

Биофармацевтика, занятие 7
Полипептидные гормоны.
Инсулин, глюкагон,
соматотропин, гонадотропины

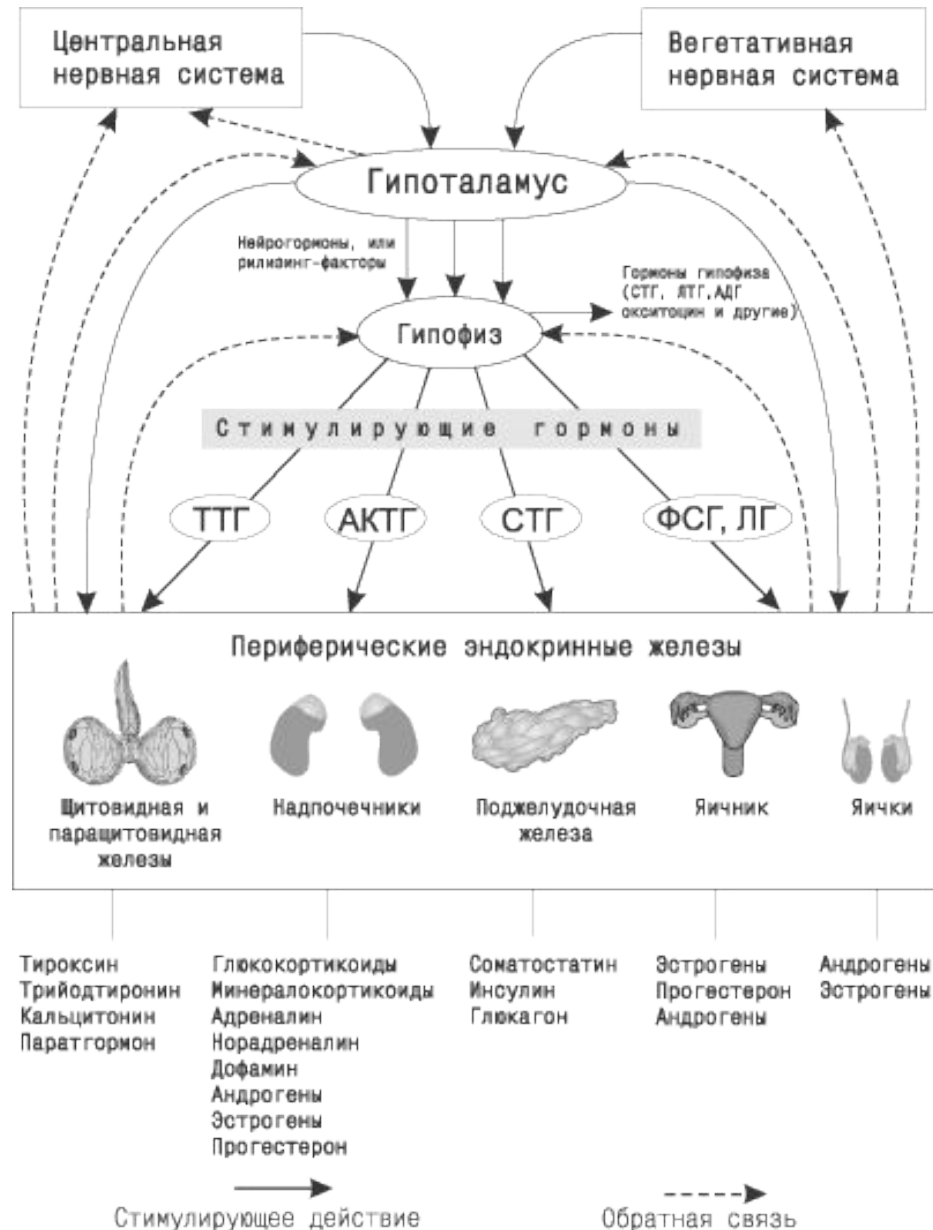
Иван И. Воробьев, к.х.н.
ptichman@gmail.com

МГУ, ФФМ
30.04.13

Гормоны

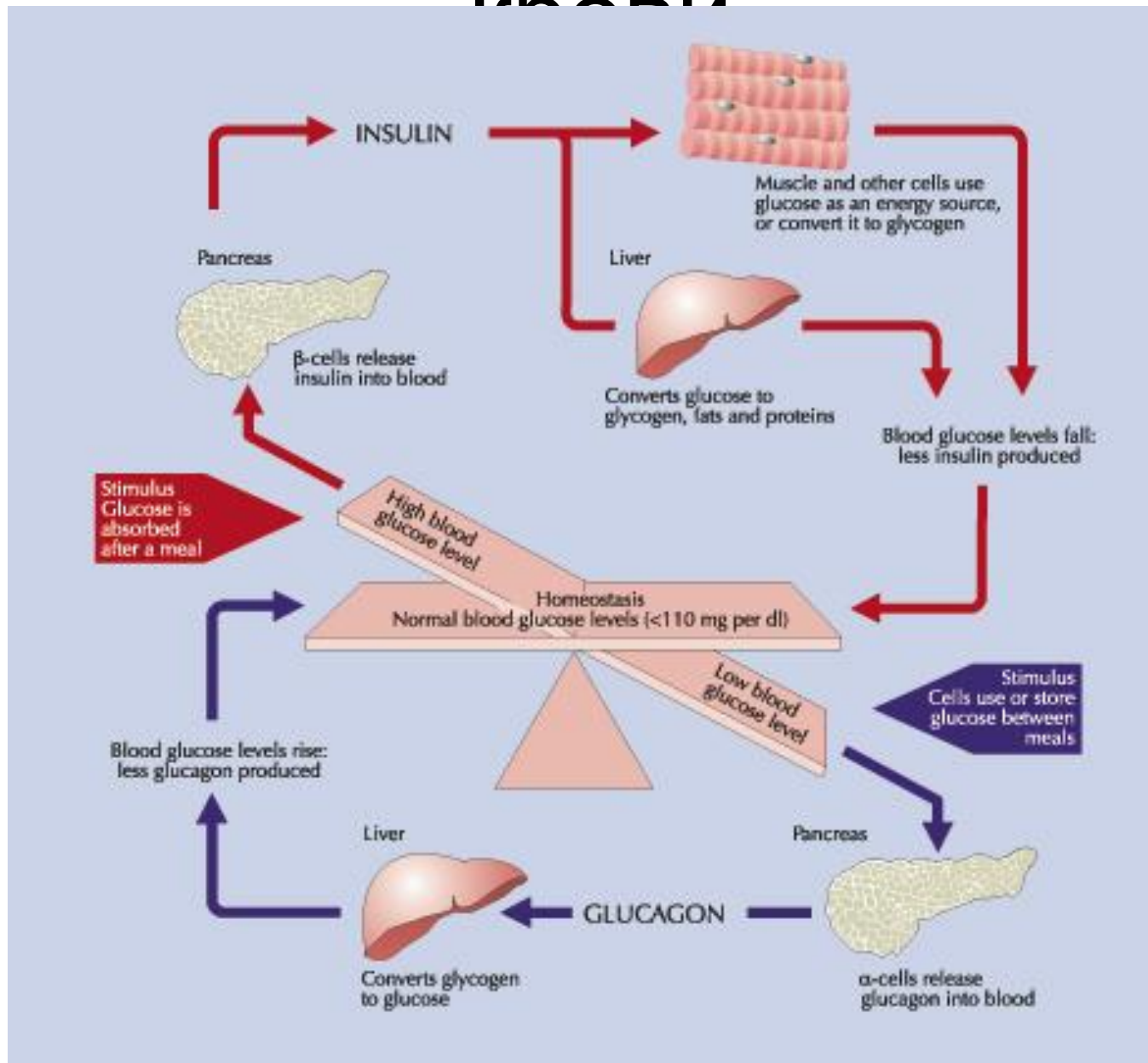
- Гормоны — биологически активные вещества, вырабатываемые в специализированных клетках желёз внутренней секреции, поступающие в кровь и оказывающие регулирующее влияние на обмен веществ и физиологические функции.
- Гормоны служат гуморальными (переносимыми с кровью) регуляторами определённых процессов в различных органах и системах.
- Полипептидные гормоны — белки и полипептиды, выполняющие функцию гормона.

Эндокринная система



Регуляция уровня глюкозы в

крови



Сахарный диабет тип I

- Вызывается аутоиммунным поражением бета-клеток поджелудочной железы, причины развития аутоиммунной реакции неясны, есть генетическая предрасположенность, связанная с многими несвязанными между собой маркерами
- Обычно возникает в детстве, частота 0,1-0,3%
- Требуется постоянной заместительной терапии препаратами инсулина
- МКБ-9 250.01

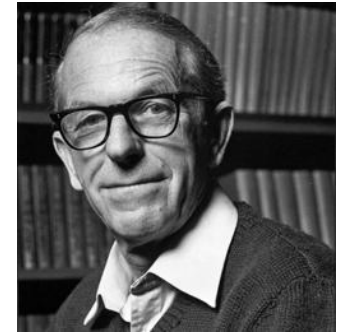
Сахарный диабет тип 2

- Инсулин производится в нормальных количествах, нарушается механизм взаимодействия инсулина с клетками организма (инсулинорезистентность).
- Есть генетическая предрасположенность, основной фактор предрасположенности - ожирение
- Обычно возникает после 40 лет, частота 2-12% в зависимости от популяции
- Инсулин используется как последняя линия терапии
- МКБ-9 250.02

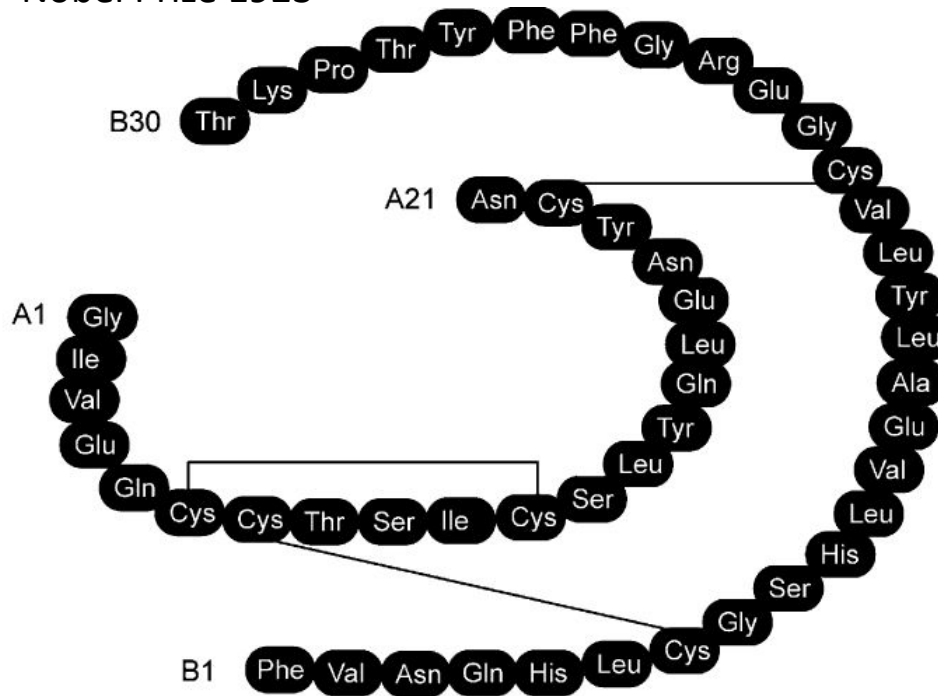


John McLeod
Nobel Prize 1923

Insulin

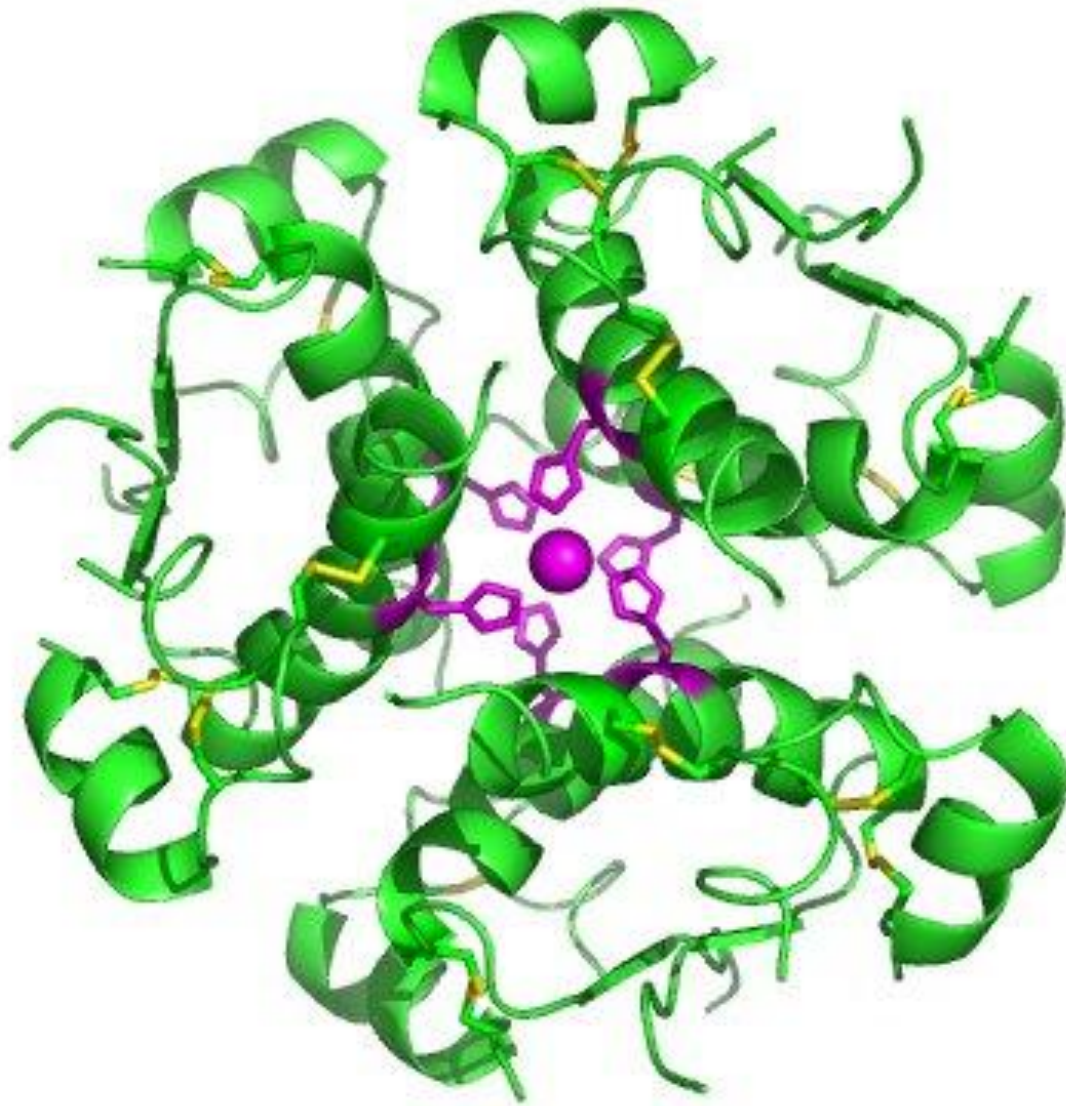


Frederick Sanger
Nobel Prize 1958

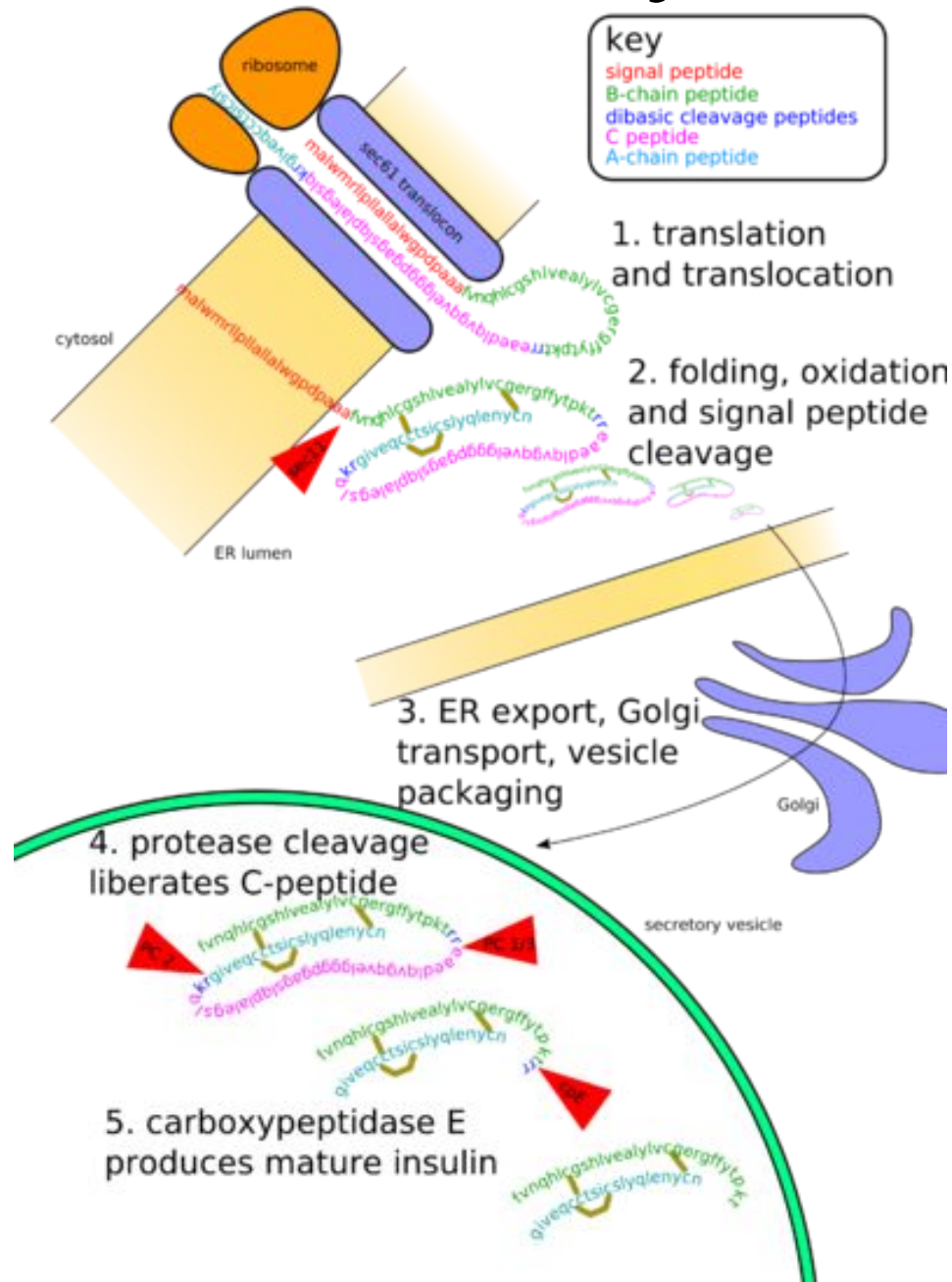


- Polypeptide hormone, 7700 Da.
- Produced by β -cells in pancreas.
- Discovered in 1921 by the group of John McLeod.
- Successfully used for human therapy in 1922, manufactured at large scale in 1923.
- Structure determined by Frederick Sanger in 1955.
- First recombinant protein drug (Eli Lilly, Genentech).

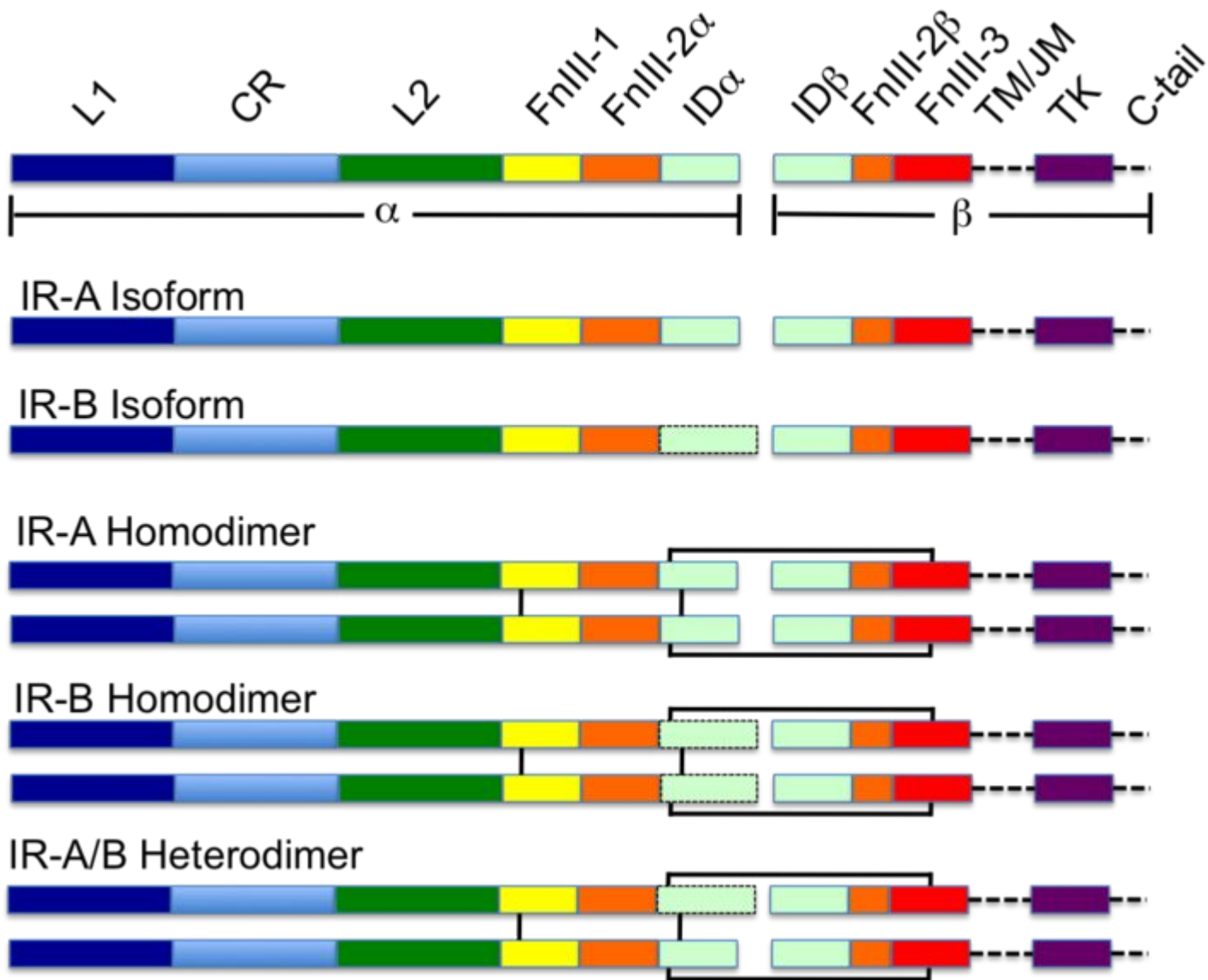
Структура молекулы инсулина



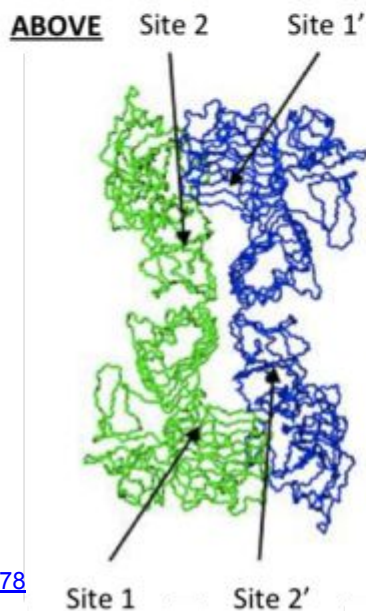
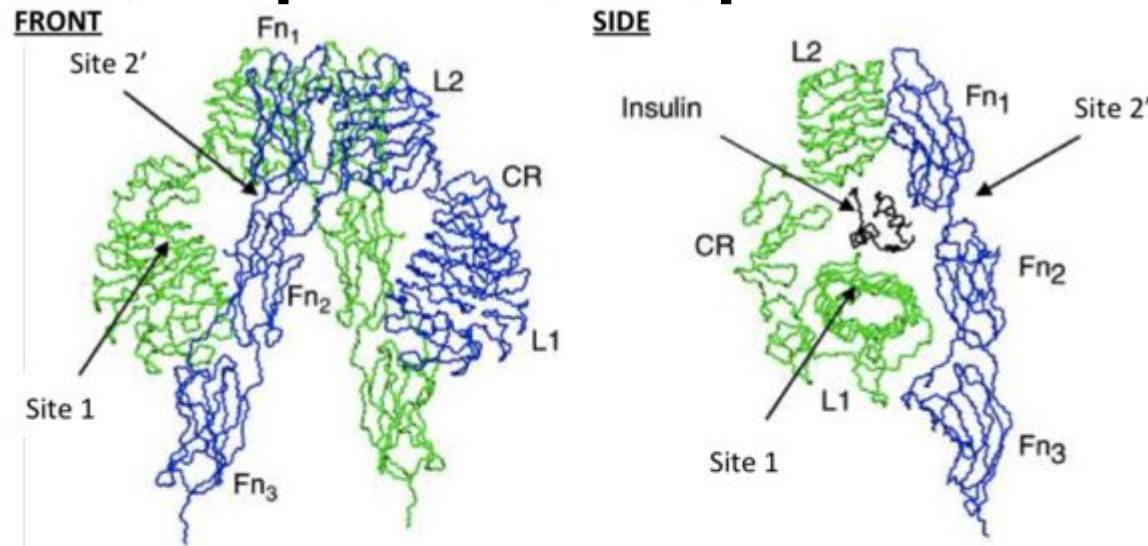
Биосинтез инсулина



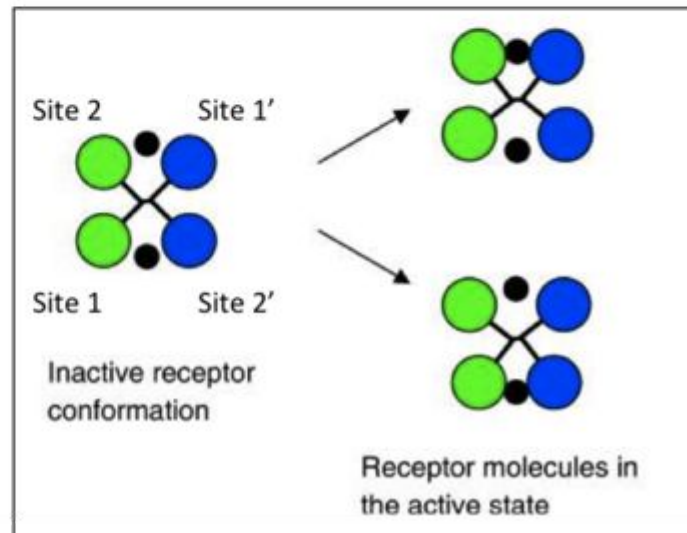
Рецептор инсулина



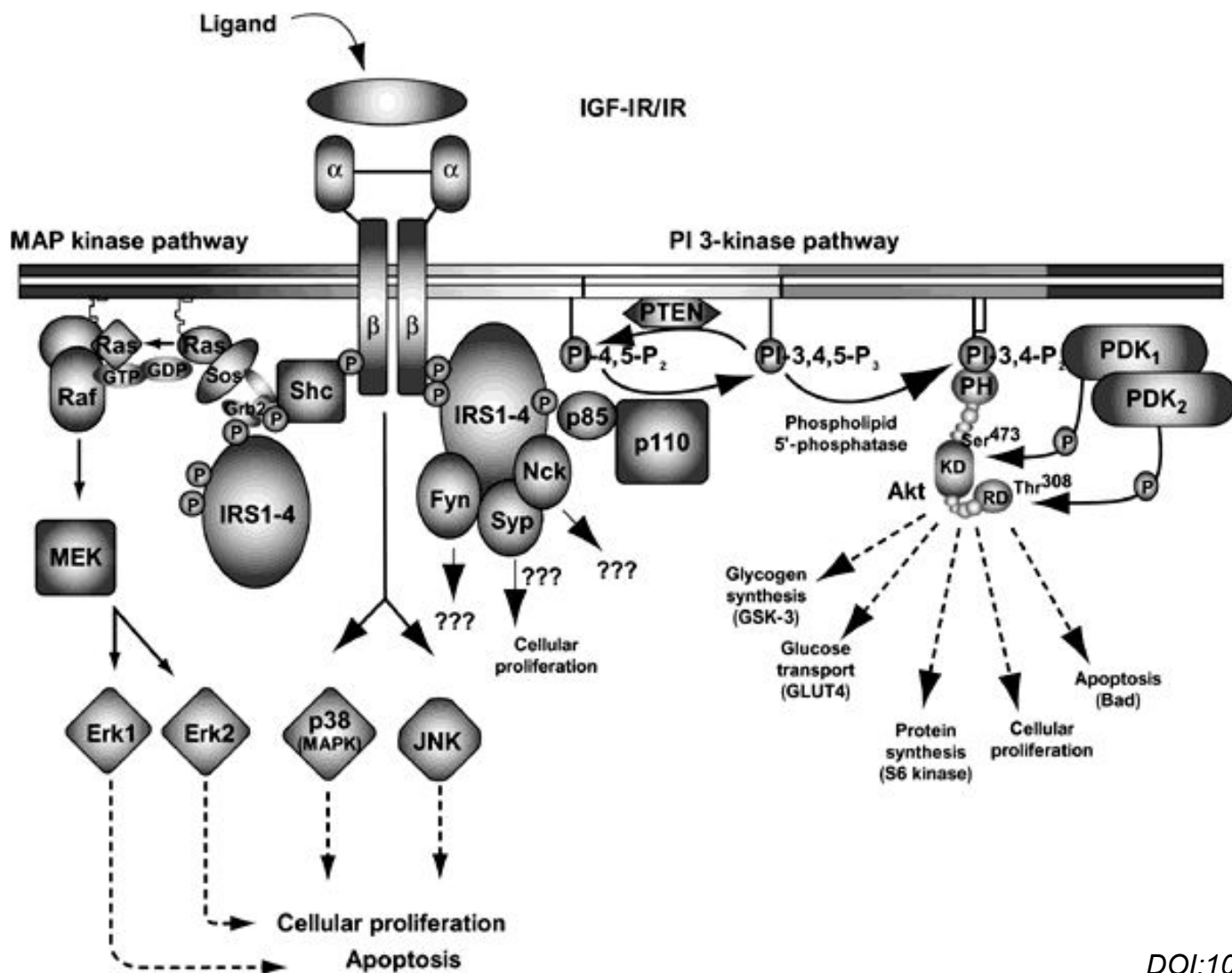
Комплекс инсулина с рецептором



ACTIVATION SCHEME



Пути передачи сигнала от рецептора инсулина



DOI:10.1159/000063469

Common transduction cascades activated by the IGF-I and insulin receptors (IGF-IR and IR, respectively). Activation of the IR or IGF-IR kinase results in receptor autophosphorylation and tyrosine phosphorylation of several substrates such as insulin receptor substrate (IRS) proteins and the protein, Shc. Once activated, IRS and Shc serve as docking proteins for Src homology 2 (SH2)-domain containing molecules such as Grb2, the p85 subunit of phosphatidylinositol-3'-kinase (PI 3-kinase), Nck, Syp and Fyn. Grb2 via Sos stimulates the activity of the Ras and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway which involves Raf-1 and extracellular signal-related kinase (ERK)-1/2. The binding of the p85 and p110 subunit of PI 3-kinase to the IRS family generates phospholipids that participate in activation of 3-phosphoinositide-dependent kinase (PDK) 1 and PDK2 and promote membrane translocation of AKT. PDK1 and PDK2 phosphorylate AKT at Ser473 and Thr308 resulting in its activation. Downstream targets of AKT include glycogen synthase kinase (GSK) 3, p70S6 kinase, glucose transporter protein (GLUT) 4, Bad and nuclear targets. AKT activation is regulated by several lipid phosphatases such as the protein tyrosine phosphatase, PTEN, or 5' lipid phosphatases. JNK = Jun kinase; MEK and SEK1 = MAP kinase (MAPK)

Table 11.2 Selected genes whose rate of transcription is altered by binding of insulin to its receptor. In virtually all instances, the ultimate effect is to promote anabolic events characteristic of insulin action. Two-dimensional gel electrophoresis has also pinpointed dozens of proteins of unknown function whose cellular level is altered by insulin

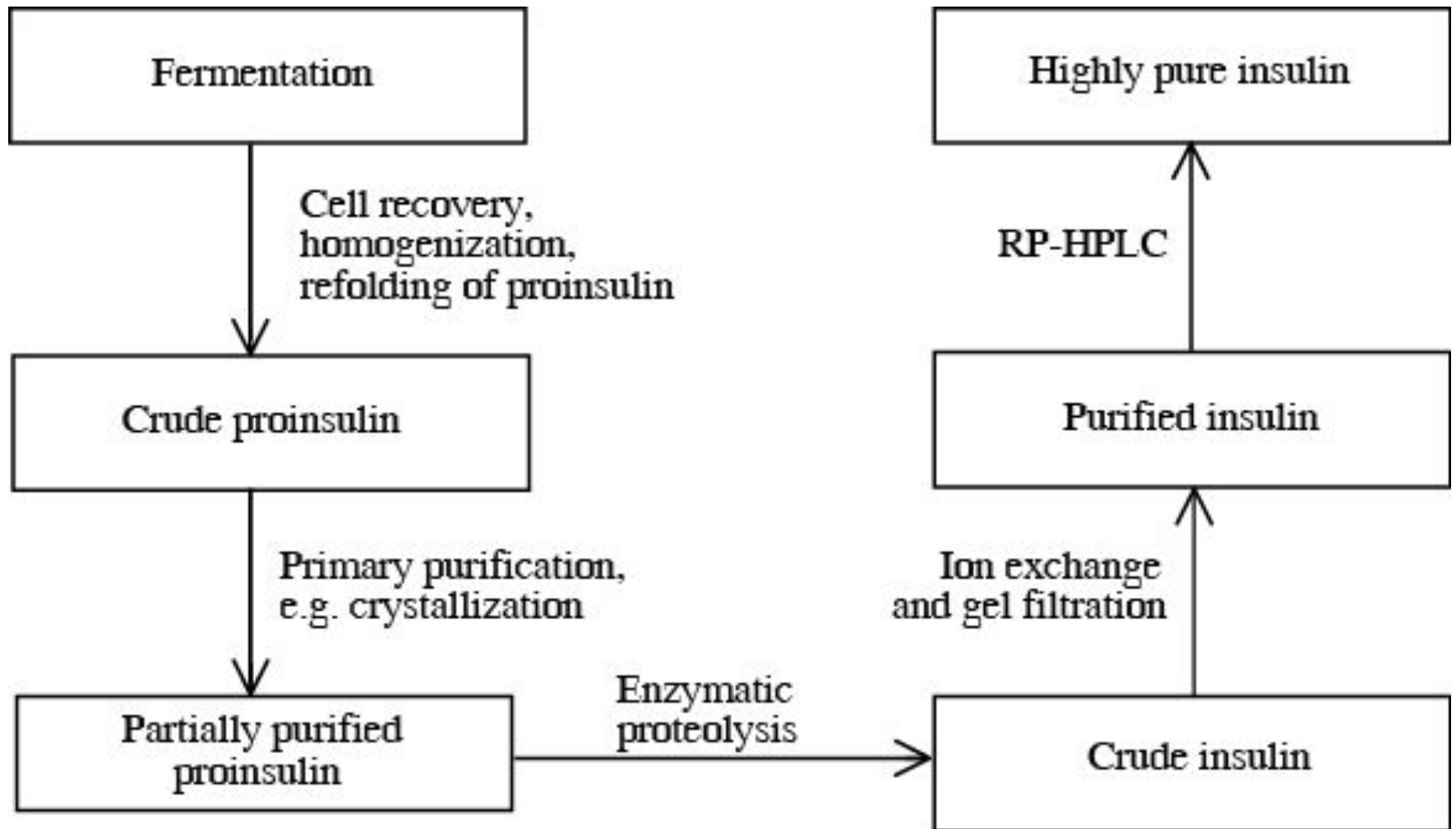
Protein class	Gene product	Insulin effect (\uparrow or \downarrow in transcription rate)
Integral membrane proteins	Insulin receptor	$\uparrow\downarrow$
	GH receptor	\uparrow
	Glucose transporters	\uparrow
Enzymes	Fatty acid synthetase	\uparrow
	Glutamine synthetase	$\uparrow\downarrow$
	Pyruvate kinase	\uparrow
	Fructose 1,6-bis-phosphatase	\downarrow
	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	\downarrow
	Glucokinase	\uparrow
Hormones	IGF-1	\uparrow
	Glucagon	\downarrow
	GH	\downarrow
Transcription factors	C-Myc	\uparrow
	C-Fos	\uparrow
	egr-1	\uparrow

История производства

инсулина

- Исходный способ производства – экстракция из поджелудочных желез быков и свиней, хроматографическая очистка, кристаллизация, смешивание
- Полусинтетический инсулин – отделение Ala30 от B-цепи свиного инсулина и присоединение Thr
- Инсулин crb – отдельная экспрессия цепей инсулина в *E.coli*, очистка цепей, смешивание и рефолдинг
- Инсулин prb – экспрессия проинсулина, удаление C-пептида протеиназами
- Текущий уровень потребления инсулина – около 5000 кг в год

Схема производства инсулина prb





Обращеннофазовая колонна производства NovaSep для финишной очистки инсулина. Объем 180 л, емкость – 1200 г.

Цикл работы включает загрузку полупродукта в кислом водном растворе и градиентную элюцию раствором ацетонитрила и уксусной кислоты. Время цикла – около 1 ч. Основные отделяемые примеси – дезамидированный и окисленный инсулин, Выход стадии более 95%, степень очистки около 5.

Варианты лекарственных форм ИНСУЛИНА

Table 11.4 Some pharmacokinetic characteristics of short, intermediate and long-acting insulin preparations

Category	Onset (hours after administration)	Peak activity (hours after administration)	Duration (h)
Short-acting	0.5–1	2–5	6–8
Intermediate-action	2	4–12	up to 24
Long-acting	4	10–20	up to 36

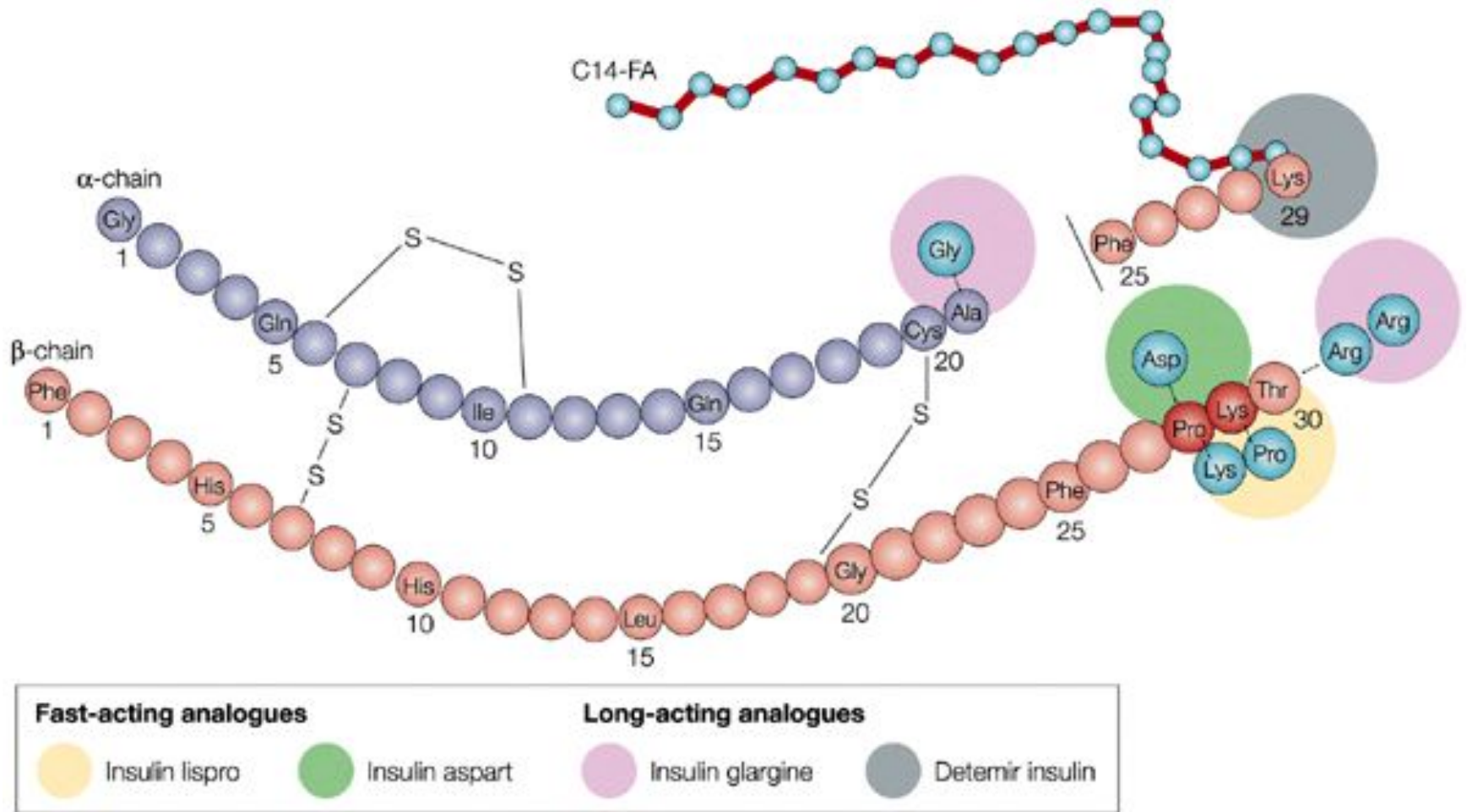
- Короткодействующие инсулины – раствор для п/к или в/м введения
- Долго действующие инсулины – суспензия кристаллов с ионами цинка или комплексы с щелочными полипептидами: протамин-Zn-инсулин и инсулин-изофан

Insulin variants

Recombinant DNA insulin analogue preparations (EU)

Name	Brand name	Manufacturer	Category
Insulin aspart	NovoRapid	Novo Nordisk	Rapid-acting
Insulin glulisine	Apidra	Sanofi-Aventis	Rapid-acting
Insulin lispro	Humalog	Eli Lilly	Rapid-acting
Insulin detemir	Levemir	Novo Nordisk	Long-acting
Insulin glargine	Lantus	Sanofi-Aventis	Long-acting
Aspart/protaminated aspart	NovoMix	Novo Nordisk	Pre-mixed
Lispro/protaminated lispro	Humalog Mix	Eli Lilly	Pre-mixed

Модифицированные варианты инсулина



Глюкагон

- Пептидный гормон 29 а.к., секретируемый альфа-клетками поджелудочной железы
- Антагонист инсулина – вызывает увеличение уровня глюкозы
- Показания – тяжелая гипогликемия, доза – 1 мг п/к, в/м или в/в.
- Рекомбинантный глюкагон производят при помощи дрожжей *S.cerevisiae*, лекарственная форма – лиофилизат по 1 мг с 49 мг лактозы

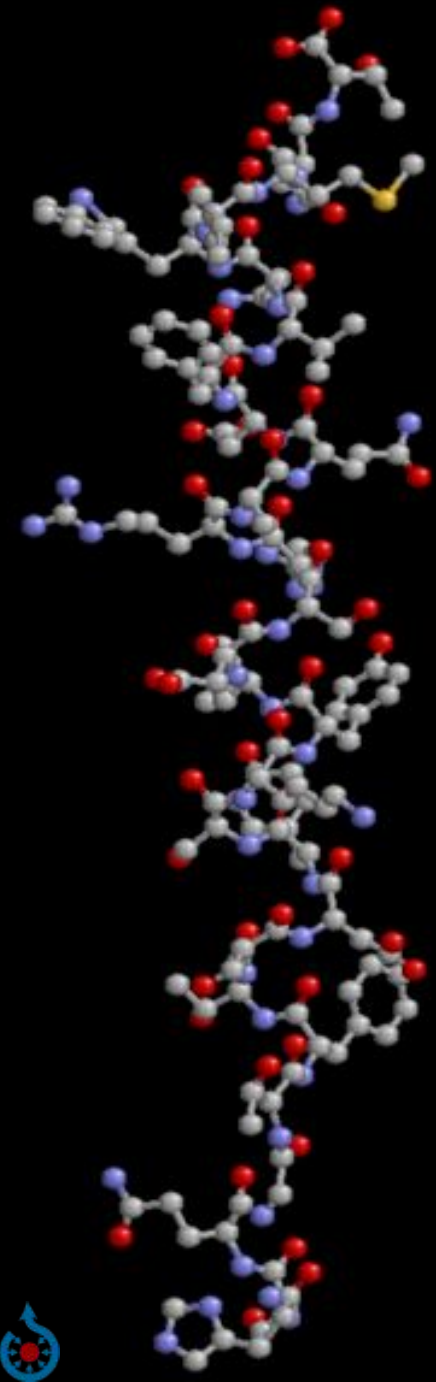
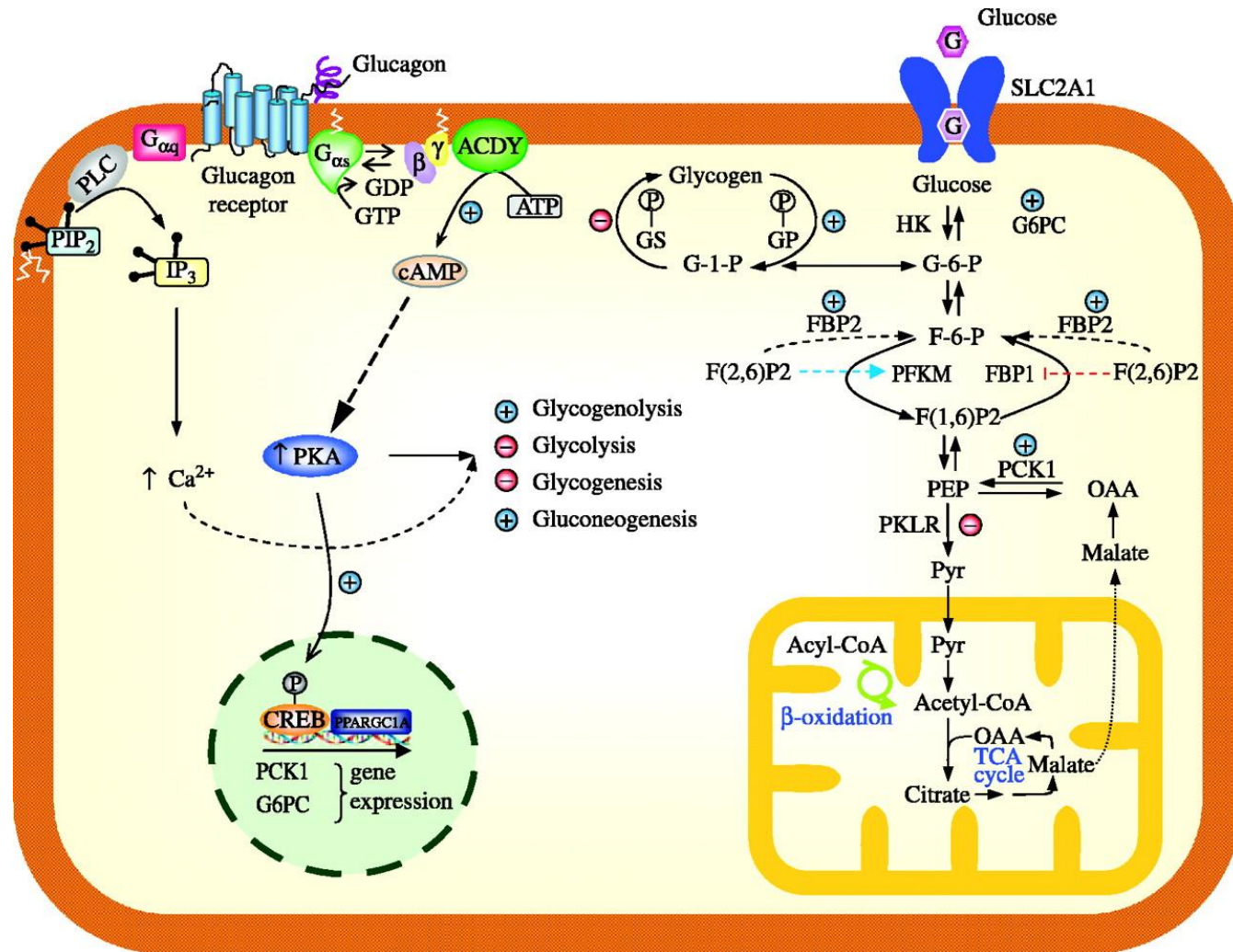


Figure 4 The role of glucagon and the glucagon receptor in the liver.



Quesada I et al. J Endocrinol 2008;199:5-19

Гормон роста человека

(соматотропин)

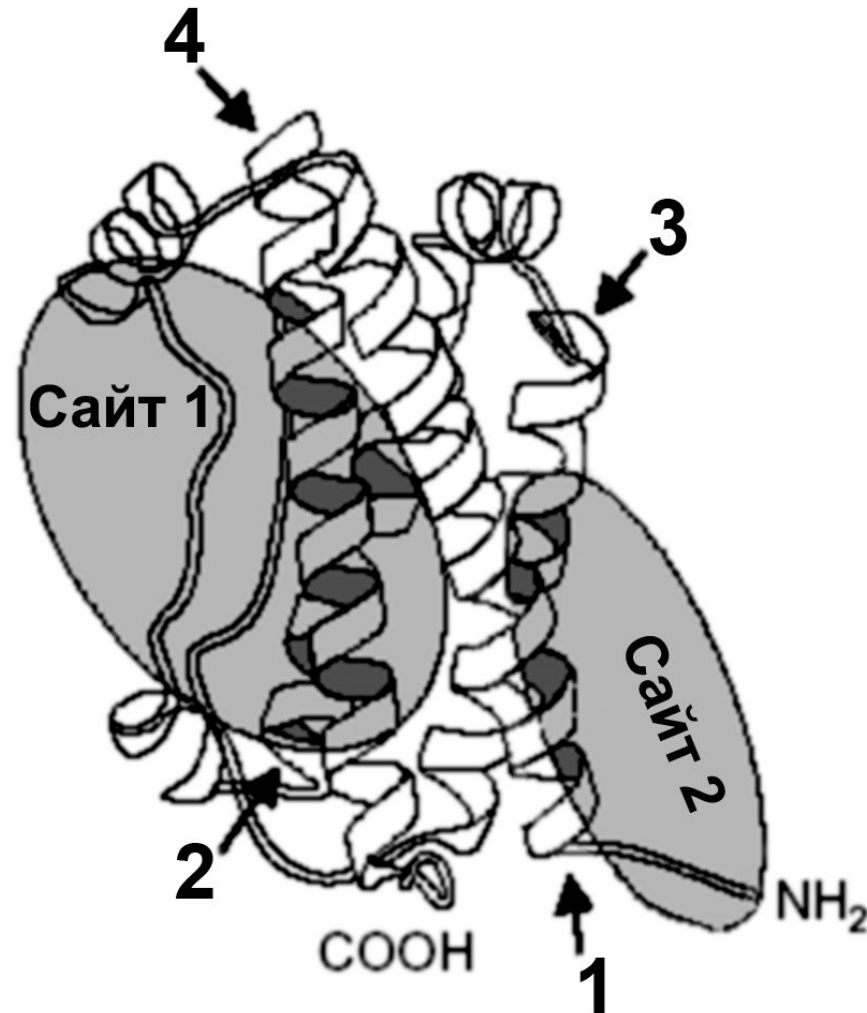


Рис. 2. Пространственная структура ГРЧ. Цифрами указаны номера основных альфа-спиральных участков. Сайт 1 и сайт 2 – соответствующие сайты взаимодействия ГРЧ с рецепторами.

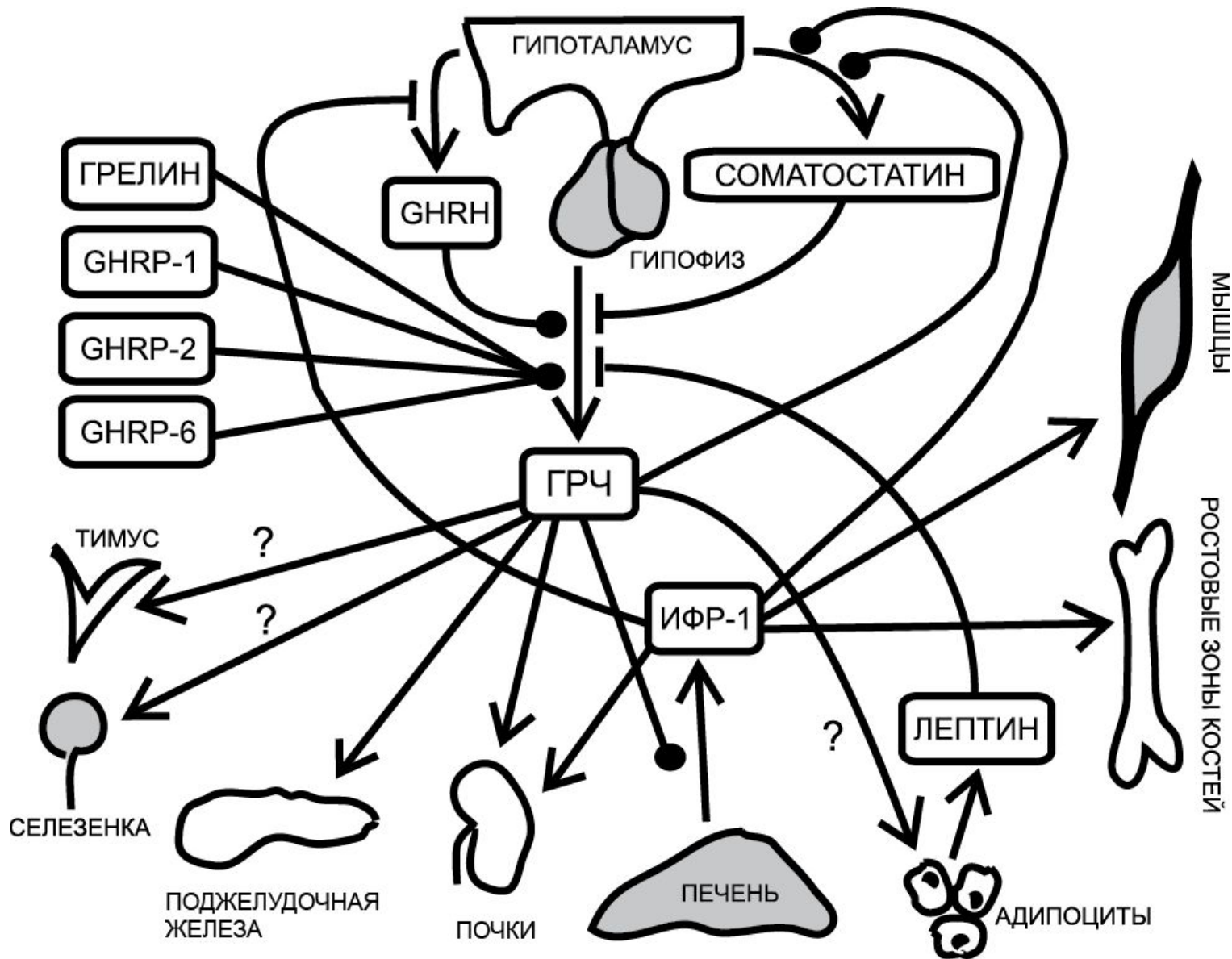


Рис. 3. Схема сети гормональной регуляции, связанной с ГРЧ. Активация секреции соответствующих гормонов обозначена кружком, ингибирование – вертикальной чертой.

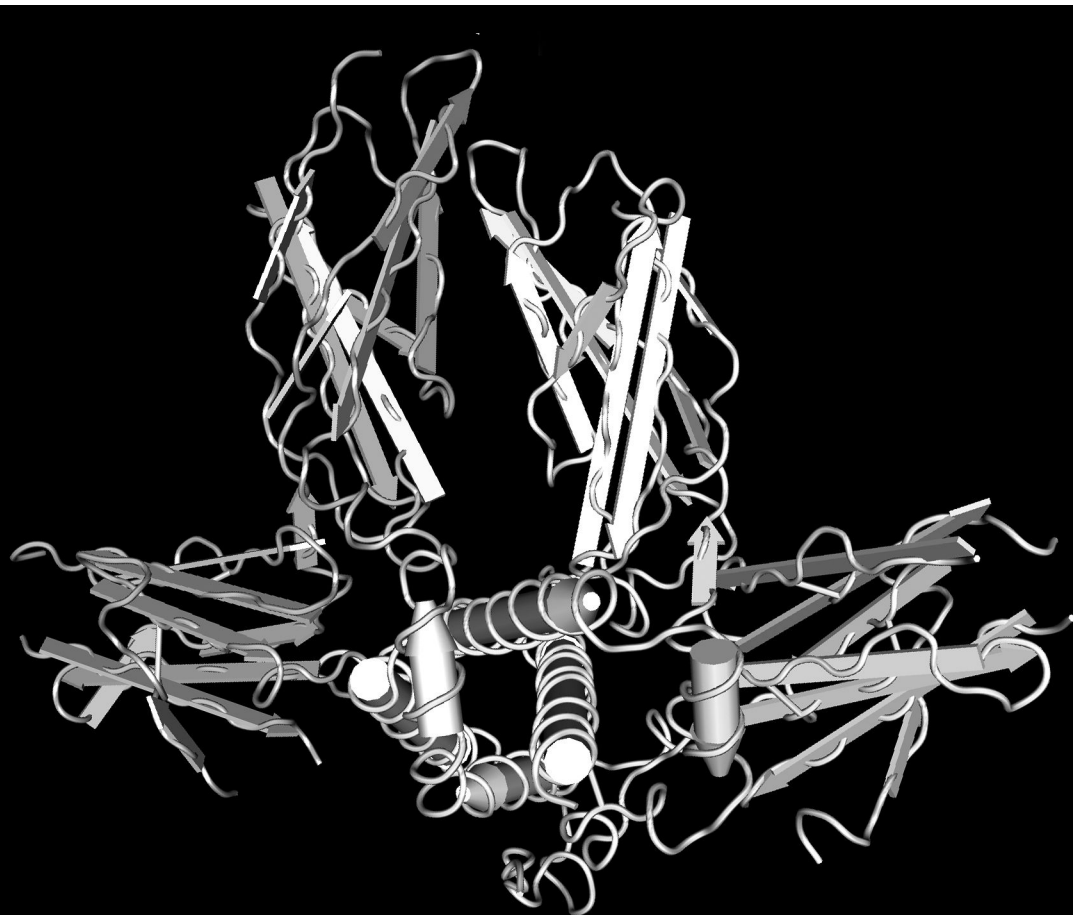
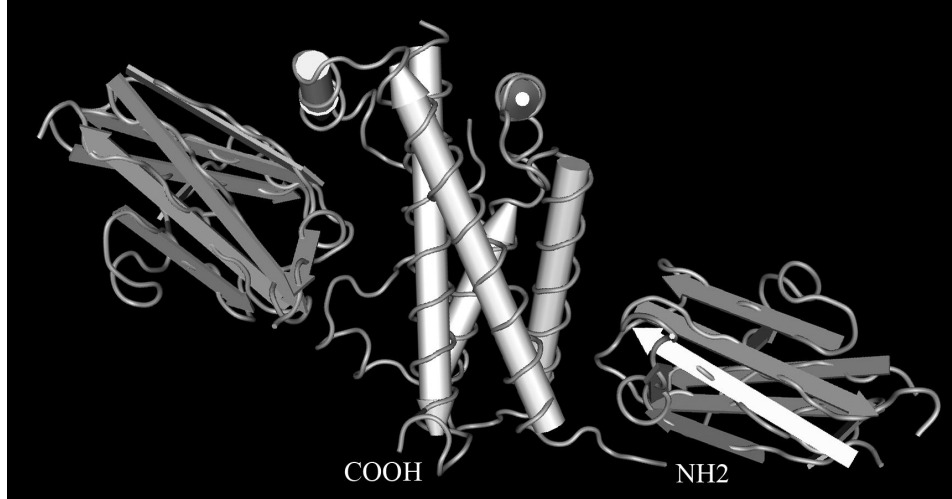
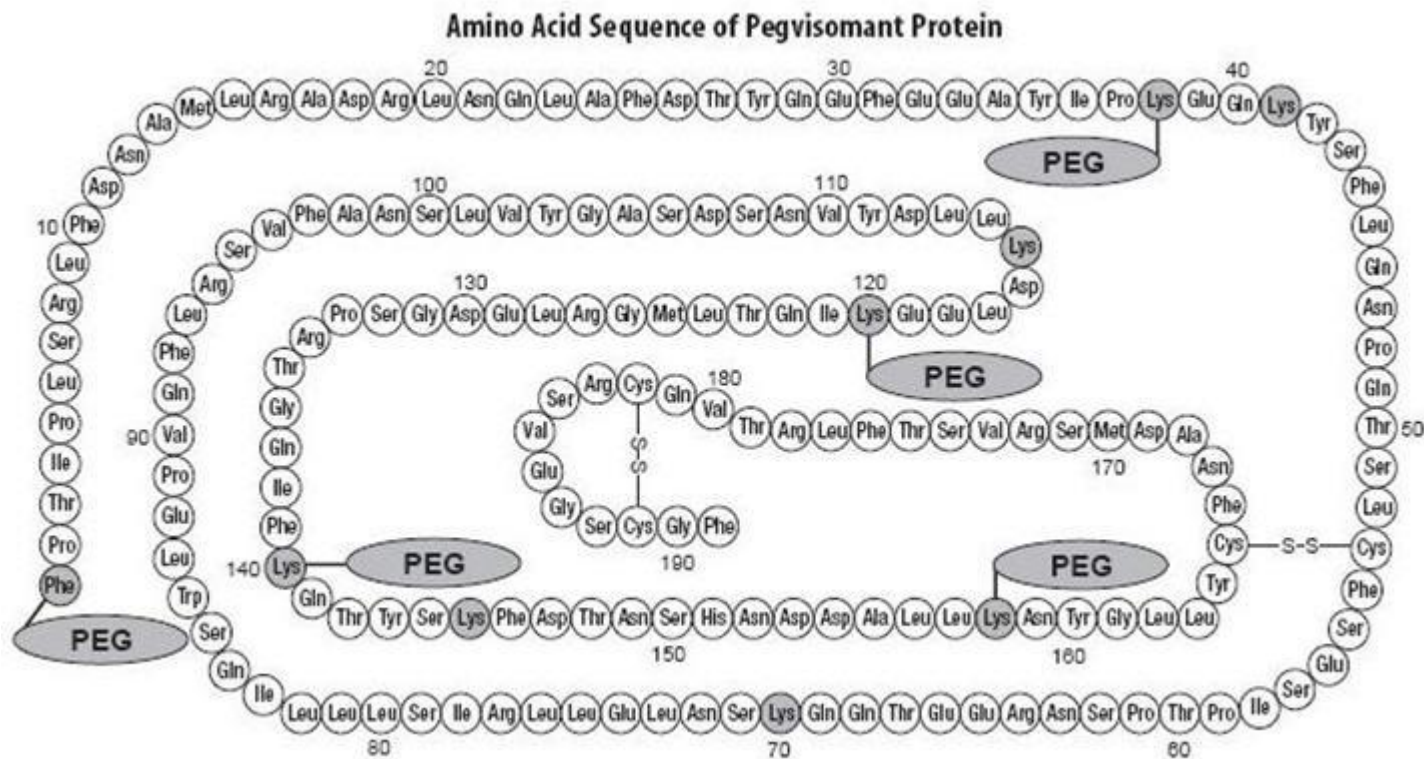


Рис. 4.
Пространственная структура комплекса ГРЧ-ГРЧР 1:2.
А – проекция, приближенная к рис. 2, С-концевые домены внеклеточных участков ГРЧР удалены. Обозначены N- и С-концы ГРЧ. Б – проекция вдоль оси пучка альфа-спиралей ГРЧ. N- и С- концы ГРЧ удалены от наблюдателя, сайт 1 находится справа.

Антагонисты соматотропина

- Пегвисомант (Сомаверт) – антагонист рецептора ГРЧ для терапии акромегалии, лиофилизат 10, 15, 20 мг



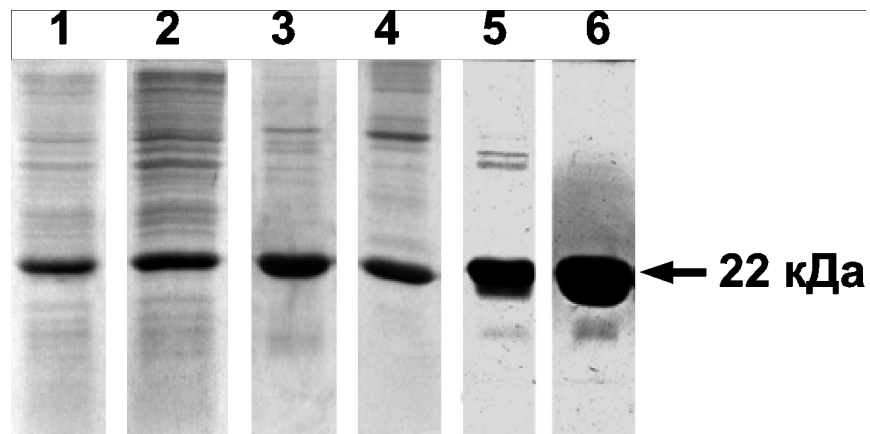
Метаболические эффекты соматотропина

Терапевтическое применение соматотропина

- Основные показания – гипофизарный нанизм (~1:5000), синдром Шерешевского-Тернера, хроническая почечная недостаточность
- Применение – 1-2 мг/м²/д до достижения нормального роста.
- Лекарственные формы – лиофилизат или раствор для в/м или п/к инъекций.
- Способы получения – *E.coli*, *S.cerevisiae*, СНО

Гормон роста человека – «Растан»

Примененные методы	Достигнутые показатели
Синтетический ген, оптимизированный для E.coli B и плазмидный вектор с промотором T7lac	продуктивность биосинтеза >0,3 г/л при культивировании в колбах, >1 г/л в ферментере
Многопараметрический анализ процесса рефолдинга	выход стадии >70%
Ферментативное отделение N-концевого остатка метионина	<0,5% остаточного Met[-1]pГРЧ
Трехстадийная хроматографическая очистка	Выход готового продукта >40%; <3 нг/мг остаточных белков E.coli



Анализ в 12% ДСН-ПААГ биосинтеза, выделения и очистки pГРЧ. Дорожки 1, 2 – тотальный белок E.coli BL21(DE3)/pES1-6 после двух часов индукции 1 мМ ИПТГ при первом и шестом последовательных пассажах культуры. Дорожка 3 – очищенные тельца включения; дорожка 4 – [Met-1]pГРЧ после рефолдинга; дорожка 5 - [Met-1]pГРЧ после анионообменной хроматографии; дорожка 6 – полностью очищенный pГРЧ. Окраска Кумасси синим.

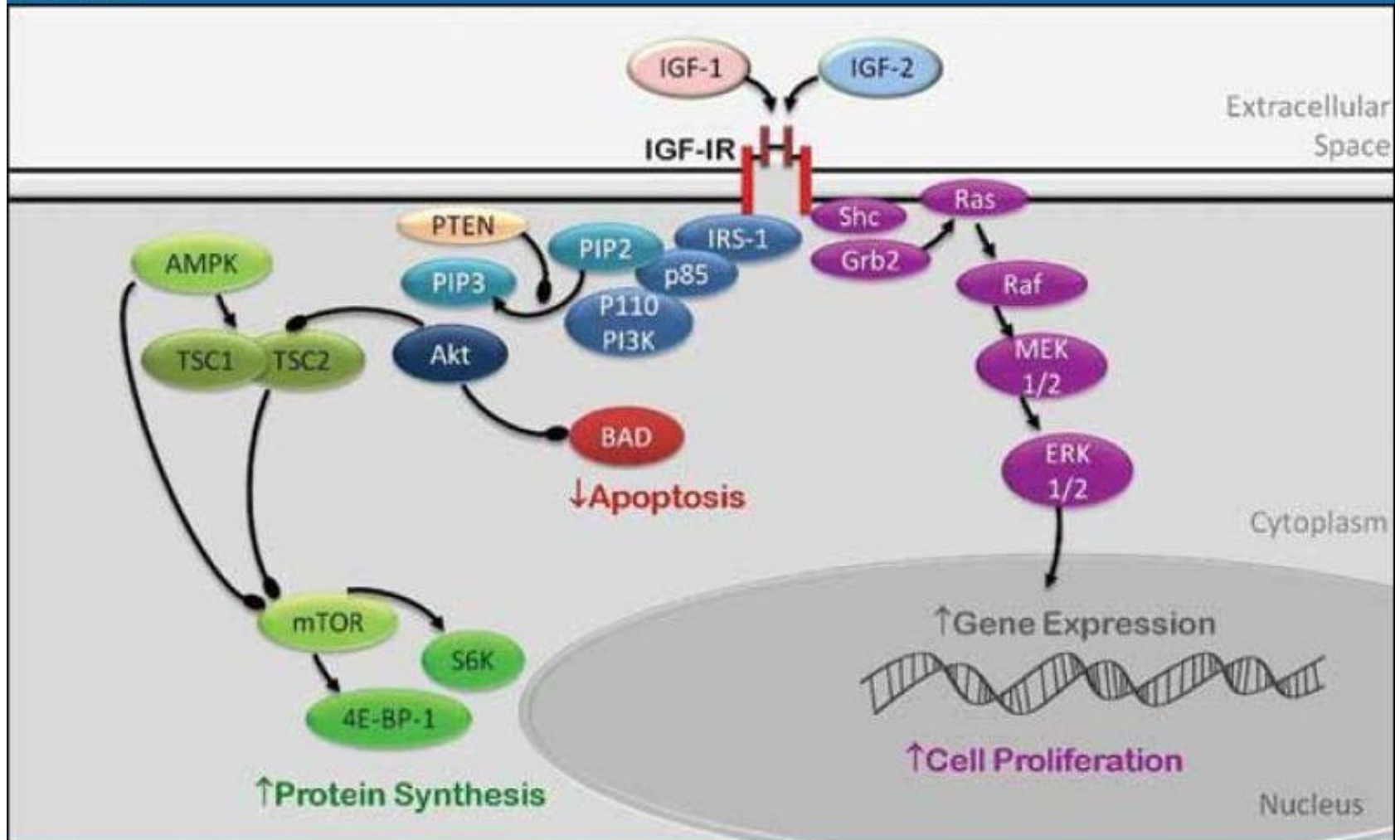


Инсулиноподобный фактор роста

- ИФР-1, соматомедин. 70 аа в одной цепи с тремя дисульфидными связями, 7,6 кДа
- Основной эндокринный посредник соматотропина
- Синтезируется гепатоцитами в ответ на активацию рецептора соматотропина, обеспечивает физиологические эффекты соматотропина в большинстве тканей
- Обеспечивает обратную связь с гипоталамусом и гипофизом – недостаток ИФР-1 стимулирует выработку соматотропин-рилизинг-гормона, избыток - соматостатина

Рецептор ИФР-1

Medscape



Лекарственные средства ИФР-1

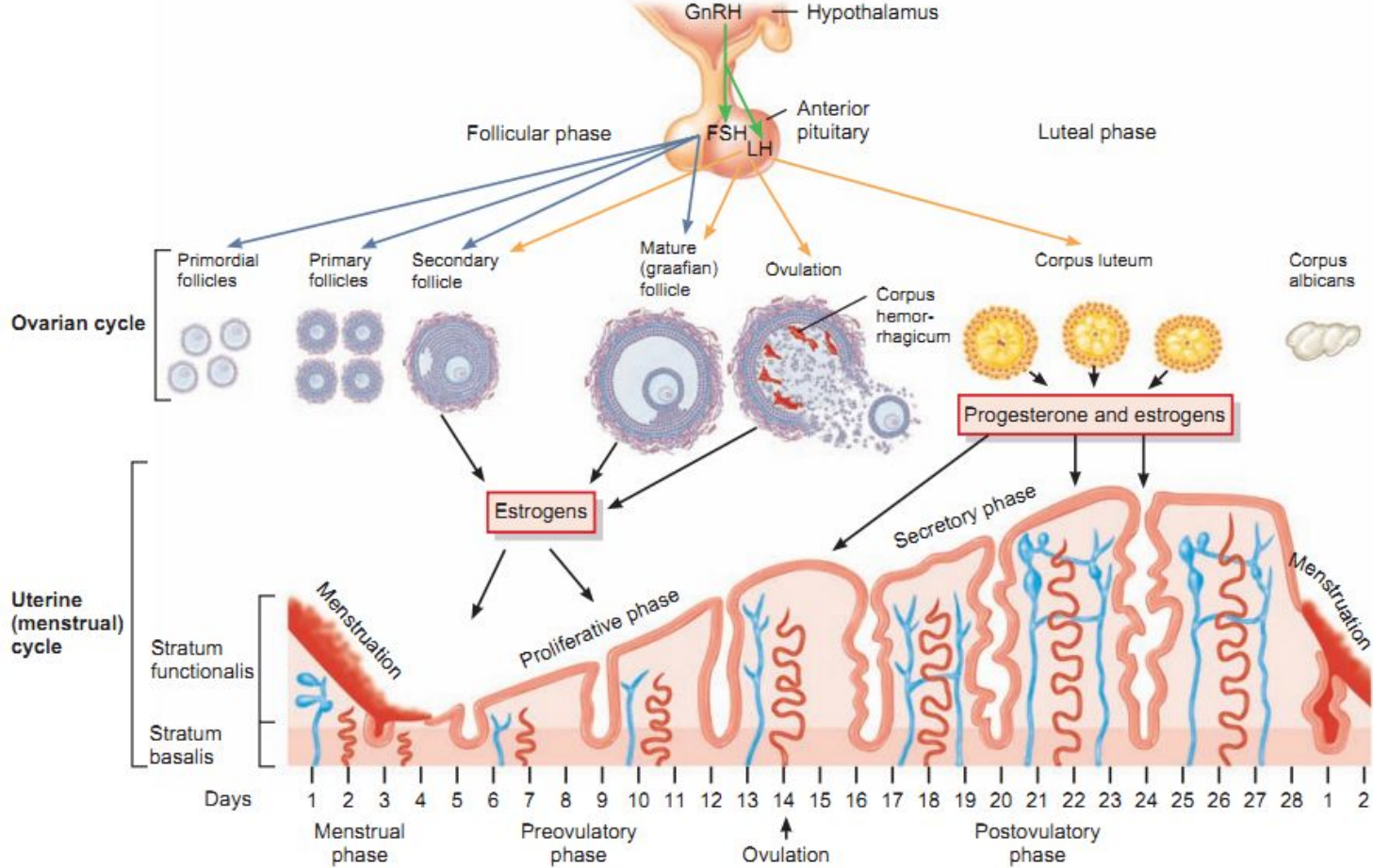
- 2 варианта ИФР-1 – Myotrophin и Increlex
- Increlex – многодозовый флакон с раствором для п/к применения, 10 мг/мл
- Показания – задержка роста у детей с дефицитом ИФР-1, делеция гена соматотропина и нейтрализующие антитела к соматотропину
- Дозировка – 40-80 мкг/кг два раза в день до достижения нормального роста

ИФР-1 связывающие белки

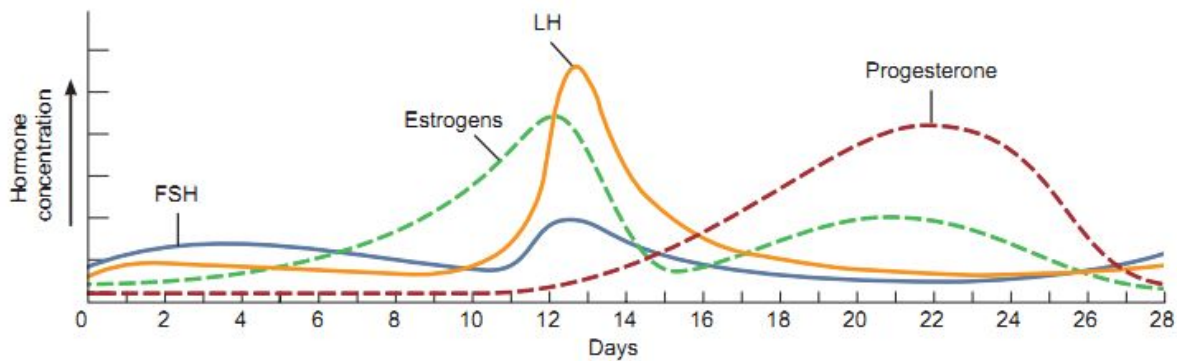
- IGFBP (Insulin-like growth factor-binding protein), 7 генов, основной – IGFBP-3, от 24 до 45 кДа
- Связывают практически весь ИФР-1 и ИФР-II, в том числе в печени
- Комплекс ИФР-1 со связывающим белком лучше узнается рецептором, в разных тканях активны различные IGFBP
- Лекарственное средство Mecasermin rinfabate (IPLEX) – комплекс ИФР-1 и IGFBP-3
- Позволяет уменьшить гипогликемические проявления ИФР-1, показания - амиотрофический латеральный склероз

Семейство гонадотропных гормонов

- Фолликулостимулирующий гормон – **ФСГ, FSH**
- Лютеинизирующий гормон – **ЛГ, LH**
- Хорионический гонадотропин – **ХГ, CG**
- Ранее к гонадотропинам причисляли пролактин
- ФСГ и ЛГ вырабатываются гипофизом, ХГ - плацентой



(a) Hormonal regulation of changes in the ovary and uterus



(b) Changes in concentration of anterior pituitary and ovarian hormones

Фолликулостимулирующий гормон

- ФСГ, ЛГ и ХГ – гетеродимеры, содержат общую альфа-цепь 92 аа и специфические бета-цепи около 110 аа, обе цепи N-гликозилированы, по 2 олигосахарида на цепь
- Рекомбинантный ФСГ получают в клетках CHO, путем экспрессии двух отдельных генов
- Лекарственные средства – фоллитропин альфа, фоллитропин бета
- Лекарственные формы – лиофилизат и картриджи для шприц-ручек с раствором 80 мкг/мл для п/к или в/м введения
- Типичный курс терапии при стимуляции овуляции – 5-20 доз по 15-25 мкг ежедневно

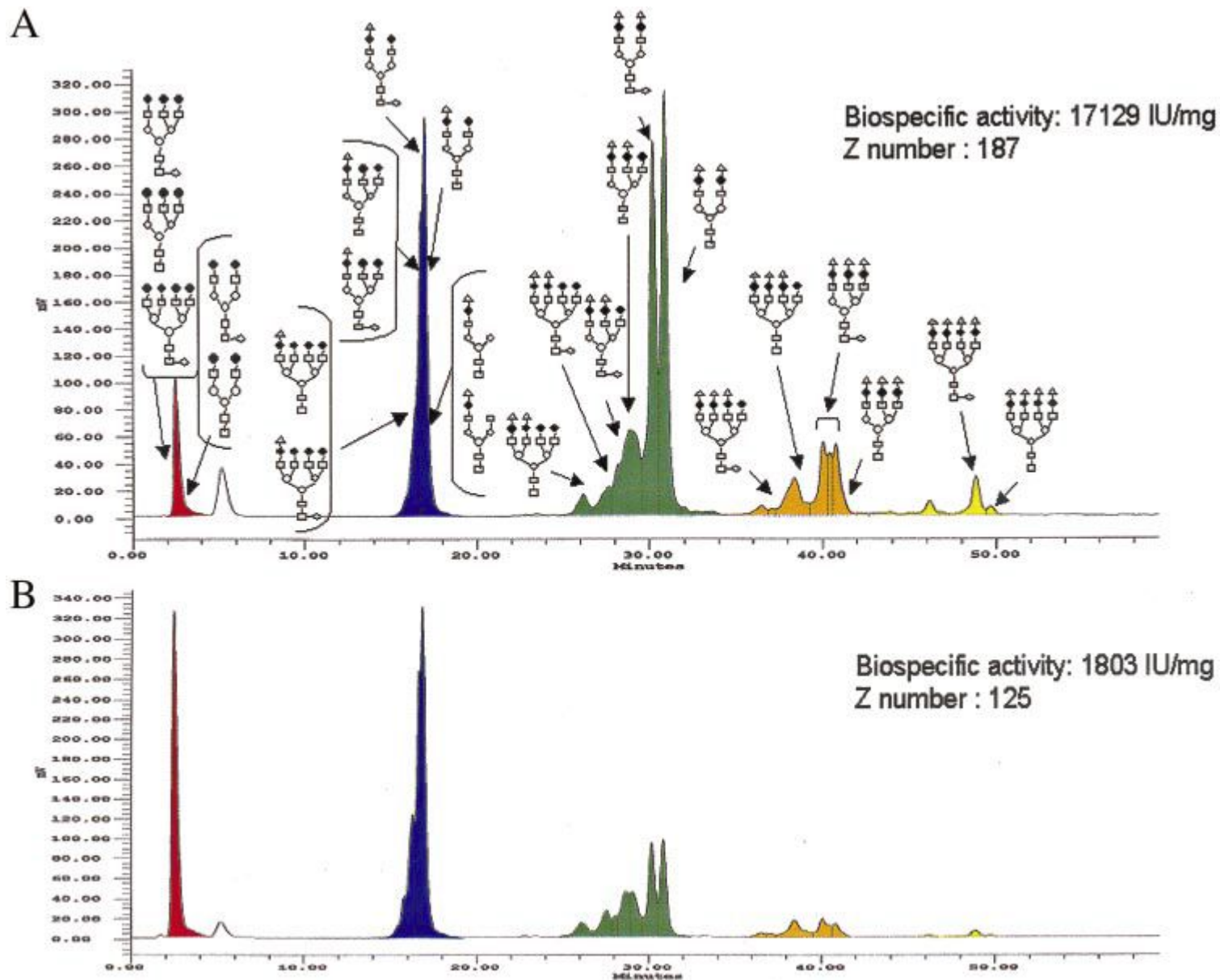
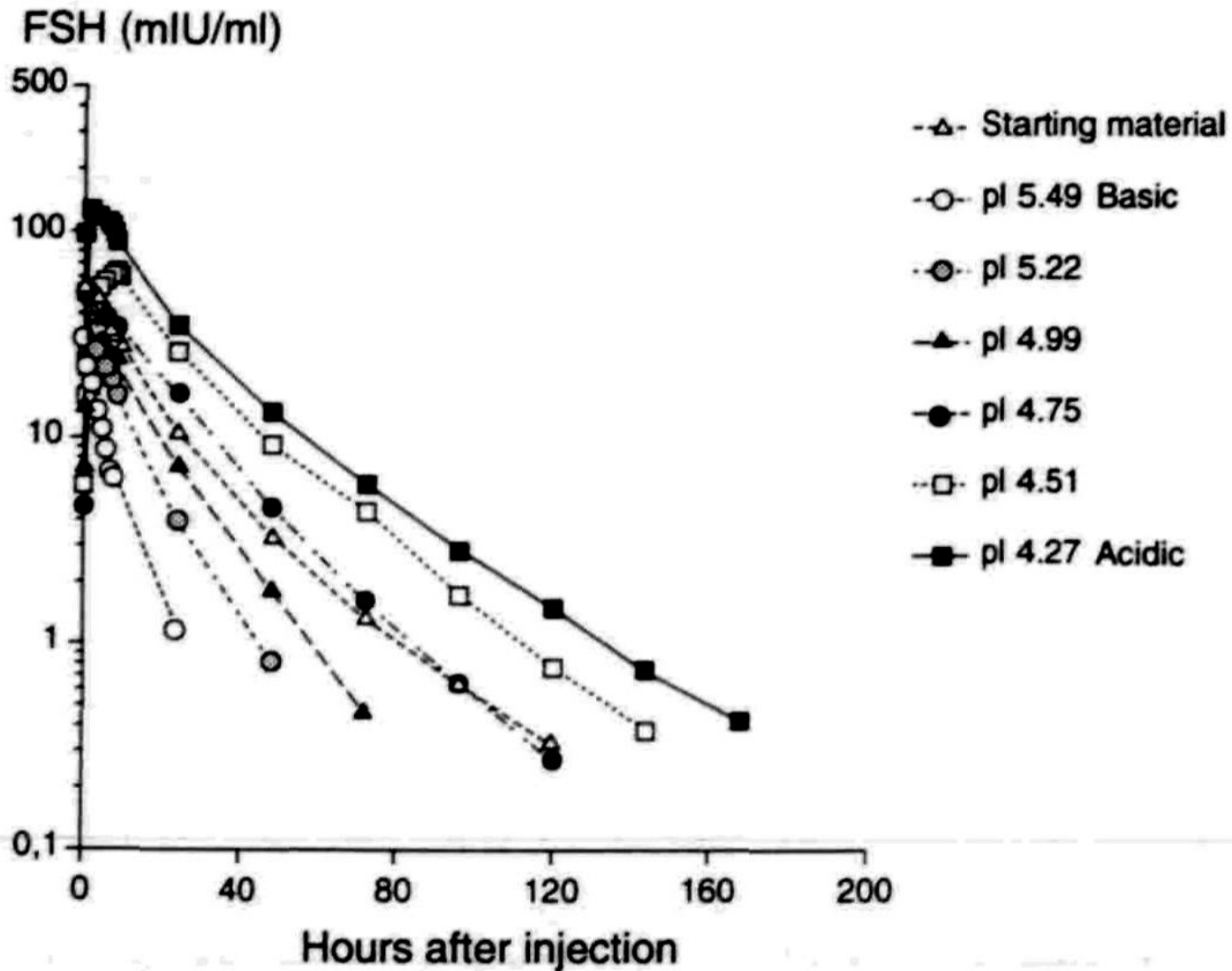


Fig. 3. Separation of the N-glycans of r-hFSH by HPAEC. Evidences of differences in sialylation levels for two r-hFSH batches with different biospecific activities: (A) r-hFSH batch with a high biospecific activity; (B) r-hFSH batch with a low biospecific activity. Triangles.sialic acid; closed circles.galactose; closed squares.N-acetylgalactosamine; open squares.N-acetylglucosamine; open circles.mannose. The attribution of the glycan structures to the peaks is deduced from MALDI-TOF mass spectra.

Индекс заряда гликанов

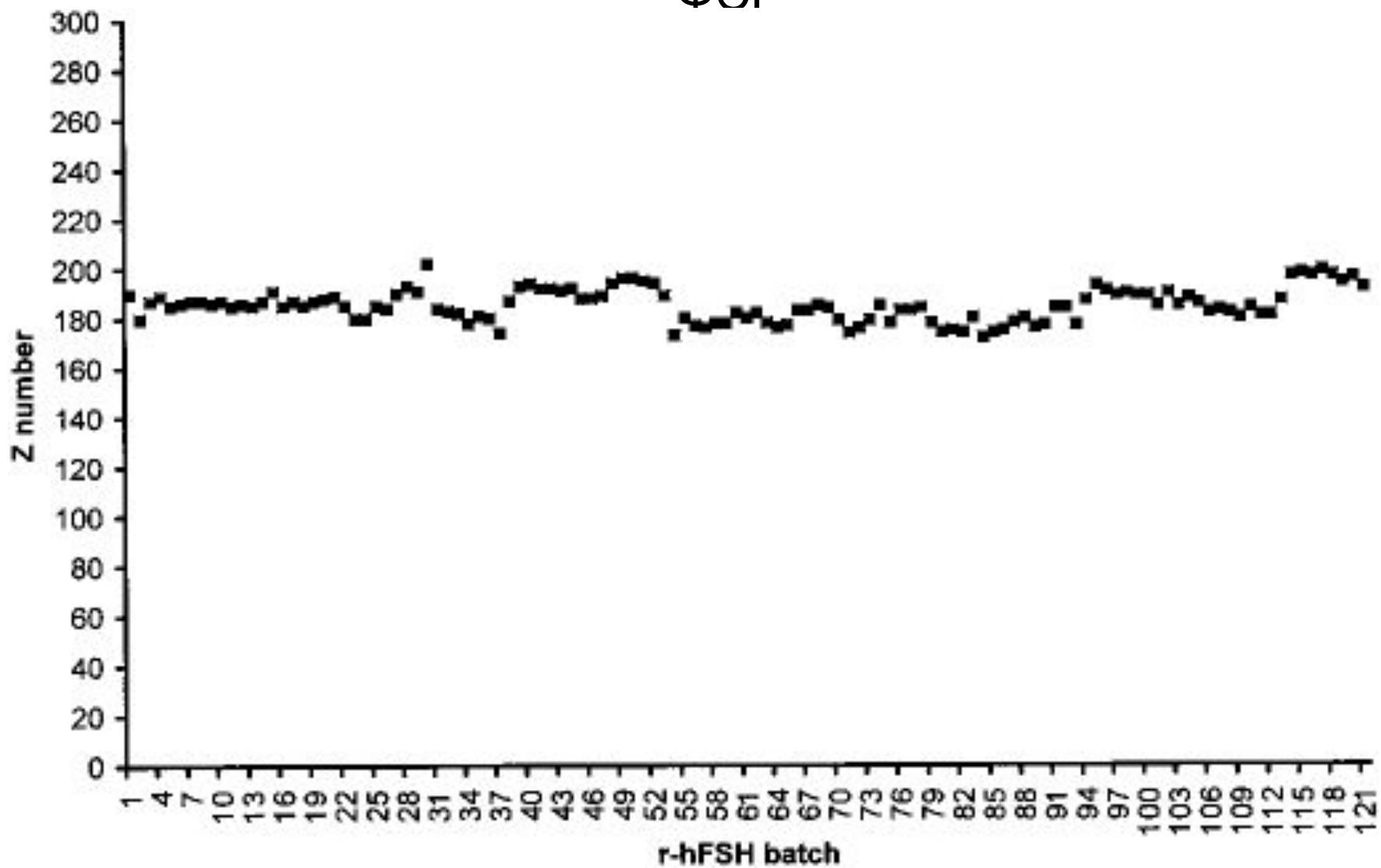
- $$Z = A_{(neutral)} * 0 + A_{(mono)} * 1 + A_{(di)} * 2 + A_{(tri)} * 3 + A_{(tetra)} * 4 + A_{(penta)} * 5.$$

- Для ФСГ очень высокий Z – низкая биоактивность, большое время полувыведения
- Средний Z – высокая биоактивность, малое время полувыведения
- Низкий Z – низкая биоактивность, малое время полувыведения



Plasma concentrations of immunoreactive follicle stimulating hormone (FSH; IU/1) in Beagle dogs (n = 2) after single i.m. injection of rFSH isohormone fractions with pi's ranging from 4.27-5.49 and starting material at a dose level of 20 IU/kg in terms of FSH immunoreactivity determined by FSH-enzyme immunoassay.

Постоянство индекса заряда гликанов рекомбинантного ФСГ



Следующее занятие 8

Белки системы гемостаза и терапевтические ферменты.

- Каскад свертывания крови, белковые факторы свертывания крови, гемофилия, витамин К-зависимые белки, методы вирус-инактивации биологических субстанций.
- Каскад фибринолиза, гирудин, АТ-III, тканевой активатор плазминогена, стрептокиназа, урокиназа.
- Каскад свертывания крови и острое воспаление, активированный белок С
- Врожденный дефицит ферментов и острые состояния, требующие терапии ферментами, аспарагиназа, ДНКаза I, глюкоцереброзидаза, галактозидаза, уратоксидаза, супероксид дисмутаза, лактаза