

## Генноинженерный инсулин человека: успехи и перспективы

Д. И. Баирамшвили

ДМИТРИЙ ИЛЬИЧ БАИРАМАШВИЛИ — кандидат химических наук, начальник Опытного биотехнологического производства Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН). Область научных интересов: биотехнологические процессы получения рекомбинантных белков и низкомолекулярных физиологически-активных соединений, методы контроля качества генноинженерных фармацевтических препаратов.

117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10, ИБХ РАН, E-mail bdi@ibch.ru

Инсулин — полипептидный гормон, вырабатываемый β-клетками островков Лангерганса поджелудочной железы [1, 2]. Белковая природа инсулина была определена еще в 1928 г., однако его первичная структура была расшифрована только к 1955 г. в лаборатории Сангера (Sanger) [3]. Молекула инсулина состоит из двух цепей, связанных ковалентно дисульфидными мостиками, образованными остатками цистеина В7, А7 и В19, А20, соответственно (схема 1). Еще одна внутримолекулярная дисульфидная связь соединяет остатки цистеина в положениях А6 и А11. А-цепь инсулина состоит из 21 аминокислотного остатка, В-цепь — из 30.

В настоящее время определена первичная структура инсулина более чем у 25 видов животных. Наиболее близки молекулы инсулина крупного рогатого скота (КРС), свиного и человеческого инсулина (молекулярная масса — 5734, 5778 и 5808 Да, соответственно). В инсулине человека в положении В30 находится треонин, в инсулине свиньи — аланин, в инсулине крупного рогатого скота в положениях 8 и 10 А-цепи находятся остатки аланина (вместо треонина) и валина (вместо изолейцина) [3, 4].

Рентгеноструктурный анализ показал, что гексамер кристаллического цинк-инсулина состоит из трех димеров [3, 5]. Димеры инсулина образуют кристалл посредством водородных связей между аминокислотными остатками В24 и В26 [6].

В растворе молекулы инсулина легко переходят в агрегированное состояние, которое зависит от концентрации белка, температуры, рН и содержания цинка. При щелочном значении рН молекула инсулина существует в виде мономера, при кислом — в виде димера, в присутствии цинка образуются агрегированные формы с молекулярной массой от 50 до 300 кДа [7].

В процессе биосинтеза инсулина изначально образуется молекула проинсулина — полипептида, состоящего из 84 аминокислотных остатков, от которой под действием протеаз отщепляется так называемый С-пептид и образуется молекула инсулина [8, 9] (рис. 1).

Инсулин является специфическим сахаропонижающим средством. Гормон регулирует углеводный обмен, усиливает усвоение тканями глюкозы и облегчает проникновение глюкозы в клетки. Помимо гипогликемического действия инсулин усиливает обра-

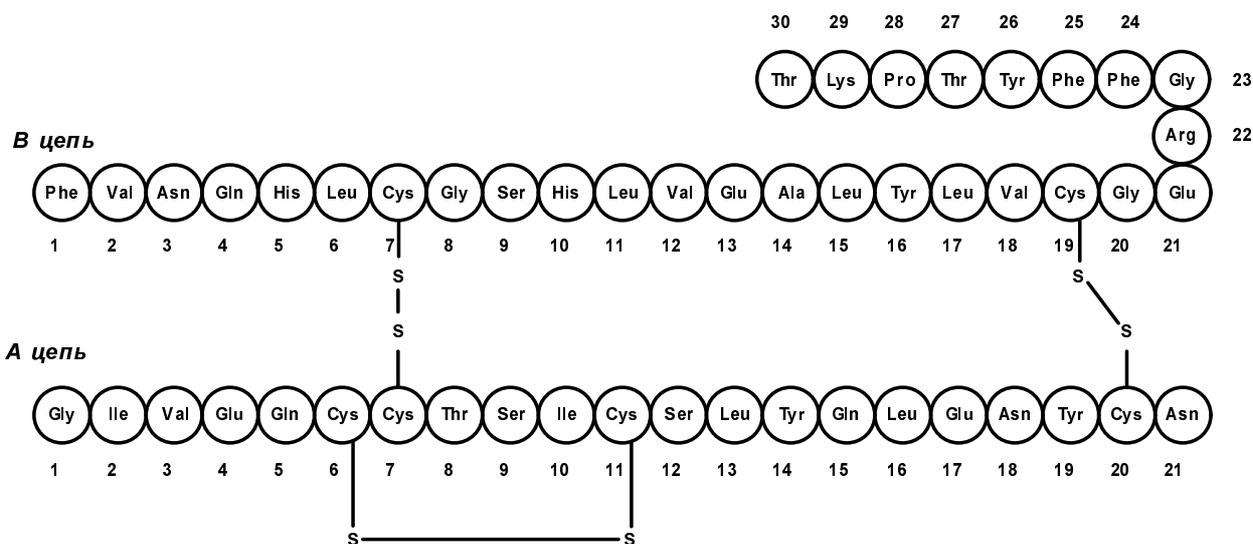


Схема 1.  
Первичная структура инсулина человека

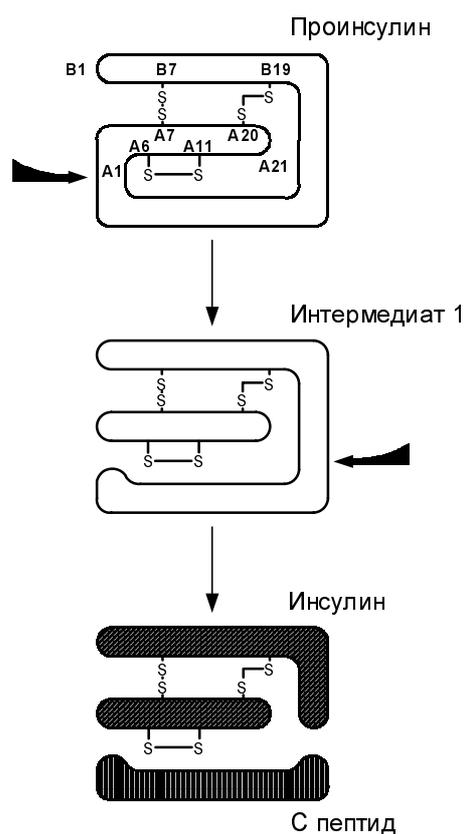


Рис. 1. Процессинг проинсулина *in vivo*.  
Стрелками показано действие эндопептидаз

зование продуктов превращения глюкозы, ускоряет синтез гликогена в мышцах, стимулирует синтез белков. В процессе воздействия гормона активируются гликогенсинтетаза, пируватдегидрогеназа, гексокиназа, ингибируется липопротеиновая липаза [10, 11, 12]. Проинсулин гипогликемической активностью не обладает. В реализации эффектов инсулина непосредственную роль играет его высокоспецифическое взаимодействие с инсулиновым рецептором, локализованным на плазматической мембране клетки, приводящее к образованию инсулин-рецепторного комплекса [13].

Биосинтез инсулина и его секреция регулируются содержанием глюкозы в плазме крови. Для здоровых взрослых людей концентрация глюкозы в плазме составляет от 3 до 8 мМ [11], в то время как при сахарном диабете (СД) нарушение углеводного обмена при-

водит к гипергликемии с увеличением концентрации глюкозы до 25 мМ [14].

СД 1-го типа (инсулинозависимый сахарный диабет) характеризуется абсолютной инсулиновой недостаточностью, поскольку  $\beta$ -клетки поджелудочной железы у таких больных практически разрушены. Единственным средством сохранить таким пациентам жизнь является лечение инсулином.

СД 2-го типа (инсулинонезависимый сахарный диабет) развивается вследствие инсулинорезистентности — потери чувствительности организма к действию инсулина. При этом выработка инсулина в организме значительно повышается, что приводит к постепенному истощиванию резервов поджелудочной железы и, в конечном итоге, к возникновению инсулиновой недостаточности и повышению сахара крови. При СД 2-го типа инсулинотерапия может быть необходима для контроля симптоматики и коррекции метаболических расстройств [15, 16].

По распространенности СД 2-го типа составляет около 90 % в общей структуре заболеваемости, при этом лавинообразное распространение диабета в постиндустриальном обществе связано с увеличением заболеваемости именно этой формой диабета. К сожалению, популяция больных СД 1-го типа также возрастает. В 2000 г. в мире насчитывалось около 150 миллионов диабетиков, а к 2025 г. прогнозируется удвоение количества больных [11], в то время как еще в 1970—80 гг. в Европе и США страдали диабетом всего 1—2% населения, из которых 20% составляли инсулинозависимые больные [17]. В таблице 1 приведены данные по распространенности заболевания диабетом в мире по состоянию на 2000 г. и прогноз на 2010 г. [14].

По другим расчетам [18] около 0,7% населения земного шара страдает инсулинозависимыми формами диабета, а потребность каждого больного в инсулине составляет 0,5—1,0 г в год.

По данным научно-исследовательского центра корпорации «Ново Нордик» в «индустриальной» части мира при среднесуточной дозе инсулина 40—60 МЕ/г, годовая потребность в препаратах инсулина составляет более 130000 мега МЕ (4600 кг фармакопейной субстанции инсулина) по оценке количества больных диабетом на 2000 год [19].

Из приведенных сравнительных оценок роста заболеваемости диабетом становится ясно, что обеспечение больных качественным и недорогим инсулином становится одной из приоритетных задач национального здравоохранения в каждом цивилизованном государстве.

Таблица 1

Распространенность заболевания сахарным диабетом в мире

Континенты	Количество больных диабетом в 2000 г., в млн. человек	Количество больных диабетом в 2010 г. (прогноз), в млн. человек	% возрастания заболеваемости*
Европа	26,5	32,9	24
Азия	84,5	132,3	57
Северная Америка	14,2	17,5	23
Южная Америка	15,6	22,5	44
Африка	9,4	14,1	50
Австралия	1,0	1,3	33

\* По прогнозу с 2000 г. на 2010 г. [14]

Со времени, когда были проведены первые опыты по использованию инсулина для лечения сахарного диабета в 1922 г., этот гормон выделяли из поджелудочной железы крупного рогатого скота (КРС) или свиней, однако с развитием генной инженерии появилась возможность создания биотехнологических методов производства инсулина человека. Научные разработки увенчались созданием первой промышленной технологии, которая была разработана фирмой «Джентек» (Genentech, Сан-Франциско, США) и коммерциализована корпорацией «Эли Лили» (Eli Lilly, США) [4, 17].

Настоящий обзор является попыткой систематизировать и обобщить более чем 20-летнюю историю использования методов рекомбинантных ДНК в мире и нашей стране для производства генноинженерного инсулина человека.

### Генноинженерный инсулин человека — основы технологии получения

Первые работы по химическому синтезу и экспрессии гена инсулина в *Escherichia coli* появились в конце 1970-х гг. [20, 21], при этом в 1980 г. рекомбинантный инсулин человека уже был испытан на добровольцах [22], а с 1981 г. интенсивно проводились клинические испытания препарата [20].

#### Метод отдельного конструирования цепей инсулина (Two-chain method)

Исторически, первым методом, использованным для производства генноинженерного инсулина человека, был метод независимого клонирования А- и В-цепей полипептидного гормона [20, 21, 23]. Схема включала химический синтез нуклеотидной последовательности цепей инсулина, при этом на 5'-конце каждого олигонуклеотида находился кодон метионина. Синтетические гены цепей А и В встраивали в *lac*-ген в составе экспрессионных плазмид, которыми трансформировали клетки *E. coli* (рис. 2). Уровень экспрессии авторы оценивали в 20% от общего клеточного белка [20]. Рекомбинантный белок синтезировался внутриклеточно в виде так называемых телец включения (inclusion bodies), которые представляют собой агрегаты целевого белка и ряда бактериальных белков в денатурированном неактивном состоянии [24, 25]. Благодаря этому целевой белок, находясь в нерастворимом состоянии, не подвергается протеолизу цитоплазматическими ферментами. Поскольку А- и В-цепи инсулина не содержат метионина, проводили расщепление рекомбинантного белка по аминокислотному остатку метионина бромциа-

ном после растворения телец включения в муравьиной кислоте. Частично очищенные цепи инсулина подвергали окислительному сульфитолизу и в виде S-сульфонатов при молярном соотношении А : В = 2,6 : 1 превращали в нативную молекулу двухцепочечного гормона в присутствии избытка дитиоэритрита [3, 17]. Выход конечного продукта составлял не более 60% от количества В-цепи.

Принципиальным недостатком описанной стратегии получения инсулина является использование β-галактозидазы в качестве белка носителя. В связи с тем, что этот белок содержит 1000 аминокислотных остатков (ср. 51 аминокислотный остаток в молекуле инсулина), из 1 г рекомбинантного белка, синтезируемого клеткой, можно получить только 50 мг инсулина даже при 100%-ном выходе.

Рекомбинантную конструкцию удалось улучшить при использовании *Trp*-оперона вместо *lac*-оперона (β-галактозидазной системы) [24]. Метод на основе рекомбинантного белка, имеющего лидерную последовательность, кодируемую триптофановым опероном *Trp E* (190 аминокислотных остатков), приводит к десятикратному увеличению экспрессии полипептида (А- или В-цепи инсулина) по сравнению с конструкцией, имеющей лидерную последовательность β-галактозидазы [26].

В последние годы продолжают попытки оптимизировать метод отдельного конструирования цепей. Так, например, в 1999 г. была опубликована работа

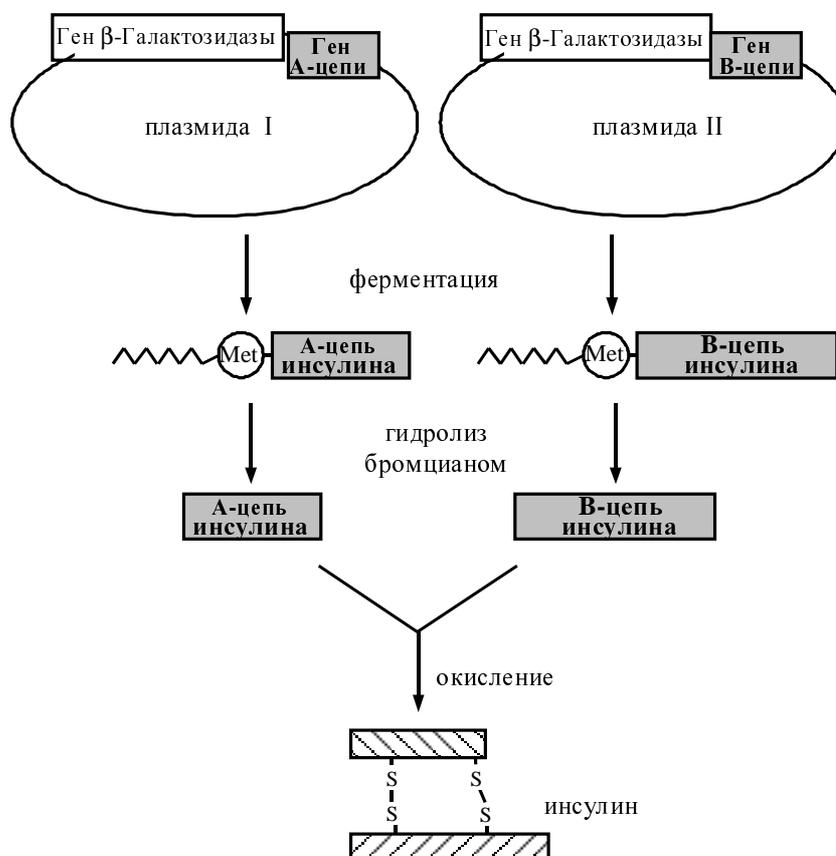


Рис. 2. Получение генноинженерного инсулина человека методом отдельного конструирования цепей

[18], в которой описана рекомбинантная плазида, кодирующая химерный белок с N-концевой последовательностью редуцированного  $\gamma$ -интерферона (133 аминокислотных остатка, рI 9,5), связанного через остаток метионина с А- или В-цепью инсулина. Экспрессия рекомбинантного белка достигает уровня в 4,6 г целевого белка с 1 л культуральной жидкости, что составляет, в пересчете на сухой остаток клеток, для А-цепи 600 мг на 1 л культуральной жидкости, а для В-цепи — 800 мг.

Выделение индивидуальных цепей инсулина проводили из телец включения, растворяя последние в 70% муравьиной кислоте и расщепляя рекомбинантный белок бромцианом с последующим сульфитолизом. Очистку А-цепи в виде S-сульфоната проводили анионообменной хроматографией, а S-сульфонат В-цепи инсулина выделяли ОФ ВЭЖХ. В присутствии избытка тиолсодержащих агентов очищенные S-сульфонаты А- и В-цепей инсулина образовывали нативную двухцепочечную молекулу инсулина человека с тремя дисульфидными связями. По мнению авторов использование термоиндуцируемого штамма позволяет обойти при производстве без дорогого традиционно используемого индуктора экспрессии изопропил- $\beta$ -D-тиогалактозида, а выделение индивидуальных цепей инсулина позволяет исключить стадию ферментативного расщепления рекомбинантного белка-предшественника (препро- или проинсулина, см. ниже). При этом использование высокотоксичного реагента бромциана не обсуждается, а конечный выход нативного инсулина не приводится.

#### Метод на основе проинсулина (внутриклеточная экспрессия)

Значительно перспективнее оказался способ, основанный на конструировании рекомбинантной плазмиды, экспрессирующей химерный белок, содержащий ту или иную N-концевую последовательность, соединенную с полипептидной цепью проинсулина человека (рис. 3). Необходимость N-концевой вставки (fusion) связана с тем, что при экспрессии гена проинсулина (кодирующего последовательность В-цепь—С-пептид—А-цепь инсулина) в бактериях происходит внутриклеточная деградация синтезируемого белка [24]. Первые результативные эксперименты по экспрессии в *E. coli* рекомбинантного белка, содержащего последовательность проинсулина, были основаны на использовании синтетического гена, кодирующего химерный белок, имевший в качестве N-концевой вставки (лидерный пептид) либо фрагмент  $\beta$ -галактозидазы, либо фрагмент белка триптофанового оперона (Тр-LE белок) [27, 28], связанный с проинсулином через аминокислотный остаток метионина (рис. 3, X = Met). Рекомбинантный белок накапливался в цитоплазме в виде телец включения. Полученный белок расщепляли по аминокислотному остатку



Рис. 3. Схема рекомбинантного белка, используемого в проинсулиновом методе получения генноинженерного инсулина человека (внутриклеточная экспрессия):

ЛП — лидерная N-концевая последовательность, X = Met, Lys, Lys-Arg, Arg. Стрелками показаны точки расщепления полипептидной цепи

метионина бромцианом, затем проинсулин подвергали окислительному сульфитолизу, при этом SH-группы остатков цистеина превращались в  $-S-SO_3$  группы. Гексасульфонат проинсулина ренатурировали с образованием в структуре проинсулина природных дисульфидных мостиков, последующим энзиматическим выщеплением С-пептида и С-концевого аргинина получали нативную молекулу инсулина. Основанная на описанной схеме технология была реализована корпорацией «Eli Lilly & Co» (США) в крупномасштабном промышленном производстве инсулина человека мощностью более 1000 кг в год [29].

Наиболее удачная современная модификация метода на основе проинсулина позволяет исключить использование токсичного бромциана [30, 31]. Рекомбинантный белок, состоящий из двух IgG-связывающих доменов белка А стафилококка (лидерный пептид, рис. 3), соединенных через аминокислотный остаток лизина или аргинина с проинсулином (X = Lys, Arg) синтезировали в виде телец включения. Молекулярная масса экспрессируемого химерного белка составляла 25 кДа. После ренатурации рекомбинантный белок выделяли аффинной хроматографией, используя свойства лидерного пептида. Затем его подвергали ферментативному гидролизу смесью трипсина и карбоксипептидазы В в соотношении субстрат : трипсин : карбоксипептидаза В равном 1 : 1000 : 2000. Заключительную очистку полученного инсулина проводили методом препаративной ОФ ВЭЖХ.

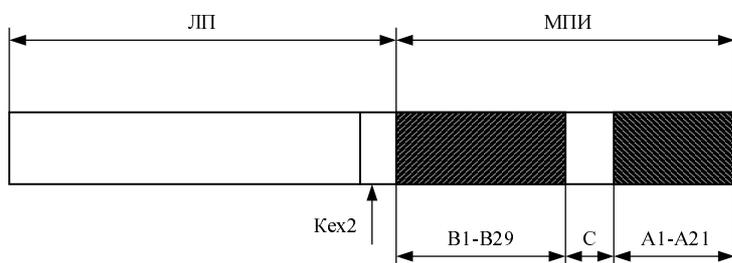
Похожая технология реализована с использованием рекомбинантного белка, включающего лидерную последовательность модифицированного фрагмента интерлейкина-2, соединенного с последовательностью проинсулина через аминокислотные остатки лизина или аргинина, либо через дипептид лизиларгинин [32] (рис. 3, X = Lys, Lys-Arg, Arg). Содержание рекомбинантного белка, экспрессируемого в виде телец включения, достигало 20% от суммарного клеточного белка. Ренатурацию (рефолдинг) проводили при низкой концентрации белка 0,1—0,2 мг/мл с выходом 80%. Ферментативный гидролиз трипсином вели одновременно по всем специфическим сайтам щепления (рис. 3) при соотношении фермент : субстрат = 1 : 600. Инсулин получали после обработки продуктов гидролиза рекомбинантного белка карбоксипептидазой В. Молекулярная масса химерного белка — около 12 кДа, т.е. 50% рекомбинантного белка составлял инсулин, но содержание исходного белка в тельцах включения было невысоким.

**Метод на основе проинсулина  
(внеклеточная экспрессия)**

Одними из наиболее перспективных разработок биотехнологии, направленных на использование в крупномасштабном производстве рекомбинантных белков, оказались системы экспрессии в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris* [25, 33].

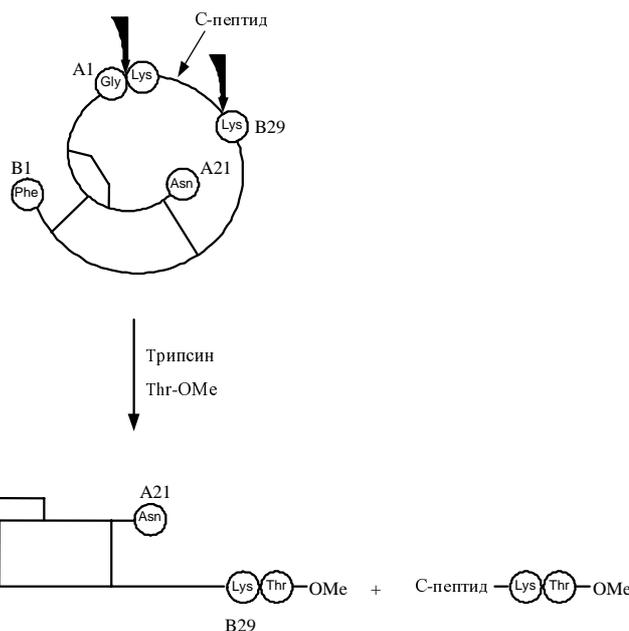
Значительными преимуществами технологий с использованием дрожжевых систем экспрессии является то, что, во-первых, дрожжи, в отличие от прокариотов, не содержат токсичных эндотоксинов и пирогенов клеточной стенки, а, во-вторых, синтезированные рекомбинантные белки более доступны для их выделения, так как они либо накапливаются в цитоплазме, либо секретируются в культуральную среду. Последнее достигается включением в рекомбинантный белок лидерной аминокислотной последовательности, определяющей секрецию. Так, например, рекомбинантный предшественник инсулина с N-концевой аминокислотной последовательностью  $\alpha 1$ -фактора *S. cerevisiae* секретируется во внеклеточную среду [34]. Необходимо отметить, что попытки добиться эффективной секреции проинсулина или самого инсулина, экспрессируемого в дрожжах, не увенчались успехом. Для решения этой проблемы была создана плаزمид, кодирующая молекулу инсулиноподобного предшественника, в которой отсутствовал С-концевой аминокислотный остаток треонина в положении В30. При этом, вместо аминокислотной последовательности С-пептида проинсулина человека, А и В-цепи были соединены укороченным аналогом С-пептида, либо непосредственно остаток Lys-B29 был связан с Gly-A1 [35] (рис. 4).

Известно, что рекомбинантный белок, экспрессирующийся в клетках дрожжей, подвергается процессингу в аппарате Гольджи с отщеплением лидерной последовательности под действием специфической эндопептидазы Kex2 и секретируется во внеклеточную



**Рис. 4. Схема рекомбинантного белка, используемого в проинсулиновом методе получения генноинженерного инсулина человека (внеклеточная экспрессия):**

ЛП — лидерная последовательность, МПИ — минипроинсулин, С — укороченный аналог С-пептида проинсулина человека, В1-В29 — аминокислотная последовательность В цепи инсулина человека без С-концевого остатка треонина, А1-А21 — аминокислотная последовательность А цепи инсулина человека, стрелка у Kex2 — точка расщепления рекомбинантного белка этой специфической эндопептидазой



**Рис. 5. Получение генноинженерного инсулина человека проинсулиновым методом (внеклеточная экспрессия).**

среду в виде одноцепочечного предшественника минипроинсулина уже с правильно сформированными дисульфидными связями [36]. Справедливости ради необходимо отметить, что работы по биосинтезу минипроинсулина в клетках *E. coli* существуют [37], однако информация о состоянии дисульфидных связей в продукте и о превращении минипроинсулина в инсулин не приводится.

Полученный в дрожжевых клетках минипроинсулин выделяли из культуральной жидкости и после очистки превращали в инсулин человека реакцией транспептидации в присутствии трипсина и *трет*-бутилового(метилового) эфира треонина в водно-органической реакционной среде [19] (рис. 5). Описанная технология с 1985 г. реализована в промышленных масштабах фирмой «Ново Нордиск» (Novo Nordisk, Дания).

**Генноинженерный инсулин в России**

**Научные основы создания  
технологии  
генноинженерного инсулина**

В Советском Союзе первые работы по получению генноинженерного инсулина человека были начаты в Институте биорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР (ныне Институт биорганической химии им. Ю. А. Овчинникова и М. М. Шемякина РАН — ИБХ РАН) в конце 1970-х гг. под руководством академика Ю. А. Овчинникова. Основное направление работ было связано с получением генов проинсулина человека и изучением их экспрессии в различных

системах [38, 39]. Были получены штаммы-продуценты *E. coli*, производящие проинсулинсодержащий гибридный белок с фрагментами  $\beta$ -галактозидазы, содержащий 1005 и 280 аминокислотных остатков [40, 41]. Уровень экспрессии проинсулина составлял от 9,2 мг на 1 л культуральной жидкости до 60–70 мкг на мг общего белка бактерии. Проинсулин определяли радиоиммунным методом после расщепления гибридного белка бромцианом по остатку метионина. В ходе дальнейших исследований были изучены различные системы экспрессии проинсулина человека в бактериальных клетках и сконструирован ряд рекомбинантных конструкций, предусматривающих как прямую экспрессию, так и получение проинсулина в виде гибридных белков [42]. Гибридные белки включали лидерные аминокислотные последовательности (кроме выше описанных) — фрагмент  $\alpha$ -амилазы *Bacillus subtilis* и IgG-связывающий фрагмент белка *A Staphylococcus aureus*. В последнем случае уровень экспрессии (эффективность биосинтеза) рекомбинантного белка достигал 15–30% от суммарного количества клеточного белка. Одним из наиболее важных результатов данных исследований, нашедших в будущем практическое применение, было создание плазмидных векторов, включающих в состав лидерного пептида полигистидиновый аминокислотный фрагмент [43].

Из научных исследований, проводимых в 1980–90-х гг., необходимо отметить работы ВНИИ Антибиотиков (ВНИИА) по оптимизации биосинтеза рекомбинантного белка — препроинсулина и разработке способов очистки инсулина человека [44, 45] и работы ЗАО «Фосфосорб», имеющие целью получение штаммов-продуцентов и усовершенствование хроматографических методов выделения инсулина [46, 47].

Несомненно, весомый вклад в развитие методов идентификации промежуточных продуктов в технологической цепи: рекомбинантный белок → инсулин, внесли работы, проводимые в это время в лаборатории биотехнологии ИБХ РАН [48–50].

#### **Создание промышленного производства генноинженерного инсулина в РФ**

Первой попыткой создать производство в нашей стране можно считать пилотную установку ВНИИА, основанную на технологии, разработанной совместно с немецкой фирмой Genbiotech GmbH (Гейдельберг) в 1987–1989 гг. [51]. Процесс был основан на производстве генноинженерным штаммом *E. coli* рекомбинантного белка (молекулярная масса около 17000 Да), содержащего лидерную аминокислотную последовательность, соединенную через аминокислотный остаток метионина с проинсулином человека. Исходная технологическая схема включала в себя следующие стадии:

1. Ферментация (выращивание штамма-продуцента в ферментере).
2. Отделение биомассы.
3. Разрушение клеток с выделением телец включения.
4. Очистка рекомбинантного белка последовательно ионообменной хроматографией на DEAE-сефарозе FF и гель-фильтрацией на сефадексе G-25M.

5. Расщепление рекомбинантного белка бромцианом.

6. Окислительный сульфитолиз проинсулина.

7. Хроматографическая очистка гексасульфоната проинсулина последовательной гель-фильтрацией на Сефадексе G-50 F, ионообменной хроматографией на DEAE-сефарозе FF и 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 ионообменной хроматографией на S-сефарозе FF, ультрафильтрацией и гель-фильтрацией на сефадексе G-50 SG.

12. Лиофильная сушка Na-соли инсулина человека.

Несмотря на очевидную громоздкость приведенной схемы технологического процесса на опытной установке ВНИИА были выпущены опытные партии субстанции генноинженерного инсулина человека (ГИЧ) и зарегистрирована соответствующая ВФС (временная фармакопейная статья) [52]. Однако, с распадом Советского Союза и всем известными экономическими и организационными последствиями выпуск препарата во ВНИИА более не производился.

В 1996 г. был издан Указ Президента РФ «О мерах государственной поддержки лиц, больных сахарным диабетом», в соответствии с которым Правительством РФ была принята Федеральная программа «Сахарный диабет». Раздел 2, п. 4 указанной программы гласит: «Предусматривается организовать производство отечественного генноинженерного инсулина, пероральных сахароснижающих препаратов, средств индивидуального контроля гликемии, а также современных сахарозаменителей и на их основе диетических продуктов питания». На основании указанных документов, под эгидой РАО «Биопрепарат» в ИБХ РАН и ГНЦ прикладной микробиологии (г. Оболенск, МО) были возобновлены широкомасштабные работы по созданию промышленной технологии и производства препаратов генноинженерного инсулина человека. В рамках совместных работ были созданы высокоэффективные штаммы продуценты препроинсулина человека и разработана лабораторная технология получения субстанции инсулина [53–55]. К настоящему времени в ЗАО «Национальные биотехнологии» (правопреемник РАО «Биопрепарат») в г. Оболенске открыто пилотное производство субстанции генноинженерного инсулина человека, но возможность выпуска готовых лекарственных форм отсутствует [56].

15 мая 2000 г. было подписано трехстороннее Соглашение между Правительством Москвы, Российской Академией наук и Институтом биоорганической химии им. М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова РАН о сотрудничестве в области создания производства генноинженерного инсулина человека, а в июне того же года мэром г. Москвы Ю.М. Лужковым было издано распоряжение «О создании генно-инженерного инсулина человека в Институте биоорганической химии имени М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)». Документ предусматривал финансирование Правительством Москвы

создания современного биотехнологического производства на кредитной основе для обеспечения системы здравоохранения города современными высококачественными лекарственными препаратами генноинженерного инсулина человека.

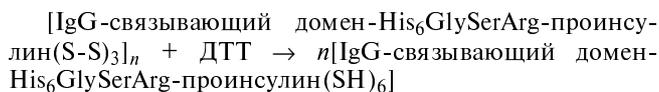
Технологический процесс производства субстанции ГИЧ в ИБХ РАН основан на следующей схеме [57]:

1. Получение посевного материала штамма-продукта
  - 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

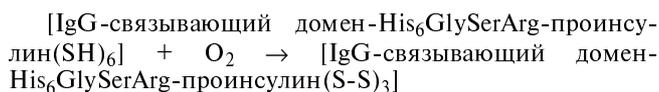
В основе процесса биосинтеза — использование штамма-продукта *E. coli* JM 109 с рекомбинантной плазмидой pPINS 07 [54]. Рекомбинантная плазмидная ДНК содержит искусственный ген, кодирующий гибридный полипептид, состоящий из одного IgG-связывающего домена белка А из *Staphylococcus aureus*, пептидного линкера His<sub>6</sub>GlySerArg и проинсулина человека. Плазмида (молекулярная масса 3,3 МДа, 5051 п. о.) содержит в качестве генетического маркера ген β-лактамазы, определяющий устойчивость трансформированных ею клеток бактерий к ампициллину. Экспрессия рекомбинантного белка штаммом-продуктом индуцируется изопропил-β-D-тиогалактозидом (благодаря наличию в плазмиде *tac*-промотора) и достигает 30% от суммарного клеточного белка.

В приведенном примере [58] ферментацию проводят в биореакторе объемом 3000 л, что позволяет за один цикл выделения получить от 1500 до 2000 л культуральной жидкости. Клетки продуцента рекомбинантного препроинсулина человека отделяют сепарированием, дезинтегрируют при высоком давлении для сбора телец включения, многократно 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. Полученные тельца включения солюбилизируют в буферном

растворе, содержащем мочевины и дитиотреитол (ДТТ) для восстановления внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей в рекомбинантном белке:



Далее 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:



Ренатурированный рекомбинантный белок очищают ионообменной хроматографией и подвергают ферментативному расщеплению трипсином и карбоксипептидазой Б в массовом соотношении 4000 : 2 : 1. После осаждения и предварительной обработки получают инсулин-сырец 86—88%-ной чистоты. На первой стадии очистки гидрофобной хроматографией содержание инсулина достигает 96%, на второй стадии очистки ионообменной хроматографией проводится окончательное освобождение от иммуногенных примесей (см. ниже), финишная гель-фильтрация проходит в стерильных условиях и позволяет довести качество препарата до фармакопейного. 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-продукта. Преимущества процесса, позволившие использовать его в отечественной промышленной технологии, следующие:

- одностадийная очистка ренатурированного рекомбинантного белка;
- совместное ферментативное расщепление рекомбинантного белка трипсином и карбоксипептидазой Б;
- эффективное использование хроматографии низкого давления для очистки инсулина.

#### Контроль качества генноинженерного инсулина человека

Требования к качеству субстанции инсулина человека изложены в соответствующих разделах Американской Фармакопеи (Ф. США) [59] и Европейской Фармакопеи (ЕФ) [60] (табл. 2). Для сравнения приведены показатели ФСП 42-04523613-02 (Фармакопейная статья предприятия, производитель — ИБХ РАН).

Как видно из таблицы 2, инсулин должен быть охарактеризован качественно и количественно (показатели «Подлинность» и «Количественное определение»). 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). Количес-

Таблица 2

Сравнение показателей качества фармакопейной субстанции генноинженерного инсулина человека, принятых за рубежом и в РФ

№ п/п	Показатель	Номилируемое содержание показателя качества		
		ЕФ 4-е издание, 2002 г.	Ф. США, 24-е издание, приложение 3, 2000 г.	ФСП 42-04523613-02
1	Количественное определение	Суммарное содержание инсулина и А21-дезамидоинсулина должно быть не менее 95% и не более 105% на абсолютно сухой вес по сравнению со стандартом	Активность не менее 27,5 МЕ/мг на абсолютно сухой вес	Активность не менее 27,5 МЕ/мг в пересчете на сухое вещество
2	Остаточные белки штамма-продукта	Не более 10 пг/мг*	Не более 10 пг/мг*	Не более 10 пг/мг
3	Подлинность	а) ВЭЖХ в сравнении со стандартом; б) метод сравнения пептидных карт	а) ВЭЖХ в сравнении со стандартом; б) метод сравнения пептидных карт; в) биоидентичность	а) ВЭЖХ в сравнении со стандартом; б) метод сравнения пептидных карт; в) биоидентичность
4	Высокомолекулярные примеси	Не более 1,0%	Не более 1%	Не более 1%
5	Родственные белки	Не более 2%	Не более 2%	Не более 2%
6	А21-дезамидоинсулин	Не более 2%	Не более 2%	Не более 2%
7	Проинсулиноподобная иммунореактивность Иммунореактивные полипептиды	Не более 10 пг/мг*	Не более 10 пг/мг*	Не более 10 пг/мг
8	Цинк	Не более 1%	Не более 1%	От 0,2 до 1% в пересчете на сухое вещество
9	Потери в массе при высушивании	Не более 10%	Не более 10%	Не более 10%
10	Сульфатная зола	Не более 2,5%	—	Не более 2,5%
11	Бактериальные эндотоксины	Менее 10 МЕ/мг	Не более 10 USP Endotoxin Units**/1 мг	Не более 10 ЭЕ/мг
12	Остаточная ДНК штамма-продукта	Нет	***	Не более 7 пг/мг
13	Микробиологическая чистота	Условия производства должны обеспечивать минимальный уровень микробной контаминации	Менее 300 колоний на 1 г	Не более 100 бактерий и грибов суммарно в 1 г препарата при отсутствии <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>

\* В ЕФ и Ф. США размерность «пг/мг» обозначена как ppm. \*\* Указанные единицы измерения, принятые в Ф. США, совпадают с используемыми в РФ единицами, обозначаемыми как ЭЕ. \*\*\* Количественное значение не указывается

венное определение проводится также методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Количество гормона принято оценивать в международных единицах (МЕ), при этом 1 МЕ (IU) = 0,0347 мг инсулина. Естественно, все количественные показатели приводятся на абсолютно сухой вес, поскольку в препарате номинируется влажность, которая реально варьирует от 5 до 10% (показатель 9, табл. 2).

Хроматографически также определяют родственные белки (инсулиноподобные полипептиды, присут-

ствующие в конечном препарате), так называемый А-21-дезамидоинсулин (модифицированная молекула инсулина, содержащая в 21 положении А-цепи аминокислотный остаток аспарагиновой кислоты вместо аспарагина) и высокомолекулярные примеси, а именно, димеры и полимеры инсулина (определение проводят эксклюзионной ВЭЖХ). Примеси, номинируемые показателями 4—6 (табл. 2), могут образовываться как при нарушении технологического процесса производства субстанции, так и при хранении.

Важнейшими показателями качества являются содержание иммунореактивных примесей (показатели 2, 7, табл. 2) и содержание ДНК (показатель 12, табл. 2), что связано с биотехнологическим способом получения инсулина человека и необходимостью тщательного контроля указанных граничных параметров (1 ppm — 1 part pro million, что соответствует размерности «пг/мг»). Проинсулиноподобные пептиды и белки штамма-производителя определяют либо радиоиммунным методом (РИА), либо методом иммуноферментного анализа. Остаточную ДНК штамма-производителя определяют с помощью гибридизационных методов, либо прямым флуоресцентным определением нуклеиновых кислот в образцах. В ИБХ РАН разработан и успешно применяется для контроля качества полуколичественное определение ДНК методом ПЦР [61]. Необходимость контроля содержания цинка в субстанции инсулина связана с использованием в технологии производства солей цинка для кристаллизации, а также со спецификой получения готовых лекарственных форм инсулина (см. ниже).

Определение бактериальных эндотоксинов (в основном следовые количества липополисахаридов клеточной стенки бактерии штамма-производителя) проводят методом ЛАЛ-теста, который сравнительно недавно успешно заменил определение пирогенности *in vivo*. Как правило, микробиологическая чистота препарата номинируется, хотя в процессе производства готовых лекарственных форм всегда присутствует стадия стерилизующей фильтрации.

Приведенные в таблице 2 данные наглядно демонстрируют жесткость требований параметров контроля фармакопейной субстанции инсулина человека, причем по отдельным показателям качества требования контрольных органов РФ даже выше, чем в США, не говоря уже о правилах Европейской Фармакопеи.

#### **Готовые лекарственные формы генноинженерного инсулина человека**

Готовые лекарственные формы генно-инженерного инсулина человека представляют собой стерильный изотонический раствор фармакопейной субстанции инсулина в воде для инъекций, имеющий рН 6,9–7,8 и концентрацию инсулина 40 или 100 МЕ/мл.

В качестве консервантов используют фенол, *m*-крезол и метилпарабен (метиловый эфир *n*-гидроксибензойной кислоты) [3, 4, 10, 63].

По длительности действия готовые лекарственные формы инсулина различают следующим образом.

а) *препараты инсулина короткого действия* — раствор для подкожного или внутримышечного применения, начало действия через 30 мин, максимум действия («пик») через 1–2 ч, общая продолжительность действия 5–8 ч. В РФ применяются Хумулин Регуляр («Эли Лилли», США), Актрапид НМ («Ново Нордиск», Дания), Инсуман Рапид («Авентис», Франция—Германия), Инсуран Р (ИБХ РАН, Россия).

б) *препараты инсулина пролонгированного действия* — суспензия для подкожного введения, начало действия через 1,5–2 ч, пик через 4–12 ч, общая продолжительность действия 18–24 ч. В настоящее время, как правило, применяют пролонгированные формы генноинженерного инсулина человека средней продолжительности действия, которые представляют собой суспензию кри-

сталлического комплекса инсулина с протамина сульфатом в так называемом изофановом соотношении (отсюда: протамин-инсулин, изофан-инсулин, neutral protamine Hagedorn — НРН или НПХ).

В РФ применяются Хумулин НПХ («Эли Лилли», США), Протафан НМ («Ново Нордиск» Дания), Инсуман Базал («Авентис», Франция—Германия), Инсуран НПХ (ИБХ РАН, Россия).

Существуют также пролонгированные формы инсулина без протамина сульфата средней продолжительности действия (суспензия цинк-инсулина 30% — в аморфной форме, 70% в кристаллической — Монотард НМ («Ново Нордиск», Дания); Хумулин Л («Эли Лилли», Франция) и длительного действия — суспензия кристаллического цинк-инсулина — Ультратард НМ («Ново Нордиск», Дания).

Получение готовых лекарственных форм инсулина довольно сложная процедура, которая в общих чертах может выглядеть следующим образом. Субстанцию инсулина в концентрации около 4%, содержащую расчетное количество ионов цинка, растворяют в воде, подкисленной соляной кислотой. Полученный раствор инсулина смешивают с раствором, содержащим консервант(ы), изотонический агент и другие необходимые компоненты, при перемешивании доводят рН до нейтрального и подвергают стерилизующей фильтрации. При изготовлении пролонгированных форм стерилизующую фильтрацию проводят на стадии получения первичных растворов, поскольку конечный раствор препарата инсулина представляет собой суспензию [3, 64].

#### **Аналоги инсулина: свойства и применение**

Многочисленные попытки модифицировать первичную структуру инсулина были связаны (кроме решения фундаментальных структурно-функциональных задач) с необходимостью снижения антигенных и/или иммуногенных свойств, а также для изменения фармакокинетических характеристик этого полипептидного гормона [3]. Поскольку первый аспект был решен с разработкой новых, более совершенных методов очистки и контроля качества субстанции инсулина, то затем на первый план вышла задача получения аналогов инсулина с полноценной гипогликемической активностью, но обладающих дополнительными терапевтическими преимуществами.

Проблема состоит в том, что у здоровых индивидумов (не диабетиков), концентрация инсулина в крови возрастает до максимума через 30–45 мин после приема пищи и снижается до нормы через 2–3 ч. Имеющиеся в наличии препараты инсулина — быстродействующие, средней продолжительности действия и пролонгированные (см. выше) не позволяют полностью реализовать физиологически нормальный уровень инсулина в терапии сахарного диабета. Главные недостатки основных существующих готовых лекарственных форм инсулина связаны с необходимостью достаточно частых инъекций и, с другой стороны, с наличием максимумов содержания инсулина в крови.

Развитие биотехнологических методов позволило в последние 10 лет создать и ввести в лечебную практику новые аналоги инсулина человека, в значительной степени решившие эти проблемы [65, 66].

### *Аналоги инсулина сверхбыстрого действия*

В дополнение к сказанному выше необходимо добавить, что препараты инсулина короткого действия имеют ряд недостатков. В частности, больной должен сделать инъекцию инсулина короткого действия за 30—60 мин до приема пищи, в то время как инъекция препарата сверхбыстрого действия может быть осуществлена непосредственно перед едой, что с точки зрения пациентов значительно удобнее. Этот эффект, однако, не может быть достигнут при использовании нативного инсулина человека, поскольку в готовых лекарственных формах препаратов в физиологических концентрациях он образует димеры и гексамеры, препятствуя ускоренному всасыванию из подкожно-жировой клетчатки. Таким образом, чтобы уменьшить межмолекулярную ассоциацию молекул инсулина, необходимо было провести направленное изменение аминокислотной последовательности нативного инсулина.

Первым доступным клиницистам аналогом инсулина ультракороткого действия стал инсулин лизпро [Lys(B28)Pro(B29)] (рис. 1), полученный методами генной инженерии и выпускаемый под названием Хумалог с 1996 г. («Эли Лилли»).

Изменение последовательности аминокислот в положениях 28-29 В-цепи инсулина привело к тому, что инсулин лизпро в растворе присутствует в основном в виде мономера, это значительно увеличивает скорость всасывания с соответствующим сверхбыстрым гипогликемическим действием [67]. Поскольку изменение первичной структуры не затрагивало область связывания гормона с соответствующим рецептором, то константа связывания с инсулиновым рецептором у инсулина лизпро и нативного инсулина имеют сходные значения [68].

Другим удачным примером изменения аминокислотной последовательности молекулы инсулина человека для получения эффективного аналога ультракороткого действия стала замена остатка пролина в положении В28 на остаток аспарагиновой кислоты. Эта модификация ускоряет диссоциацию гексамеров до мономеров и приводит к быстрому всасыванию из подкожно-жировой клетчатки после инъекции препарата. Данный аналог, получивший название инсулин аспарт (НовоЛог, в России — НовоРапид) был разработан фирмой «Ново Нордиск» и разрешен для клинического применения с 2000 г.

Как инсулин лизпро, так и инсулин аспарт значительно улучшили качество жизни больных сахарным диабетом, позволяя более успешно контролировать уровень сахара в крови.

### *Аналоги инсулина пролонгированного действия*

Одной из возможностей пролонгировать действие инсулина является изменение его изоэлектрической точки от 5,4 в нейтральную область  $pI$ . Это достигается введением в структуру молекулы инсулина положительно заряженных аминокислотных остатков, что приводит к снижению растворимости аналогов при физиологических значениях  $pH$  [69]. При этом после подкожной инъекции молекула аналога инсулина переходит в нерастворимую форму, что значительно пролонгирует гипогликемический эффект препарата. Наиболее удачной генноинженерной конструкцией

данного типа аналогов инсулина оказалась молекула гларгина (Лантус, НОЕ901), разработанного в лабораториях фирмы «Авентис». В структуре инсулина гларгин остаток аспарагина в положении А21 заменен на остаток глицина, что способствует формированию стабильных гексамеров [70], а В-цепь удлинена на два положительно заряженных остатка аргинина — ArgB31-ArgB32 (см. рис. 1), благодаря чему значение  $pI$  (изоэлектрической точки) смещается до 6,7. При подкожном введении кислый раствор (значение  $pH$  готового раствора Лантуса равно 4,0) нейтрализуется, что приводит к вышеописанному эффекту. При сравнении эффектов инсулина гларгин с инсулином НПХ (см. выше) было показано, что аналог проявляет гипогликемический эффект в течении 24 ч, при этом в отличие от протамин-инсулина не имеет максимума («пика») действия [71]. Несмотря на изменение первичной структуры молекулы не было отмечено аллергических реакций в месте инъекций препарата, а титр образующихся антител не отличался для обоих указанных препаратов инсулина. Клинические испытания препарата Лантус были успешно завершены, и он был разрешен к медицинскому применению в США и Европе с 2000 г.

Иным способом достижения пролонгированного действия инсулина является модификация химической структуры гормона для его связывания с белками сыворотки крови, в частности с альбумином. Это достигается введением в структуру инсулина остатков жирных кислот, что приводит к связыванию подобных аналогов инсулина с сывороточным альбумином. Альбумин служит в данном случае мультифункциональным транспортным белком, который, как известно, активно связывает различные эндогенные субстанции, в том числе и лекарственные средства.

Ацилирование молекулы инсулина, как правило, проводится по  $\epsilon$ -аминогруппе остатка лизина в положении В29. В настоящее время активно изучаются аналоги инсулина человека, разработанные в лабораториях «Эли Лилли» [WW99-S32 — N-пальмитоил-Lys(B29)инсулин] и «Ново Нордиск» [NN304, инсулин Детемир — LysB29-тетрадеканоил-дез-(В30)треонил-инсулин]. Доклинические исследования и фаза I клинических исследований ацилированных аналогов инсулина показали, что препараты характеризуются достаточной продолжительностью действия, а их фармакокинетические профили имеют линейную форму. При этом отсутствуют характерные для протамин-инсулина и Хумулина Ленте (суспензия цинк-инсулина средней продолжительности действия) максимумы активности («пики») [72, 73]. В 2004 г. «Ново Нордиск» анонсировала промышленный выпуск инсулина Детемир с торговым наименованием Левемир.

### **Заключение**

Со времени открытия инсулина Ф. Бантингом и Ч. Бестом в 1921 г. [74], которые выделили гормон из поджелудочной железы новорожденного теленка и показали снижение уровня глюкозы в сыворотке крови экспериментального животного, прошло более 80 лет. За это время была создана индустрия производства инсулина, вначале животного, а в последние 20 лет — человеческого. Были разработаны многочисленные инъекционные лекарственные формы, более совершенные генноинженерные аналоги, максимально

обеспечивающие физиологическую динамику инсулина в крови, а также имплантируемые системы доставки гормона, контролируемые датчиками глюкозы. Определенные надежды связывают с возможностью трансплантации  $\beta$ -клеток. Активно ведутся работы по разработке интраназальных (ингаляционных) препаратов инсулина, эффективно проникающих через слизистую оболочку носа [15], есть попытки создания трансдермальных лекарственных форм инсулина [75, 76]. Тем не менее за все эти годы инсулин остается единственным и безальтернативным лекарственным препаратом для заместительной терапии сахарного диабета 1-го типа, спасая жизни многих тысяч людей.

В 2002—03 гг. в мире было продано препаратов рекомбинантного инсулина человека на сумму 5340 миллионов долларов США [77], и эта цифра будет только возрастать. Основной среднесрочной перспективой является развитие и совершенствование биотехнологических процессов — от создания высокопроизводительных штаммов-продуцентов до совершенствования методов выделения и очистки, что обеспечит производство фармацевтической субстанции рекомбинантного инсулина по экономически и социально оправданным ценам. Прикладное значение решения этой проблемы в нашей стране очевидно.

Технология производства рекомбинантного инсулина обуславливает развитие современного высокотехнологичного сектора промышленности, в котором особое внимание уделяется решению вопросов фармацевтической безопасности. Таким образом, эта технология приобретает универсальное значение, позволяя использовать общие стратегические подходы и тактические решения для внедрения и выпуска других генноинженерных белков, успешно применяемых в медицине и в настоящее время импортируемых. Это гормон роста человека, эритропоэтин,  $\alpha$ - и  $\beta$ -интерфероны, факторы крови VIIa и VIII, ГКСФ (гранулоцит-колониестимулирующий фактор) и многие другие.

\* \* \*

Выражаю глубокую признательность профессору Ю.П. Швачкину за любезное приглашение обобщить и систематизировать многочисленные данные, в том числе и практические, по описанной теме, искреннюю благодарность академику А.И. Мирошникову за постоянное внимание и научное редактирование обзора, а также А.Н. Александрову, Е.М. Беликовой, В.В. Вострикову и В.Д. Черкасовой за неоценимую техническую помощь при подготовке рукописи.

#### Список терминов и сокращений

**Изофановое соотношение** (изофановое число) — это молярное соотношение инсулина и протамина в образующемся комплексе, в котором ни один из компонентов не находится в избытке. При pH 7,3 инсулин и протамин лосося соосаждаются в молярном соотношении 5:1, что соответствует 0,13 мг протамина на 1 мг инсулина

ГКСФ (гранулоцит-колониестимулирующий фактор) — субстанция лекарственного препарата Филграстим (Нейпоген), белковый фактор, участвующий в системе кроветворения. Лекарственное средство применяется

при комбинированной противоопухолевой химиотерапии, лучевой терапии и при СПИДе

ЛАЛ-тест (LAL-тест) — фармакопейный метод для определения бактериальных токсинов, заменивший показатель «пирогенность», основанный на повышении температуры у лабораторных животных при введении инъекционных препаратов. ЛАЛ — «лизат амебоцитов люмулуса» — реактив, выделенный из клеток морского рачка. Метод основан на свойстве указанного реактива образовывать сгусток при взаимодействии с липополисахаридами клеточной стенки бактерий

ОФ ВЭЖХ — обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ПЦР — полимеразная цепная реакция

ЭЕ (ЭдЕ) — «эндотоксиновые единицы» — единицы измерения содержания бактериальных эндотоксинов. См. также ЛАЛ-тест

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987, с. 247—249.
2. Марри Р., Греннер Д., Меїес П., Родуэлл В. Биохимия человека. М.: Мир, 1993, т. 2, с. 247—263.
3. Brange J. Galenics of Insulin, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1987, p. 1—99.
4. Исаева И.В., Ковалева С.В., Пешая Т.В. и др. Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств, 2001, № 2, с. 39—47.
5. Derewenda U., Derewenda Z., Dodson E.J. e. a. Nature, 1989, v. 338, p. 594—596.
6. Mirmira R.J., Tager H.S. J. Biol. Chem., 1989, v. 264, p. 6349—6354.
7. Olsen H.B., Ludvigsen S., Kaarsholm N.C. Biochemistry, 1996, v. 35, p. 8836—8845.
8. Steiner D.F., Oyer P.F. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1967, v. 57, p. 473—480.
9. Steiner D.F., Hallund O., Rubenstein A. e. a. Diabetes, 1968, v. 17, p. 725—736.
10. Машковский М.Д. Лекарственные средства, Харьков, Торсинг, 1998, т. 2, с. 16.
11. Klyushnichenko V., Bruch R., Bulychev A. e. a. Bioprocess International, 2004, v. 2, № 8, p. 48—59.
12. Sonksen P., Sonksen J. J. Brit. J. Anaes., 2000, v. 85, p. 69—79.
13. White M.F., Kahn C.R. J. Biol. Chem., 1994, v. 269, p. 1—4.
14. Zimmel P., Alberti K.G., Shaw J. Nature, 2001, v. 414, p. 782—787.
15. Аметов А.С. Российский Медицинский журнал, 1998, т. 6, № 12, www.rmj.ru.
16. Чазова Т.Е. Там же, 2003, т. 11, № 27, с. 1507—1514.
17. Хигинс И., Бест Д., Джонс Дж. Биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 1988, с. 325—338.
18. Schmidt M., Babu K.R., Khanna N. e. a. J. Biotechnology, 1999, v. 68, p. 71—83.
19. Kjeldsen T. Appl. Microbiol. Biotechnol, 2000, v. 54, p. 277—286.
20. Goeddel D.V., Kleid D.G., Bolivar F. e. a. PNAS USA, 1979, v. 76, p. 106—110.
21. Crea R., Kraszewski A., Hirose T. e. a. Ibid., 1978, v. 75, p. 5764—5769.
22. Miller W.L., Baxter J.D. Diabetologia, 1980, v. 18, p. 431—436.
23. Chance R.E., Hoffman J.A. US Patent 4421685, 1983.
24. Williams D.C., Frank R.M., Muth W.L. e. a. Science, 1982, v. 215, № 5, p. 687—689.

25. Патрушев Л.И. Искусственные генетические системы, т.1. Генная и белковая инженерия. М.: Наука, 2004, с. 171—173.
26. Burnett J.P. Experimental Manipulation of Gene Expression. N.Y.: Acad. Press, 1983, p. 261—271.
27. Chance R.E., Hoffman J.A., Kroeff E.P. e. a. Peptides: synthesis-structure-function, Proceeding of the Seventh American Peptide Symposium. Pierce Chemical Company, Rockford, USA, 1981, p. 721—728.
28. Frank V.H., Pettee J.M., Zimmerman R.E. e. a. Peptides: synthesis-structure-function, Proceeding of the Seventh American Peptide Symposium. Eds. D.H. Rich, E. Gross. Pierce Chemical Company, Rockford, USA, 1981, p. 729—738.
29. Petrides D., Sapidou E., Calandranis. J. Biotechnology and Bioengineering, 1995, v. 48, p. 529—541.
30. Nilsson J., Jonasson P., Samuelsson E. e. a. J. Biotechnology, 1996, v. 48, p. 241—250.
31. Jonasson P., Nilsson J., Samuelsson E. e. a. Eur. J. Biotechnology, 1996, v. 236, p. 656—661.
32. Castellanos-Serra L.R., Hardy E., Ubieta R. e. a. FEBS Letters, 1996, v. 378, p. 171—176.
33. Cereghino G.P.L., Cregg G.M. Curr. Opin. Biotechnol, 1999, v. 10, p. 422—427.
34. Thim L., Hansen M.T., Norris K. e. a. PNAS USA, 1986, v. 83, p. 6766—6770.
35. Kjeldsen T., Brandt J., Andersen A.S. e. a. Gene, 1996, v. 170, p. 107—112.
36. Kjeldsen T., Pettersson A.F., Hach M. J. Biotechnology, 1999, v. 75, p. 195—208.
37. Shin C.S., Hong M.S., Kim D.Y. e. a. J. of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1999, v. 22, p. 176—180.
38. Овчинников Ю.А., Ефимов В.А., Чахмахчева О.Г. ДАН СССР, 1983, т. 270, № 3, с. 743—747.
39. Ovchinnikov Yu.A., Efimov V.A., Ivanova I.N. e. a. Gene, 1984, v. 31, p. 65—78.
40. Овчинников Ю.А., Ефимов В.А., Чахмахчева О.Г. и др. АС СССР № SU 1321063, 1987.
41. Овчинников Ю.А., Ефимов В.А., Чахмахчева О.Г. и др. АС СССР № SU 1352950, 1987.
42. Ефимов В.А., Алексюк И.В., Буякова А.А. и др. Биооргани. химия, 1989, т. 15, № 8, с. 1078—1090.
43. Ефимов В.А., Фрадков А.Ф., Калинин А.Л. и др. Там же, 1995, т. 211, с. 9—16.
44. Навашин С.М., Яроцкий С.В., Иванкин А.Н. и др. Антибиотики и химиотерапия, 1988, т. 339, с. 701—708.
45. Иванкин А.Н., Яроцкий С.В., Навашин С.М. и др. АС СССР № SU 1828133, 1993.
46. Уваров В.Ю., Нечаев В.Н., Маркин С.С. и др. Патент РФ № RU 2122549, 1998.
47. Маркин С.С., Уваров В.Ю., Ляшенко А.А. и др. Патент РФ № RU 2148641, 2000.
48. Klyushnichenko V., Vulfson A. Pure Appl. Chem., 1993, v. 65, p. 2265—2272.
49. Klyushnichenko V., Koulis D., Yakimov D. e. a. J. Chromatogr. A., 1994, v. 661, p. 83—92.
50. Миргородская О.А., Казанина Г.А., Миргородская Е.П. и др. Биооргани. химия, 1997, т. 23, № 2, с. 91—97.
51. Лабораторный технологический регламент № 2 на получение генно-инженерного инсулина человека, М.: Минмедпром СССР — ВНИИА, 1988.
52. Инсулин человека. ВФС 42-212892 от 19.06.1992, МЗ РФ.
53. Коробко В.Г., Болдырева Е.Ф., Шингарова Л.Н. и др. Патент РФ № RU 2143493, 1999.
54. Коробко В.Г., Болдырева Е.Ф., Шингарова Л.Н. и др. Патент РФ № RU 2144958, 2000.
55. Калинин Ю.Т., Ураков Н.Н., Иванов В.Т. и др. Патент РФ № RU 2141531, 1999.
56. Степанов А.В., Родионов П.П., Байдусь А.Н. Terra Medica nova, (СПб), 2004, № 3, с. 33—34.
57. Зинченко А.А., Мелихова Т.Д., Гордеева Е.А. и др. Патент РФ № RU 2208637, 2003.
58. Баирамашвили Д.И., Зинченко А.А., Косарев С.А. и др. Концептуальные подходы к масштабированию производства генно-инженерного инсулина человека. В: Сб. мат. 1-го Межд. конгр. «Биотехнология — состояние и перспективы развития», М., 2002, с. 177.
59. The United States Pharmacopeia. Philadelphia, USA. 2000. (USP24), Suppl. 3.
60. European Pharmacopeia 4th Edition. Strasbourg, France. 2002. 4.02 Version.
61. Александров А.Н., Скоблов Ю.В., Скоблов М.Ю. и др. Биооргани. химия, 2005, т. 31, № 1, с. 73—76.
62. Древаль А.В. Массовая инсулинофобия. М.: «Профессионал-Центр», 2003, с. 88—94.
63. Баирамашвили Д.И., Каратеева Р.И., Сизова Н.В. и др. Патент РФ № 2202365, 2003.
64. Vajo Z., Duckworth W.C. Pharmacological Reviews, 2000, v. 52, № 1, p. 1—9.
65. Vajo Z., Fawcett J., Duckworth W.C. Endocrine Reviews, 2001, v. 22, № 5, p. 706—717.
66. Анциферов М.Б., Майоров А.Ю. Русский Медицинский журнал, 1998, т. 6, № 12, www.rmj.ru.
67. Sieker L.J., Sundell K. Diabetes, 1991, 40 (Suppl.1), 168A(abstract).
68. Roskamp R.H., Park J. Diabetes Care, 1999, 22 (Suppl.2) B109—B113.
69. McKeage K., Goa K.L. Drugs, 2001, v. 61, № 11, p. 1599—1694.
70. Heinemann L., Linkeshova R., Rave K. e. a. Diabetes Care, 2000, v. 23, p. 644—649.
71. Heinemann L., Sinha K., Weyer C. e. a. Diabet Med., 1999, v. 16, p. 332—338.
72. Myers S.R., Yakubu-Madus F.E., Johnson W.T. e. a. Diabetes, 1997, v. 46, p. 637—642.
73. Banting F.G., Best C.H. J. Lab. Clin. Med., 1922, v. 7, p. 464—472.
74. Kuznetsova E.G., Salomatina L.A., Skaletskiy N.N. e. a. 1<sup>st</sup> EUFAPS Conference on Optimizing Drug Delivery and Formulation. New Challenges in Drug Delivery. Versailles, France, 2003, p. 177—178.
75. Севастьянов В.И., Саломатина Л.А., Кузнецов Е.Г. и др. Медицинская техника, 2003, № 2, с. 21—24.
76. Nightingale P., Martin P. Trends in Biotechnology, 2004, v. 22, № 11, p. 564—569.