyces cerevisiae**

## **Технологическая схема получения генно-инженерных интерферонов**

- 1. Синтез интерфероновой иРНК.**
- 2. Получение рДНК, комплементарной интерфероновой иРНК.**
- 3. Встраивание рДНК в плазмиду.**
- 4. Введение векторной плазмиды в клетки *E. coli*.**
- 5. Культивирование бактерий, содержащих векторную плазмиду.**
- 6. Сепарирование клеток *E. coli*.**
- 7. Дезинтеграция и экстракция клеток *E. coli*.**
- 8. Осаждение с центрифугированием.**
- 9. Высаливание интерферона из надосадочной жидкости.**
- 0. Диализ осадка интерферона.**
- 1. Растворение интерферона и пропускание раствора через колонку с иммуносорбентом.**
- 2. Элюация интерферона с последующей хроматографией на целлюлозном катионообменнике.**

# Фирмы-производители:



«Интрон А», «Бетаферон»



«Роферон А»



«Генферон», «Интерферон  
 $\beta$ -1b»



«Гриппферон»

ООО «Ферон»

«Виферон»



«Интерферон  
лейкоцитарный»

**БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ!**