**Содержание**

Введение

1. Типы инсулина

2. Получение инсулина

Заключение

Список литературы

**Введение**

Инсули́н (от лат. insula — остров) — гормон пептидной природы, образуется в бета-клетках островков Лангерганса поджелудочной железы. Оказывает многогранное влияние на обмен практически во всех тканях.

Основная функция инсулина – обеспечивать проницаемость клеточных мембран для молекул глюкозы. В упрощенном виде можно сказать, что не только углеводы, но и любые питательные вещества в конечном счете расщепляются до глюкозы, которая и используется для синтеза других содержащих углерод молекул, и является единственным видом топлива для клеточных энергостанций – митохондрий. Без инсулина проницаемость клеточной мембраны для глюкозы падает в 20 раз, и клетки умирают от голода, а растворенный в крови избыток сахара отравляет организм.

Нарушение секреции инсулина вследствие деструкции бета-клеток — абсолютная недостаточность инсулина — является ключевым звеном патогенеза сахарного диабета 1-го типа. Нарушение действия инсулина на ткани — относительная инсулиновая недостаточность — имеет важное место в развитии сахарного диабета 2-го типа.

История открытия инсулина связана с именем русского врача И.М. Соболева (вторая половина 19 века), доказавшего, что уровень сахара в крови человека регулируется специальным гормоном поджелудочной железы.

В 1922 году инсулин, выделенный из поджелудочной железы животного, был впервые введен десятилетнему мальчику, больному диабетом. результат превзошел все ожидания, и уже через год американская фирма «Eli Lilly» выпустила первый препарат животного инсулина.

После получения первой промышленной партии инсулина в последующие несколько лет пройден огромный путь его выделения и очистки. В результате гормон стал доступен для больных сахарным диабетом 1 типа.

В 1935 году датский исследователь Хагедорн оптимизировал действие инсулина в организме, предложив пролонгированный препарат.

Первые кристаллы инсулина были получены в 1952 году, а в в1954 году английский биохимик Г.Сенджер расшифровал структуру инсулина. Развитие методов очистки гормона от других гормональных веществ и продуктов деградации инсулина позволили получиь гомогенный инсулин, называемый однокомпонентным.

В начале 70-х г.г. советскими учеными А.Юдаевым и С. Швачкиным был предложен химический синтез инсулина, однако осуществление данного синтеза в промышленном масштабе было дорогостоящим и нерентабельным.

В дальнейшем шло прогрессирующее улучшение степени очистки инсулинов, что уменьшало проблемы, обусловленные инсулиновой аллергией, нарушениями работы почек, расстройством зрения и иммунной резистентностью к инсулину. Был необходим наиболее эффективный гормон для заместительной терапии при сахарном диабете – гомологичный инсулин, то есть инсулин человека.

В 80- годах достижения молекулярной биологии позволили синтезировать с помощью E.coli обе цепи человеческого инсулина, которые были затем соединены в молекулу биологически активного гормона, а в Институте биоорганической химии РАН получен рекомбинантный инсулин с использованием генно-инженерных штаммов E.coli.

Использование аффинной хромотографии значительно снизило содержание в препарате загрязняющих белков с более высокой м.м., чем у инсулина. К таким белкам относятся проинсулин и частично расщепленные проинсулины, которые способны индуцировать выработку антиинсулиновых антител.

Использование человеческого инсулина с самого начала терапии сводит к минимуму возникновение аллергических реакций. Человеческий инсулин быстрее абсорбируется и независимо от формы препарата имеет более короткую длительность действия, чем животные инсулины. Человеческие инсулины менее иммуногены, чем свиные, особенно смешанные бычьи и свиные инсулины.

#

# 1. Типы инсулина

Препараты инсулина отличаются друг от друга по степени очистки; источнику получения (бычий, свиной, человеческий); веществам, добавляемым к раствору инсулина (удлиняющим его действие, бактериостатикам и т.д.); концентрации; величине рН; возможности смешивания ИКД с ИПД.

Препараты инсулина различаются по источнику получения. Инсулин свиньи и быка отличается от человеческого по аминокислотному составу: бычий - по трем аминокислотам, а свиной - по одной. Неудивительно, что при лечении бычьим инсулином побочные реакции развиваются гораздо чаще, чем при терапии свиным или человеческим инсулином. Эти реакции выражаются в иммунологической инсулинорезистентности, аллергии к инсулину, липодистрофиях (изменении подкожножировой клетчатки в месте инъекции).

Несмотря на явные недостатки бычьего инсулина, он все еще широко используется в мире. И все же недостатки бычьего инсулина в иммунологическом плане очевидны: его ни в коем случае не рекомендуется назначать больным впервые выявленным сахарным диабетом, беременным или для кратковременной инсулинотерапии, например в периоперационном периоде. Отрицательные качества бычьего инсулина сохраняются и при использовании его в смеси со свиным, поэтому смешанные (свиной+бычий) инсулины также не стоит использовать для терапии указанных категорий больных.

Препараты инсулина человека по химической структуре полностью идентичны человеческому инсулину.

Основной проблемой биосинтетическиго метода получения инсулина человека является полная очистка конечного продукта от малейших примесей использованных микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности. Новые методы контроля качества гарантируют, что биосинтетические инсулины человека вышеперечисленных производителей свободны от каких-либо вредных примесей; таким образом, их степень очистки и сахароснижающая эффективность отвечают самым высоким требованиям и являются практически одинаковыми. Каких-либо нежелательных побочных действий, зависящих от примесей, эти препараты инсулина не имеют.

В настоящее время в медицинской практике используют инсулины трех типов:

- короткодействующие с быстрым началом эффекта;

- средней продолжительности действия;

- длительного действия с медленным проявлением эффекта.

Таблица 1. Характеристики коммерческих препаратов инсулина

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Тип инсулина  | Синонимы  | Удлинитель  | Консервант  | Буфер/соли  | Bиды  | Примеры (торговые названия)  |
| Короткого действия  | "Простой", растворимый  | Нет  | Метилпарабен m-Крезол Фенол  | NaCl Глицерин Na(H)PO4 Ацетат Na  | Человеч. Свиной Бычий  | Актрапид-НМ, Хумулин-Р Актрапид, Актрапид-МС Инсулин для инъекций (СССР, более не производится)  |
| НПХ (NPH)  | Изофан  | Протамин  | m-Крезол Фенол  | Глицерин Na(H)PO4  | Человеч. Свиной Бычий  | Протафан-НМ, Хумулин-Н Протафан-МС Протамин-инсулин (СССР, более не производится)  |
| Ленте  | Инсулин-цинк-суспензия (смешанн.)  | Цинк  | Метилпарабен  | NaCl Ацетат Na  | Человеч. Свиной Бычий  | Монотард-НМ, Хумулин-цинк Монотард-МС, Ленте-МС Ленте  |
| Ультра-ленте  | Инсулин-цинк-суспензия (кристалл.)  | Цинк  | Метилпарабен  | NaCl Ацетат Na  | Человеч. Бычий  | Ультраленте Ультратард  |

Инсулин короткого действия (ИКД)– регулярный инсулин – представляет собой короткодействующий растворимый при нейтральном значении рН кристаллический цинк-инсулин, эффект которого развивается в течение 15 минут после подкожного введения и продолжается 5-7 часов.

Первый инсулин продленного действия (ИПД) был создан в конце 30-х гг., чтобы больные смогли делать инъекции реже, чем это было при использовании только ИКД, - по возможности один раз в сутки. С целью увеличения длительности действия все другие препараты инсулина модифицированы и при растворении в нейтральной среде образуют суспензию. Они содержат протамин в фосфатном буфере – протамин-цинк-инсулин и НПХ (нейтральный протамин Хагедорна) – НПХ-инсулин или различные концентрации цинка в ацетатном буфере – инсулины ультраленте, ленте, семиленте.

Препараты инсулина средней продолжительности действия содержат протамин, представляющий белок средней м.м. 4400, богатый аргинином и получаемый из молок радужной форели. Для образования комплекса требуется соотношение протамина и инсулина 1:10. после подкожного введения протеолитические ферменты разрушают протамин, позволяя инсулину всасываться.

НПХ-инсулин не изменяет фармакокинетический профиль смешиваемого с ним регуляторного инсулина. НПХ-инсулин предпочтительнее инсулина ленте в качестве компонента средней длительности действия в терапевтических смесях, содержащих регулярный инсулин.

В фосфатном буфере все инсулины легко образуют кристаллы с цинком, но только кристаллы бычьего инсулина обладают достаточной гидрофобностью, чтобы обеспечить замедленное и стабильное высвобождение инсулина, характерного для ультраленте. Цинковые кристаллы свиного инсулина растворяются быстрее, эффект наступает раньше, длительность действия короче. Поэтому не существует препарата ультраленте, содержащего только свиной инсулин. Монокомпонентный свиной инсулин выпускают под названием инсулин-суспензия, инсулин-нейтрал, инсулин-изофан, инсулин-аминохинурид.

Инсулин ленте – это смесь 30% инсулина семиленте (аморфный преципитат инсулина с ионами цинка в ацетатном буфере, эффект которого развеивается относительно быстро) с 70% инсулина ультраленте (плохо растворимый кристаллический цинк-инсулин, имеющий замедленное начало и пролонгированное действие). Эти два компонента обеспечивают комбинацию с относительно быстрой абсорбцией и стабильным длительным действием, делая инсулин-ленте удобным терапевтическим средством.

# 2. Получение инсулина

Инсулин человека можно производить четырьмя способами:

1) полным химическим синтезом;

2) экстракцией из поджелудочных желез человека (оба этих способа не подходят из-за неэкономичности: недостаточной разработанности первого способа и недостатка сырья для массового производства вторым способом);

3) полусинтетическим методом с помощью ферментно-химической замены в положении 30 В-цепи аминокислоты аланина в свином инсулине на треонин;

4) биосинтетическим способом по генноинженерной технологии. Два последних метода позволяют получить человеческий инсулин высокой степени очистки.

В настоящее время инсулин человека, в основном, получают двумя способами: модификацией свиного инсулина синтетико-ферментативным методом и генно-инженерным способом.

Инсулин оказался первым белком, полученным для коммерческих целей с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Существует два основных подхода для получения генно-инженерного инсулина человека.

В первом случае осуществляют раздельное (разные штаммы-продуценты) получение обеих цепей с последующим фолдингом молекулы (образование дисульфидных мостиков) и разделением изоформ.

Во втором - получение в виде предшественника (проинсулина) с последующим ферментативным расщеплением трипсином и карбоксипептидазой В до активной формы гормона. Наиболее предпочтительным в настоящее время является получение инсулина в виде предшественника, обеспечивающее правильность замыкания дисульфидных мостиков (в случае раздельного получения цепей проводят последовательные циклы денатурации, разделения изоформ и ренатурации).

При обоих подходах возможно как индивидуальное получение исходных компонентов (А- и В-цепи или проинсулин), так и в составе гибридных белков. Помимо А- и В-цепи или проинсулина, в составе гибридных белков могут присутствовать:

- белок носитель, обеспечивающий транспортировку гибридного белка в периплазматическое пространство клетки или культуральную среду;

- аффинный компонент, существенно облегчающий выделение гибридного белка.

При этом оба эти компонента могут одновременно присутствовать в составе гибридного белка. Кроме этого, при создании гибридных белков может использоваться принцип мультимерности, (то есть, в гибридном белке присутствует несколько копий целевого полипептида), позволяющий существенно повысить выход целевого продукта.

В Великобритании с помощью E.coli синтезированы обе цепи человеческого инсулина, которые затем были соединены в молекулу биологически активного гормона. Чтобы одноклеточный организм мог синтезировать на своих рибосомах молекулы инсулина, необходимо снабдить его нужной программой, то есть ввести ему ген гормона.

Химическим способом получают ген, программирующий биосинтез предшественника инсулина или два гена, программирующие в отдельности биосинтез цепей А и В инсулина.

Следующий этап – включение гена предшественника инсулина (или гены цепей порознь) в геном E.coli – особого штамма кишечной палочки, выращенного в лабораторных условиях. Эту задачу выполняет генная инженерия.

Из E.coli вычленяют плазмиду соответствующей рестриктазой. синтетический ген встраивается в плазмиду (клонированием с функционально активной С-концевой частью β-галактозидазы E.coli). В результате E.coli приобретает способность синтезировать белковую цепь, состоящую из галактозидазы и инсулина. Синтезированные полипептиды отщепляют от фермента химическим путем, затем проводят и очистку. В бактериях синезируется около100000 молекул инсулина на бактериальную клетку.

Природа гормонального вещества, продуцируемого E.coli, обусловлена тем, какой ген встраивается в геном одноклеточного организма. Если клонирован ген предшественника инсулина, бактерия синтезирует предшественник инсулина, который подвергается затем обработке рестриктазами для отщепления препитида с вычленением С-пептида, вследствие чего получается биологически активный инсулин.

Для получения очищенного инсулина человека выделенный из биомассы гибридный белок подвергают химко-ферментативной трансформации и соответствующей хроматографической очистке (фпрнтальной, гельпроникающей, анионообменной).

В Институте РАН получен рекомбинантный инсулин с использованием генно-инженерных штаммов E.coli. из выращенной биомассы выделяется предшественник, гибридный белок, экспрессируемый в количестве 40% от всего клеточного белка, содержащий препроинсулин. Превращение его в инсулин in vitroосуществляется в той же последовательности, что и in vivо – отщепляется лидирующий полипептид, препроинсулин превращается в инсулин через стадии окислительного сульфитолиза с последующим восстановительным замыканием трех дисульфидных связей и ферментативным вычленением связывающего С-пептида. После ряда хромотографических очисток, включающих ионообменные, гелевые и ВЭЖХ, получают человеческий инсулин высокой чистоты и природной активности.

Можно использовать штамм со встроенной в плазмиду нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей гибридный белок, который состоит из линейного проинсулина и присоединенного к его N-концу через остаток метионина фрагмента белка А Staphylococcus aureus.

Культивирование насыщенной биомассы клеток рекомбинантного штамма обеспечивает начало производства гибридного белка, выделение и последовательная трансформация которого in tube приводят к инсулину.

Возможен и другой путь: получается в бактериальной системе экспрессии слитой рекомбинантный белок, состоящий из проинсулина человека и присоединенного к нему через остаток метионина полигистидинового "хвоста". Его выделяют, используя хелатную хроматографию на колонках с Ni-агарозой из телец включения и расщепляли бромцианом.

Выделенный белок является S-сульфонированным. Картирование и масс-спектрометрический анализ полученного проинсулина, очищенного ионнообменной хроматографией на анионите и ОФ (обращеннофазовой) ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографией), показывают наличие дисульфидных мостиков, соответствующих дисульфидным мостикам нативного проинсулина человека.

В последнее время пристальное внимание уделяется упрощению процедуры получения рекомбинантного инсулина методами генной инженерии. Так, например, можно получить слитой белок, состоящий из лидерного пептида интерлейкина 2 присоединенного к N-концу проинсулина, через остаток лизина. Белок эффективно экспрессируется и локализуется в тельцах включения. После выделения белок расщепляется трипсином с получением инсулина и С-пептида.

Полученные инсулин и С-пептид очищались ОФ ВЭЖХ. При создании слитых конструкций весьма существенным является соотношение масс белка носителя и целевого полипептида. С-пептиды соединяются по принципу "голова-хвост" с помощью аминокислотных спейсеров, несущих сайт рестрикции Sfi I и два остатка аргинина в начале и в конце спейсера для последующего расщепления белка трипсином. ВЭЖХ продуктов расщепления показывает, что отщепление С-пептида проходит количественно, а это позволяет использовать способ мультимерных синтетических генов для получения целевых полипептидов в промышленном масштабе.

**Заключение**

Сахарный диабет - хроническое заболевание, обусловленное абсолютной или относительной недостаточностью инсулина. Оно характеризующееся глубоким нарушением обмена углеводов с гипергликемией и глюкозурией, а также другими нарушениями обмена веществ в результате воздействия ряда генетических и внешних факторов.

Инсулин до настоящего времени служит радикальным, а в большинстве случаев единственным средством для поддержания жизни и трудоспособности больных сахарным диабетом. До получения и внедрения инсулина в клинику в 1922-1923 гг. больных сахарным диабетом I типа ждал летальный исход в течение одного-двух лет с начала заболевания, несмотря на применение самых изнурительных диет. Больные сахарным диабетом I типа нуждаются в пожизненной заместительной терапии препаратами инсулина. Прекращение в силу тех или иных причин регулярного введения инсулина ведет к быстрому развитию осложнений и скорой гибели больного.

В настоящее время сахарный диабет по распространенности находится на 3-м месте после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. По данным Всемирной организации здравоохранения, распространенность сахарного диабета среди взрослого населения в большинстве регионов мира составляет 2-5 % и имеется тенденция увеличения количества больных почти в два раза каждые 15 лет. Несмотря на очевидный прогресс в области здравоохранения, численность инсулинзависимых больных увеличивается с каждым годом и на текущий момент только в России составляет около 2 миллионов человек.

Создание препаратов отечественного генно-инженерного инсулина человека открывает новые возможности решения многих проблем диабетологии России для спасения жизни миллионов людей, страдающих сахарным диабетом.

**Список литературы**

1. Биотехнология: Учебное пособие для ВУЗов /Под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова.- М.: Высшая школа, 1987, стр. 15-25.
2. Генно-инженерный инсулин человека. Повышение эффективности хроматографического разделения при использовании принципа бифункциональности. / Романчиков А.Б., Якимов С.А., Клюшниченко В.Е., Арутунян А.М., Вульфсон А.Н. // Биоограническая Химия, 1997 - 23, № 2
3. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002.
4. Егоров Н. С., Самуилов В. Д. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов // Биотехнология. Кн. 2. М.: Высшая школа, 1988. 208 с.
5. Иммобилизация трипсина и карбоксипептидазы В на модифицированных кремнеземах и их применение в превращении рекомбинантного проинсулина человека в инсулин. / Кудрявцева Н.Е., Жигис Л.С., Зубов В.П., Вульфсон А.И., Мальцев К.В., Румш Л.Д. // Хим.-фармац. ж., 1995 - 29, № 1 стр. 61 - 64.
6. Молекулярная биология. Структура и функции белков./ Степанов В. М.// Москва, Высшая школа, 1996.
7. Основы фармацевтической биотехнологии: Учебное пособие / Т.П. Прищеп, В.С. Чучалин, К.Л. Зайков, Л.К. Михалева. – Ростов-на-Дону.: Феникс; Томск: Издательство НТЛ, 2006.
8. Синтез фрагментов инсулина и изучение их физико-химических и иммунологических свойств. / Панин Л.Е., Тузиков Ф.В., Потеряева О.Н., Максютов А.З., Тузикова Н.А., Сабиров А.Н. // Биоорганическая Химия, 1997 - 23, № 12 стр. 953 - 960.