

УДК 615.3

КИЗЕЛЬГУР ПРИ ОСАЖДЕНИИ ПРИМЕСНЫХ БЕЛКОВ В ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ГИБРИДНОГО ПРЕДШЕСТВЕННИКА ИНСУЛИНА

А.Е. Полудин^{1*}, Д.А. Гусаров¹, Д.А. Буровик¹

Резюме. В статье описывается возможность промышленного применения кизельгура при осаждении примесных белков. В результате проведенных опытов и проанализированных результатов показана эффективность применения кизельгура в работе. Продемонстрировано, что с помощью кизельгура удается значительно повысить скорость осаждения балластных белков в производственной технологии получения рекомбинантного гибридного белка инсулина предшественника.

Ключевые слова: кизельгур, примесные белки, осаждение, гибридный белок инсулин.

DIATOMACEOUS EARTH DURING THE DEPOSITION OF THE IMPURITY PROTEINS IN THE PRODUCTION OF HYBRID PRECURSOR OF INSULIN

А.Е. Poludin^{1*}, D.A. Gusarov¹, D.A. Burovik¹

Abstract. The article describes the goal of utilization of diatomaceous earth for the impurities of protein nature sedimentation. The experiments done showed and proved the efficiency of diatomaceous earth as a flocculation agent in the insulin fusion protein production. It was shown that insulin fusion protein being in the solution might be easily separated from admixtures by means of isoelectric point sedimentation with a success help of diatomic earth facilitation the precipitation.

Keywords: diatomaceous earth, impurity proteins, precipitation, insulin fusion protein.

1 – ОАО «Герофарм-Био», 142279, Россия, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск

1 – «GEROPHARM-Bio», Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, 142279, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: poludin@list.ru

ВВЕДЕНИЕ

Препараты на основе генно-инженерного инсулина человека в настоящее время являются основным вариантом заместительной терапии сахарного диабета. При этом наиболее известным и зарекомендовавшим себя способом получения инсулина является технология рекомбинантных ДНК, манипулирующая генным материалом продуцентов бактериальной или дрожжевой природы с целью биосинтеза рекомбинантного предшественника (РП) инсулина. В свою очередь, инсулин может быть легко выделен из РП посредством методов ферментативного расщепления и/или процессинга [1].

В свою очередь, РП синтезируется в клетках продуцента, как правило, в виде нерастворимых в физиологических условиях агрегатов, так называемых телец включения (ТВ). И первой стадией даунстрим-процесса получения инсулина, очевидно, является выделение РП из ТВ. При этом РП должен приобрести правильную третичную структуру, быть в мономерной конформации, и, кроме того, должен быть очищен от балластных примесей (которые синтезируются продуцен-

том помимо целевых ТВ), мешающих последующим операциям ферментативного расщепления и процессинга с образованием нативной молекулы инсулина [2].

На производстве ОАО «Герофарм-Био» получают генно-инженерный инсулин человека путем культивирования штамма-продуцента *Escherichia coli*, выделения ТВ, содержащих РП, растворение в хаотропных условиях и восстановление дисульфидных связей (процесс денатурации). Затем с помощью процедуры ренатурации целевому продукту РП придают корректную третичную структуру с одновременным нативным замыканием дисульфидных связей.

Однако одной из проблем данного способа являются примесные балластные белки *E. coli*, которые не позволяют эффективно выделить из ренатурированного РП молекулу инсулина в ходе последующих стадий процесса.

Цель данного исследования – изучить возможность применения процедуры флокуляции с помощью диатомитовой замли (кизельгура) балластных примесей и получения очищенного ренатурированного РП.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Во всех опытах использовали тельца включения, полученные на производстве ОАО «Герофарм-Био» (Оболенск, Россия) в ходе промышленной ферментации штамма-произдента *E. coli* JM109/pPins 07. В работе использовали реакторы вместимостью 1000 л (Olsa S.p.A, Италия) и кизельгур фирмы PALL SeitzSchenk SUPER (Pall GMBH, Германия). Степень флокуляции оценивали визуально, содержание целевого белка – с помощью метода контроля на основе фармакопейной ОФ-ВЭЖХ [3]. Кратко: проводили анализ на приборе Dionex 3000 (Thermo Scientific, Германия), оснащенном плунжерным насосом высокого давления, DAD-детектором, термостатом колонки и автосэмплером. Хроматографирование проводили на колонке Luna(2) C18, 5 мкм, 10 нм, размером 250x4,6 мм (Phenomenex, США). Детектирование проводили при длине волны 214 нм. Подвижные фазы готовили как описано в [3]: подвижная фаза А состояла из 10 % об. ацетонитрила, 20% об. сульфатного буфера с рН 2,0, 70% об. воды для инъекций; подвижная фаза Б состояла из 40% об. ацетонитрила, 20% об. сульфатного буфера с рН 2,0, 40% об. воды для инъекций. Скорость потока 1 мл/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Флокуляция – разновидность коагуляции [слипание частиц коллоидной системы при их столкновениях в процессе теплового (броуновского) движения, перемешивания или направленного перемешивания во внешнем силовом поле]. Образовавшиеся флокулы без электрического заряда начинают выпадать в осадок. Поэтому в белковой химии используют флокуляцию примесей в условиях, близких к их изоэлектрической точке. Нами было сделано предположение, что скорость флокуляции можно увеличить, если добавить в систему тяжелый и нейтральный флокулянт, например кизельгур.

Диатомит (кизельгур) [4] – осадочная горная порода, состоящая преимущественно из остатков диатомовых водорослей. Обычно рыхлая или слабо цементированная, светло-серого или желтоватого цвета. Границы размеров породы находятся в пределах от 3 мкм до 1 мм, но чаще всего размер частиц достигает 10–200 мкм [5] (рисунок 1).

Наша гипотеза заключалась в следующем. Балластные белки *E. coli* имеют тенденцию к осаждению при рН 5,5-6,5. При этом целевой белок (РП) в этих условиях находится в растворенной форме. После корректировки рН балластные белки начинают оседать, но этот процесс очень длителен. Добавляемый к суспензии кизельгур, будучи сильно пористым и тяжелым материалом с высокой сорбционной активностью, может способствовать ускорению осаждения, выступая в качестве флокулянта. После добавления кизельгура в реактор с суспензией под воздействием силы тяжести кизельгур начинает быстро оседать, поры

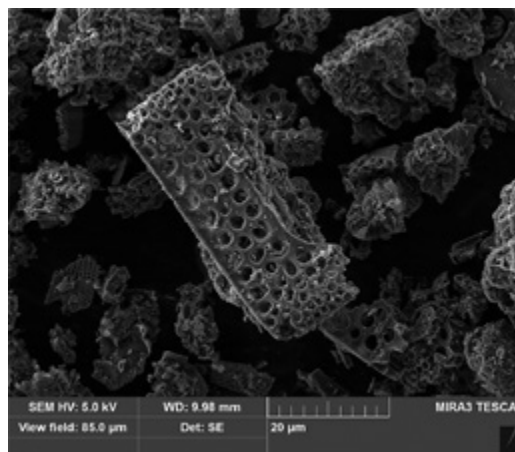


Рисунок 1. Частицы диатомита в микромасштабе (увеличение x5000)

захватывают с собой хлопья, размер которых превышает 10 мкм.

Гипотезу проверяли визуально с помощью отстаивания суспензии балластных белков в растворе РП в мерном цилиндре. Для этого использовали одинаковые мерные цилиндры, в один из которых приливали суспензию без кизельгура, во второй – с 2,5% (масс.) кизельгура, в третий – 5,0%, в четвертый – 10,0% (рисунок 2). В течение 90 мин наблюдали за скоростью и степенью осаждения примесных белков. Замеры по рискам цилиндра послужили основой для построения графического описания процесса флокуляции кизельгуром (рисунок 3). Из графика видно, что добавление кизельгура делает осадок минимальным и увеличивает скорость осаждения. При этом разница между 5 и 10% добавлением кизельгура минимальна. Таким образом, в промышленном формате в реакторах вместимостью 1000 л мы использовали 5% добавление кизельгура к суспензии.

В промышленном масштабе после нескольких производственных серий флокуляции балластных белков из раствора РП стало возможным достоверно определить влияние кизельгура на объем потерь целевого продукта, который остается в сформированном осадке после флокуляции. Очевидно, что чем больше объем осадка, тем больше в нем остатков целевого растворенного РП, и наоборот, чем плотнее осадок, тем меньше потери.

Процесс изучался по результатам десяти производственных циклов: пять циклов осаждения примесных белков без кизельгура и пять циклов осаждения примесных белков с кизельгуром 5,0% (масс.).

Проанализировав данные циклов, построили график полученного объема осадка примесных белков (рисунок 4) и график потерь инсулина, который содержится в осадке (рисунок 5).

Без кизельгура за 12 ч только 80–85% раствора было избавлено от балластных белков. А для того чтобы достичь хотя бы уровня в 10% потерь целевого РП

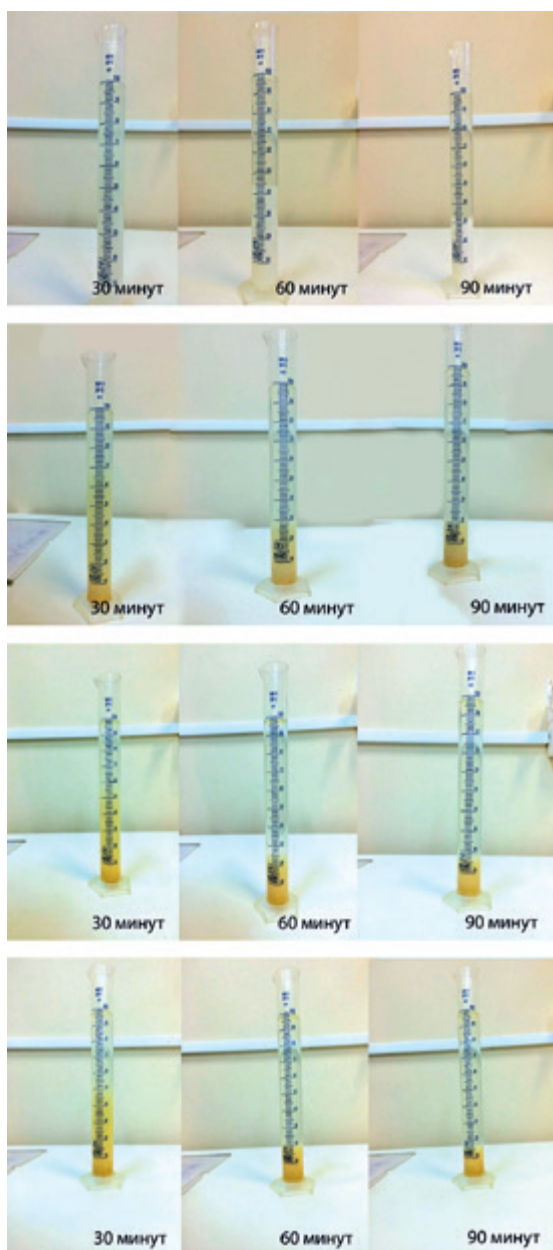


Рисунок 2. Осаждение примесных белков, фото сверху вниз: без кизельгура, с кизельгуром 2,5%, с кизельгуром 5,0%, с кизельгуром 10,0%

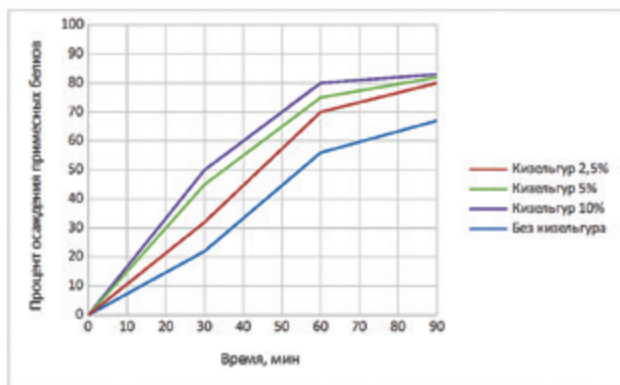


Рисунок 3. Осаждение примесных белков с добавлением и без кизельгура

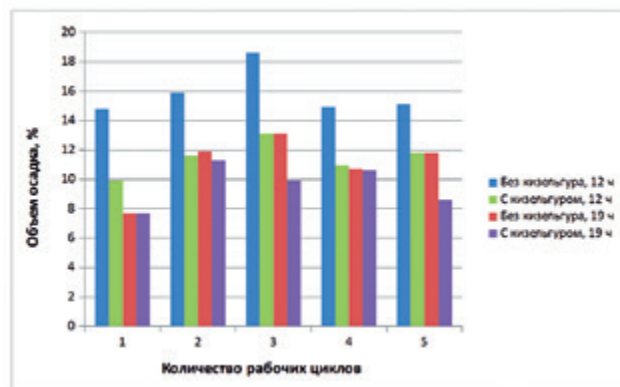


Рисунок 4. Объем осадка примесных белков

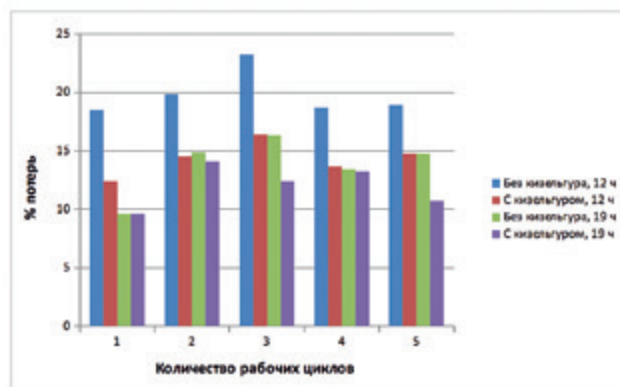


Рисунок 5. Процент потерь инсулина в осадке

в осадке, потребовалось осадить балластные белки в течение 19 ч. В то же время при использовании 5% кизельгура в качестве флокулянта осадок поджимался до 10% объема в среднем на семь часов быстрее.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При использовании кизельгура процесс осаждения примесных соединений проходит быстрее и образуется более плотный осадок, что позволяет сократить количество потерь на стадии флокуляции балластных белков. Кизельгур может быть рекомендован для использования в качестве флокулянта в промышленном масштабе производства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Д.И. Баирамшвили, Е.М. Беликова, Д.А. Кудлай. Анализ отечественного рынка лекарственных препаратов инсулина человека // Биофармацевтический журнал. 2010. Т. 2 (1). С. 3–13.
2. Молекулярная биология. Структура и функции белков / Степанов В.М.: Учеб. для биол. спец. вузов / Под ред. А.С. Спирина – М.: Высшая школа, 1996. 335 с.
3. Европейская Фармакопея, 8.2, электронная версия, статья 01/2011:0838.
4. Геологический словарь: в 2-х томах / Х. А. Арсланова, М. Н. Голубчина, А. Д. Искандерова и др.; под ред. К. Н. Паффенгольца. – 2-е изд., испр. – М.: Недра, 1978.
5. Кизельгур. URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Кизельгур.html> (дата обращения 16.06.2017).