



На правах рукописи

**Гусаров
Дмитрий Алексеевич**

**Разработка эффективной технологии получения
фармацевтических препаратов генно-инженерного инсулина
и его аналогов**

02.00.10 «Биоорганическая Химия»

03.00.23 «Биотехнология»

15 ОКТ 2009

**Автореферат
диссертации
на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Москва 2009

Работа выполнена на кафедре «Химия и технология биологически активных соединений им. Н.А.Преображенского» Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В.Ломоносова и Опытном биотехнологическом производстве Учреждения российской академии наук Института биоорганической химии им. академиком М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН.

Научные руководители: доктор химических наук, профессор
Миронов Андрей Федорович

доктор химических наук,
Баирамшвили Дмитрий Ильич

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор, член-корр. РАН
Северин Евгений Сергеевич

кандидат химических наук,
Бобрускин Алексей Игоревич

Ведущая организация: Федеральное Государственное унитарное предприятие Государственный научный центр Российской Федерации Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов («ГосНИИгенетика»).

Защита диссертации состоится «16» мая 2009 г в 15:00 ч на заседании диссертационного совета Д 212.120.01 в Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В.Ломоносова, по адресу: 119571 Москва, пр. Вернадского, 86.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В.Ломоносова.

С авторефератом диссертации можно ознакомиться на сайте <http://mitht.ru>

Автореферат разослан «8» октября 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,

к.х.н., с.н.с.

Лютик Алла Игоревна

Список сокращений

- ср В - карбоксипептидаза В.
 GMP - good manufacturing practice, правила надлежащего производства.
 SEC - size-exclusion chromatography, высокоэффективная гель-проникающая хроматография.
 АФС - активная фармацевтическая субстанция.
 БЭ - бактериальные эндотоксины.
 ВМП - высокомолекулярные примеси.
 ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография.
 ГИЧ - генно-инженерный инсулин человека.
 дТИ - дезтреонин (В30)-инсулин.
 ИФА - иммуноферментный анализ.
 ЛАЛ-тест - кинетический хромогенный гель-тромб тест на определение содержания бактериальных эндотоксинов (ЛАЛ - лизат амебоцитов леммулуса).
 ЛПС - липополисахариды клеточной стенки штамм-продуцента.
 МЕ - международная единица.
 ОФ - обращенно-фазовый.
 РР - рекомбинантный предшественник.
 ФГ - ферментативный гидролиз.
 ЭЕ - единица измерения бактериальных эндотоксинов.

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы.

Инсулин является одним из наиболее изученных гормонов. С момента открытия того факта, что инсулин, вырабатываемый поджелудочной железой, отвечает за снижение уровня сахара в крови [Banting F.G., Best C.H. / *The Internal Secretion of the Pancreas* // *J. Lab. Clin. Med.* 1922. V.7. P.251-266], до настоящего времени прошло уже более 80 лет. Тем не менее, и по сей день этот гормон вызывает огромный интерес. Сахарный диабет занимает третье место по смертности после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [Barfoed H.C. / *Insulin Production Technology* // *Chem. Eng. Prog.* 1987. V.83. P.49-54; Ladish M.R., Kohlmann K.L. / *Recombinant Human Insulin* // *Biotechnol. Prog.* 1992. V.461. P.469-478]. В 2000 году в мире насчитывалось около 150 миллионов больных сахарным диабетом [Kjeldsen T., Ludvigsen S., Diers I., Balschmidt P., Sorensen A.R., Kaarsholm N.C. / *Engineering Enhanced Protein Secretory Expression in Yeast With Application to Insulin* // *J. Biolog. Chem.* 2002. V.277. P.18245-18248], и эта цифра ежегодно растет на 2-6 % [Klyushnichenko V., Brush R., Bulychev A. / *Feasibility of International Technology Transfer for the Production of Recombinant Human Insulin. Part I: Preparing for Product-Specific Manufacturing on a Global Scale* // *Bioprocess International.* 2004. V.2. P.45-59; Баирамашвили Д.И. / *Генно-инженерный Инсулин Человека: Успехи и Перспективы* // *Рос. Хим. Ж.* 2005. Т.XLIX. №1. С.34-45]. Так, например, к 2010 году прогнозируется увеличение числа страдающих этим заболеванием примерно до 33 миллионов в странах Европы [Zimmer P., Alberti K. / *Shaw Global and Societal Implication of the Diabetes Epidemic* // *Nature.* 2001. V.414. P.782-787], а в нашей стране более 300 тысяч человек нуждаются в регулярном приеме препаратов инсулина. С появлением технологии рекомбинантных ДНК впервые стало возможным производить инсулин в крупных масштабах. Так в 80-е годы XX века

американской компанией Genentech разработана технология производства ГИЧ, которая впоследствии была коммерциализирована корпорацией Eli Lilly [Clark A.J., Adeniyi-Jones R.O., Knight G., Leiper J.M., Wiles P.G., Jones R.H., Keen H., MacCuish A.C., Ward J.D., Watkins P.J., Cauldwell J.M., Glynn A., Scotton J.B. / *Biosynthetic Human Insulin in the Treatment of Diabetes. A Double-Blind Crossover Trial in Established Diabetic Patients.* // *Lancet.* 1982. V.2 (8294). P.354-357]. В настоящее время ежегодное производство АФС инсулина во всем мире превышает 15000 кг [Petrides D., Sapidou E., Calandranis J. / *Computer-Aided Process Analysis and Economic Evaluation for Biosynthetic Human Insulin Production - A Case Study* // *Biotechnol. Bioeng.* 1995. V.48. P.529-541]. К лидирующим производителям ГИЧ относятся такие зарубежные фирмы, как Novo Nordisk (Дания), Eli Lilly (США), Sanofi-Aventis (Германия-Франция). В нашей стране исследования в области генной инженерии и молекулярной биологии позволили Институту биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) при финансовой поддержке Правительства города Москвы, впервые организовать производство полного цикла и выпустить на фармацевтический рынок наиболее востребованные лекарственные формы инсулина.

Разработка конкурентоспособной высокоэффективной технологии получения лекарственных препаратов ГИЧ и других терапевтических белков является одним из основных направлений современной отечественной бифармацевтики. Не менее важно производство аналогов ГИЧ, таких как инсулин-аспарт, инсулин-лизпро, которые существенно улучшают физиологическую динамику инсулина в крови. В инсулине-аспарт модификация молекулы, выраженная в замене остатка пролина (B28) на остаток аспарагиновой кислоты, привела к снижению способности молекулы к самоассоциации. Подобный же эффект был достигнут изменением местами остатков пролина (B28) и лизина (B29) в инсулине-лизпро. Эти модификации способствуют более быстрой абсорбции препаратов в кровь человека после введения.

Современные стандарты качества, принятые как в нашей стране, так и за рубежом предъявляют очень высокие требования к чистоте АФС, предназначенных для производства инъекционных лекарственных препаратов [United States Pharmacopeia. Philadelphia, PA. USA. 2000. (USP24). Suppl. 3; British Pharmacopoeia 1988. London: H.M. Stationary Office. 1988. P.1-312; Фармакопейная Статья Предприятия ФСП 42-0452361302 // 2002. С.1-44]. Однако разделение инсулина и близкородственных ему белков является сложной задачей из-за сходства их физико-химических характеристик.

Цель исследования.

Разработка эффективной отечественной технологической схемы выделения и очистки ГИЧ и его фармацевтических аналогов (инсулина-лизпро и инсулина-аспарт), ее оптимизация, разработка методов внутрипроизводственного контроля.

Задачи исследования.

1. Изучить и оптимизировать процесс ФГ РП с образованием инсулина.
2. Разработать и оптимизировать очистку инсулина методом ВЭЖХ на аналитическом уровне.

3. Масштабировать результаты ВЭЖХ очистки от аналитического до производственного уровня, рассчитать производительность процесса.
4. Разработать и валидировать методы внутрипроизводственного контроля содержания ГИЧ.
5. Провести валидацию процесса очистки инсулина.
6. Разработать процесс получения аналогов инсулина из соответствующих рекомбинантных предшественников (ФГ).
7. Разработать эффективный способ очистки аналогов.

Научная новизна.

1. Разработан метод контроля содержания дТИ в растворах ГИЧ, основанный на аналитической ион-парной ОФ ВЭЖХ.
2. Разработан и валидирован внутрипроизводственный метод контроля содержания ГИЧ, основанный на ОФ ВЭЖХ, более оперативный, чем метод, рекомендованный фармакопейной статьей.
3. Разработан способ получения ГИЧ ферментативным расщеплением РП с предварительно блокированными аминокруппами, что позволило снизить содержание дТИ в растворах ГИЧ до минимума.
4. Изучен процесс фибриллообразования (агрегации) инсулина в растворах с низким значением pH, предложены условия, в которых волокнообразование минимально.
5. Разработан и валидирован эффективный технологический процесс очистки ГИЧ, основанный на ОФ ВЭЖХ в смешанном (элюентном и «вытеснительном») режиме.

Практическая значимость работы.

Разработана и запатентована эффективная технология получения ГИЧ из РП методом ФГ с выходом ГИЧ около 90 % от теоретически возможного. Предложена схема ФГ РП с предварительно блокированными аминокруппами с помощью цитраконового ангидрида и последующим снятием защиты с получением инсулина. Разработан эффективный процесс очистки ГИЧ от примесей, содержание которых регламентировано фармакопейной статьей. Технология в настоящее время успешно внедрена и реализована на Опытном биотехнологическом производстве Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН. Разработана технологическая схема выделения и очистки инсулина-аспарта и инсулина-лизпро, позволившая наработать опытные образцы АФС аналогов инсулина, которые в настоящее время проходят государственную регистрацию.

Апробация работы.

Результаты исследований были изложены на Третьем московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Россия, Москва, 2005), Московской международной конференции «Биотехнология и медицина» (Россия, Москва, 2006), Пятой международной конференции «НПС/РРС Bioseparations» (Швейцария, Ингерлакен, 2007), Пятом

московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Россия, Москва, 2009).

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ, в том числе 10 статей в научных журналах и 1 патент.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа изложена на 177 страницах. Текст содержит 59 рисунков и 15 таблиц. Диссертация состоит из следующих разделов: Введение, Литературный обзор, Результаты и обсуждение, Материалы, приборы и методы, Выводы, Список опубликованных работ, Библиография, содержащая ссылки на 249 публикаций.

Содержание работы

ФГ предшественника инсулина

ФГ РП с образованием инсулина протекает под действием двух ферментов, трипсина и ср В. Схематически процесс можно представить следующим образом (Рис. 1).

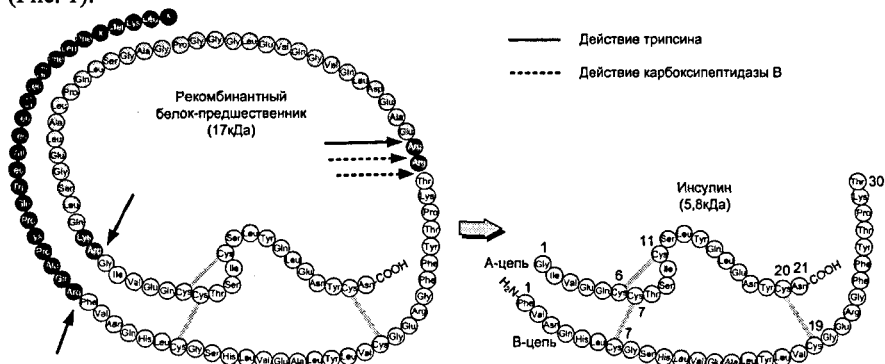


Рис. 1. Схема ферментативного гидролиза.

РП, имеющий молекулярный вес около 17 кДа, гидролизует с образованием инсулина (5808 Да). Трипсин специфично расщепляет пептидную последовательность по остаткам основных аминокислот, в данном случае по остаткам аргинина. Карбоксипептидаза В отщепляет оставшиеся аминокислотные остатки (два аргинина) с С-конца В-цепи. В результате действия ферментов РП превращается в инсулин, лидерный фрагмент, С-пептид (без двух остатков аргинина) и два остатка аргинина. При этом трипсин, отщепив в первую очередь вышеуказанные аминокислотные последовательности, приступает к расщеплению связи между остатками лизина (В30) и треонина (В31). Так образуется побочный продукт, дТИ. Методика, рекомендованная фармакопейными статьями, не

позволяет количественно определять содержание дТИ в инсулиновых препаратах. В то же время близкие физико-химические свойства и подобное хроматографическое поведение инсулина и дТИ серьезно осложняют количественное определение содержания дТИ при выделении и очистке ГИЧ. Однако задача по оптимизации ФГ не может быть решена при отсутствии метода контроля.

Метод контроля содержания дТИ. Путем трипсинолиза в течение 24 ч раствора РП и последующей очистки от примесей был получен контрольный образец дТИ с чистотой 98,0 %. Соответствие продукта трипсинолиза дТИ доказали с помощью С-концевого анализа, а также масс-спектрометрически. В условиях, близких к фармакопейным, было проведено ВЭЖХ-анализ полученного в ходе трипсинолиза инсулина раствора дТИ для определения хроматографической подвижности дТИ. В этих же условиях для сравнения был проанализирован образец человеческого инсулина, полученный после совместного ФГ рекомбинантного препроинсулина. Инсулин и дТИ обладают сходной хроматографической подвижностью, что делает невозможным количественный анализ (Рис. 2).

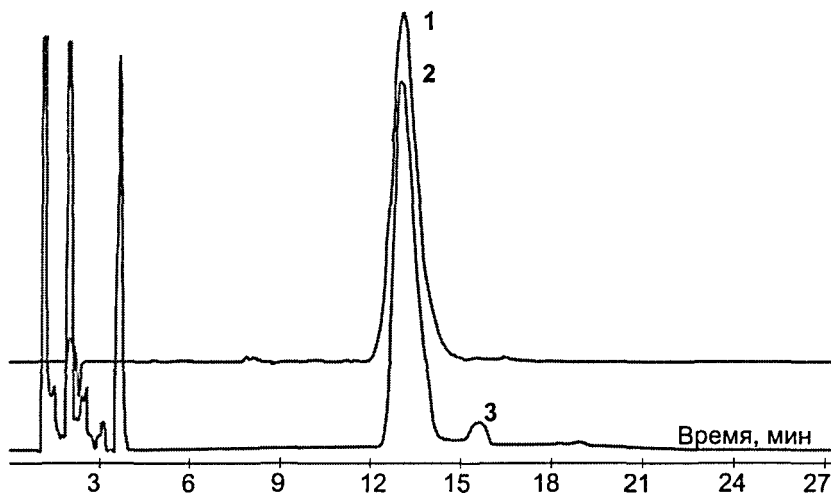


Рис. 2. Хроматограммы образцов человеческого инсулина-сырца и раствора дТИ. Пик 1 соответствует дТИ (98,0 %), пик 2 – инсулину (87,8 %), пик 3 – А21-дезамидоинсулину (8,5 %). Колонка Luna C18-2, 5 мкм, 10 нм (Phenomenex, США). Детектирование при 214 нм. Расход подвижной фазы 1,5 мл/мин. Подвижная фаза А: 10 %-ный раствор ацетонитрила в воде, содержащий 0,1 М сульфата натрия, 0,02 М ортофосфорной кислоты и 0,25 мл/л триэтанолamina. Подвижная фаза В: 50 %-ный раствор ацетонитрила в воде.

Для разделения ГИЧ и дТИ нами было предложено симулировать ионообменные свойства ВЭЖХ-колонны за счет введения в подвижную фазу ион-парных реагентов. Были изучены несколько наиболее часто используемых в хроматографии ион-парных добавок на основе производных сульфоновой кислоты: пентилсульфонат, гексилсульфонат, октилсульфонат и

додецилсульфонат (Рис. 3). Найдено, что добавление солей октилсульфоновой кислоты или додецилсульфоновой кислоты в сходных концентрациях (20 мМ) в подвижную фазу способствует разделению пиков инсулина и дТИ. Однако, после проведения нескольких циклов ВЭЖХ анализов препаратов инсулина в системе, содержащей додецилсульфонат, давление в колонне резко возрастало, делая невозможным ее дальнейшее использование. Это происходило из-за того, что инсулин или родственные ему пептиды образуют нерастворимые комплексы с солями додецилсульфоновой кислоты. Поэтому, для дальнейших анализов использовали исключительно соли октилсульфоновой кислоты.

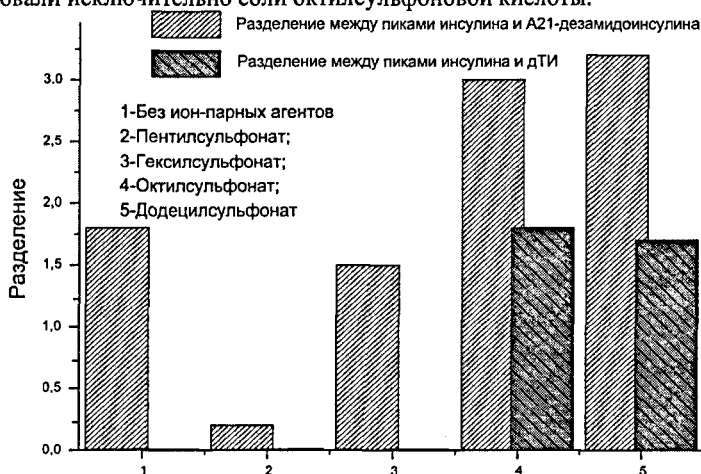


Рис. 3. Влияние ион-парных сурфактантов на разделение между пиками инсулина и A21-дезамидоинсулина и между пиками инсулина и дТИ.

В качестве органического модификатора подвижной фазы использовали этиловый, изопропиловый спирты или ацетонитрил. Показано, что при использовании этанола сорбция пептидов на колонне чрезвычайно высока, что не позволяет регенерировать сорбент. Использование ацетонитрила и изопропанола позволило получить сходные результаты как по времени удержания основного пика, так и по разделению инсулина и дТИ. Следует отметить, что использование ацетонитрила является более целесообразным, т.к. он в несколько раз менее вязкий, чем изопропанол, и элюция сопровождается меньшими значениями давления в колонне. Для снижения значения рН подвижной фазы до 2,0-2,5 в качестве добавок применяли различные кислоты: уксусную, трифторуксусную, лимонную, ортофосфорную. Найдено, что при использовании ортофосфорной или лимонной кислот разделение компонентов смеси происходит наиболее полно (Рис. 4).



Рис. 4. Влияние различных кислот в составе подвижных фаз на разделение между пиками инсулина и A21-дезамидоинсулина и между пиками инсулина и дТИ.

Таким образом, были найдены и оптимизированы условия для ВЭЖХ-анализа содержания дТИ в препаратах инсулина: подвижная фаза, содержащая 20 мМ октилсульфоната натрия, 30мМ лимонной (или ортофосфорной) кислоты и 39-41 % ацетонитрила в воде для инъекций, обеспечила разделение инсулина и дТИ не менее 1,8 (Рис. 5).

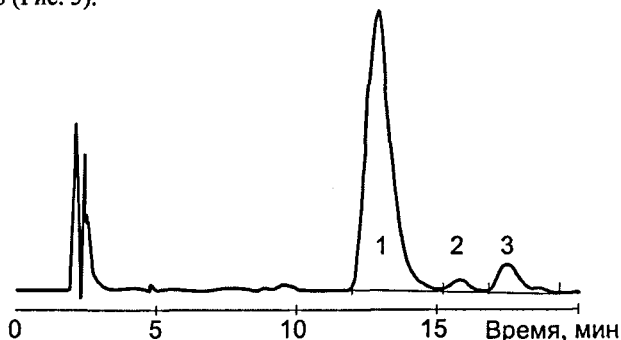


Рис. 5. Хроматографический анализ модельной смеси инсулина и примесных полипептидов. Условия анализа в тексте. Пик 1 соответствует инсулину, пик 2 – дТИ, пик 3 – A21-дезамидоинсулину.

Время анализа составило 20 мин.

Температура гидролиза РП. Скорость гидролиза РП сильно зависит от температуры (Рис. 6). При повышенной температуре (+36°C) гидролиз завершается через 4-5 ч после добавления ферментов, в то время как при пониженной температуре (+6°C) для этого требуется более 20 ч. При комнатной

температуре гидролиз завершался через 8 ч. Однако содержание дТИ резко возрастало с увеличением температуры гидролиза и составило 9,3 % при 36°C. При проведении гидролиза при пониженной температуре содержание дТИ составило менее 4,0 % от общего содержания белка (Рис. 7). Интересно, что повышение температуры сильнее всего сказывалось на содержании дТИ, в то время как выход инсулина и содержание родственных примесей изменяется не сильно (Таблица 1). Изменение концентрации полипептидов во времени нелинейно и их содержание достигает определенного значения через некоторый промежуток времени, далее не изменяясь.

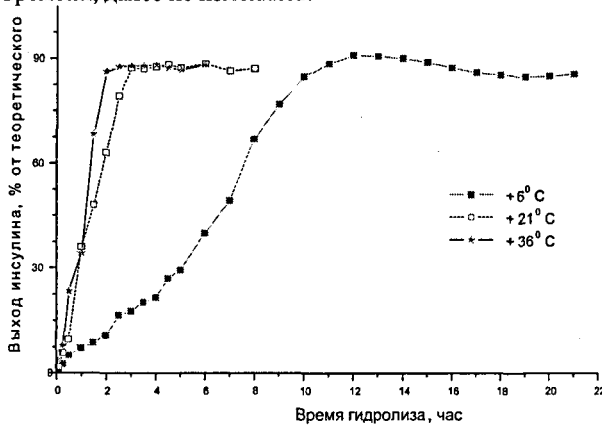


Рис. 6. Зависимость протекания гидролиза от температуры.

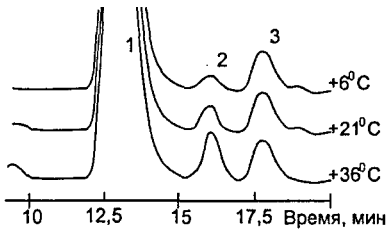


Рис. 7. Хроматограмма гидролизата РП на момент окончания гидролиза при различных температурах. Пик 1 - инсулин; пик 2 - дТИ; пик 3 - A21-дезамидоинсулин. Колонна YMC-Pack ODS-A 125 x 2,1 мм, скорость потока 0,3 мл/мин, элюент: 20 мМ октисульфат натрия, 0,2 % ортофосфорная кислота, 40 % ацетонитрил, температура 40°C.

Таблица 1. Результаты гидролизом, проведенных при различных температурах

Температура, °C	дТИ, %	Прочие примеси, %	Выход ГИЧ, % от теор.
+6	3,87	15,8	80,2
+21	5,54	16,4	78,3
+36	9,31	18,2	72,6

Оптимальной для проведения гидролиза является температура +6°C, при которой, несмотря на длительность процесса, достигается минимальное содержание дТИ. По-видимому, в течение первых 4 часов преимущественно протекает реакция трипсинолиза без вовлечения ср В. По мере накопления в системе продуктов трипсинолиза (ди-Arg (B31)-Arg (B32)-инсулина и моно-Arg (B31)-инсулина) в реакцию вступает ср В, которая отщепляет оставшиеся остатки аргининов с С-конца.

Соотношения реагентов. Трипсин и ср В являются дорогостоящими реагентами, поэтому необходимо было определить минимальное соотношение фермент/субстрат, при котором в процессе гидролиза достигается минимальное содержание инсулиноподобных пептидов (без учета A21-дезамидоинсулина), особенно дТИ, а выход инсулина не ниже 30 % (т.е. 90 % от теоретически возможного, равного примерно 33 %). Концентрация трипсина варьировалась от 0,5 до 3 мг/л (отношение фермент/субстрат составляет 1/21500 и 1/3600 соответственно) при постоянной концентрации ср В 2,3 мг/л (соотношение фермент/субстрат 1/4500). Из полученных данных (Рис. 8) видно, что минимальное содержание инсулиноподобных пептидов достигалось при поддержании концентрации трипсина выше 1 мг/л. Однако с ростом концентрации трипсина резко увеличивалось содержание дТИ, причем при концентрации трипсина выше 1,4 мг/л содержание этой примеси превышало 5 %. Выход инсулина с ростом концентрации трипсина увеличивался и выходил на плато (около 30 %) при концентрации трипсина 1,4 мг/л и выше. Таким образом, для проведения гидролиза оптимальной является концентрация трипсина от 1 до 1,4 мг/л (отношение фермент/субстрат 1/11000 и 1/7500 соответственно).

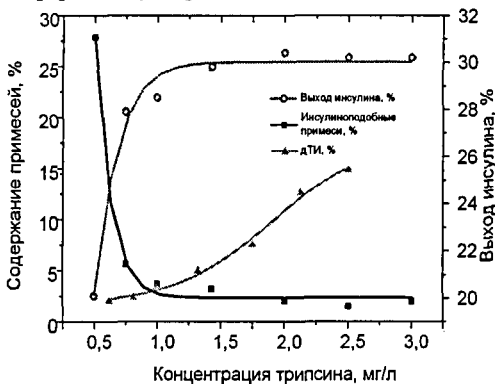


Рис. 8. Влияние концентрации трипсина на содержание примесей и выход инсулина.

Концентрация ср В варьировалась от 0,25 до 7,5 мг/л (отношение фермент/субстрат 1/42000 и 1/1400 соответственно) при постоянной концентрации трипсина 1,4 мг/л (соотношение фермент/субстрат 1/7500). Из представленных данных (Рис. 9) видно, что при концентрации ср В, равной

1,5 мг/л и выше, содержание родственных пептидов составляло около 2,5 %, а дТИ - порядка 4 %. При этом выход инсулина составил 30-32 %. С экономической точки зрения нерентабельно поддерживать в реакционной смеси высокую концентрацию ср В, поэтому оптимальной является концентрация от 1,5 до 2 мг/л (соотношение фермент / субстрат 1 / 7000 и 1 / 5500, соответственно).

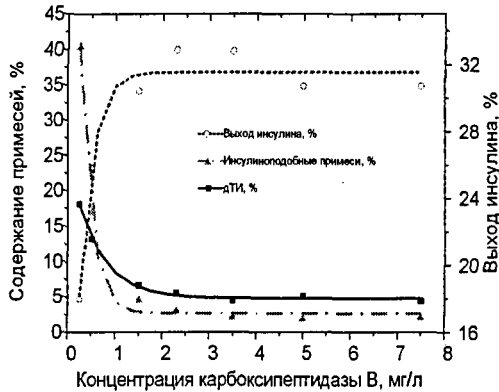


Рис. 9. Влияние концентрации ср В на содержание примесей и выход инсулина.

Таким образом, в реакционной смеси рекомендуется поддерживать соотношения трипсин/РП от 1/11000 до 1/7500, карбоксипептидаза В/РП от 1/7000 до 1/5500. При этом отношение трипсин/карбоксипептидаза В составит около 1,5/1,0.

Концентрация РП. Поскольку проведение реакции гидролиза в промышленном масштабе требует высоких конечных концентраций инсулина для сокращения объема реакции и удобства дальнейшей очистки, было изучено влияние концентрации РП на протекание процесса гидролиза. Концентрация РП варьировалась в пределах от 6,2 до 13,6 мг/мл, поддерживались соотношения трипсин/РП 1/7500 (концентрация трипсина 1,43 мг/л), ср В/РП 1/5500 (концентрация ср В 2,0 мг/л). Показано, что концентрация инсулина, получаемого в процессе гидролиза, практически пропорциональна исходной концентрации РП (Рис. 10). Однако кривая выхода имеет четко выраженный максимум в диапазоне концентраций РП от 9 до 10,5 мг/мл. По-видимому, это объясняется тем, что процесс гидролиза при высоких концентрациях РП протекал не полностью, и для его завершения необходим достаточно длительный период времени. В образцах с исходной концентрацией РП более 11 мг/мл наблюдалось наиболее высокое содержание инсулиноподобных примесей и наименьшее содержание дТИ, что подтверждает предположение о незавершенности гидролиза, поскольку дТИ является продуктом распада инсулина. В образцах с наименьшими исходными концентрациями РП содержание дТИ максимально, т.к. для завершения процесса требовалось меньшее количество времени.

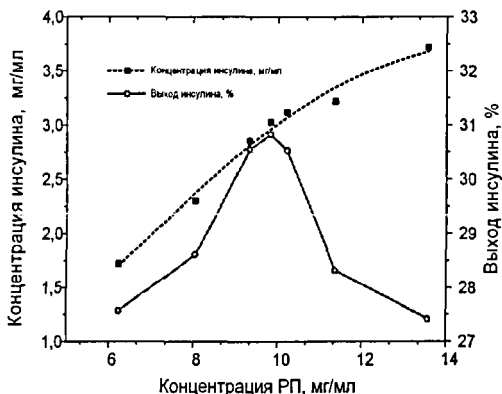


Рис. 10. Влияние концентрации РП на выход и концентрацию инсулина.

Интересно, что сумма всех инсулиноподобных полипептидов (кроме А21-дезаминоинсулина), включая дТИ, имела выраженный минимум при концентрации РП в диапазоне от 9,5 до 10,5 мг/мл (Рис. 11).

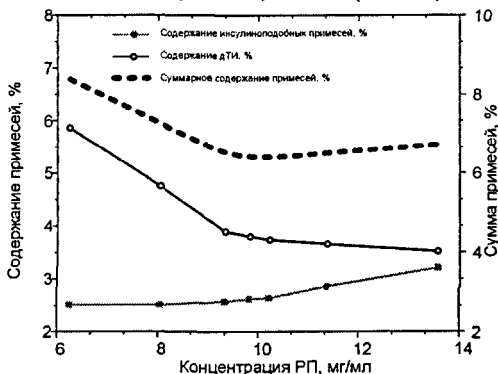


Рис. 11. Влияние концентрации РП на содержание примесей.

Таким образом, для проведения гидролиза оптимальной является исходная концентрация РП 9,5-10 мг/мл; при этом достигается конечная концентрация инсулина около 3 мг/мл (т.е. выход инсулина около 30 %, или примерно 90 % от теор.); содержание дТИ составляет 4% и менее, а содержание инсулиноподобных полипептидов – около 2,5 %.

Гидролиз РП с блокированными аминокруппами. Как было отмечено выше, трипсин обладает уникальной специфичностью к основным аминокислотным остаткам, что является причиной образования побочного продукта - дТИ. Однако, если лизин (В29) обратимо модифицировать, то образование примесного дТИ

можно минимизировать. Для этой цели нами предложено обратимо модифицировать аминокислотные группы РП перед гидролизом с помощью цитраконового ангидрида. В ходе этой реакции аминокислотные группы, включая ϵ -аминокислотные группы лизина, приобретают отрицательный заряд, который мешает узнаванию трипсином. После проведения ФГ с полученного инсулина снимают ацилированную защиту путем снижения значения pH раствора. Нами были детально изучены процессы блокирования и деблокирования остатков лизина в РП. Блокирование РП протекает достаточно быстро (в пределах 1 ч) в широком диапазоне температур от 5 до 37⁰С. Однако, при повышенных температурах (выше 20-22⁰С) после внесения ферментов субстратный белок выпадает в осадок, что существенно ухудшает дальнейший процесс гидролиза. Поэтому блокирование проводили при комнатной температуре, а гидролиз - при 30-35⁰С (при такой температуре гидролиз проходит за 3-5 ч). Количество цитраконового ангидрида, необходимое для блокирования РП, варьировалось в диапазоне от 0,1 до 2,0 г ангидрида/г РП. Определено, что наименьшее содержание дТИ и максимальный выход ГИЧ наблюдаются при использовании ангидрида в концентрации 0,25-0,5 г/г (Рис. 12).

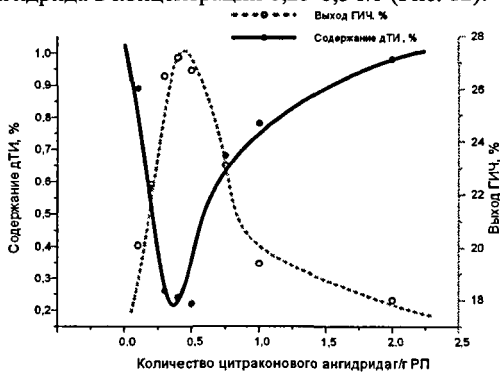


Рис. 12. Влияние цитраконового ангидрида на результаты гидролиза РП.

Деблокирование проводили при комнатной температуре, подкисляя гидролизат до pH 3,0 ледяной уксусной кислотой. Общее время деблокирования - 24 часа. В результате гидролиза РП, с предварительно модифицированным лизином (В29), и последующего снятия цитраконовой защиты с выходом около 83 % от теор. был получен инсулин, содержащий менее 0,5 % дТИ, а также менее 2 % дезамидоинсулина и 14 % других инсулиноподобных примесей.

Разработка и валидация метода внутривидового контроля содержания ГИЧ

Необходимым условием создания эффективного производства является постоянный контроль результатов каждой стадии: качественная и количественная оценка всех полупродуктов и продуктов. Нами разработан и валидирован метод производственного контроля инсулина с помощью ВЭЖХ, условия которого

отличались от описанных в фармакопейной статье. Это связано с необходимостью создания методики анализа, более оперативной, чем рекомендуется нормативной документацией, чтобы быстро и с достаточной достоверностью оценивать основные показатели производственных процессов. Безусловно, возможность использования разработанной методики в качестве производственного контроля должна быть доказана с помощью валидации. Метод позволяет анализировать образцы инсулина с концентрацией от 0,04 до 3,00 мг/мл – в этом диапазоне получаемые значения площадей пиков изменяются линейно в зависимости от концентрации образца (коэффициент линейной регрессии 0,99969). Относительная систематическая погрешность предсказываемых значений концентраций составила 1,93 %, т.е. меньше значения метода ВЭЖХ-анализа инсулина, описанного ранее и составившего 2,6 % [Oliva A., Fariña J., Llabrés M. / *Development of Two High-Performance Liquid Chromatographic Methods for the Analysis and Characterization of Insulin and its Degradation Products in Pharmaceutical Preparations // J. Chromatogr. A. 2001. V.749. P.25-34*]. Разработанный метод производственного контроля является правильным и точным, так как значения коэффициентов вариации и относительной систематической погрешности не превышают 15 %. Более того, в нижнем пределе количественной оценки концентрации инсулина коэффициент вариации составил 17,7 %, что меньше, чем рекомендовано GMP (20 %). Показано, что описанный метод обладает высокой специфичностью, позволяющей получать достоверные результаты по количественному содержанию инсулина (чистоте) в его растворах: ни относительная систематическая погрешность, ни коэффициент вариации образцов инсулина, «загрязненных» инсулиноподобными пептидами, не превышают 1 %. Использование колонок для ВЭЖХ YMC ODS-A (YMC Co, Германия), как было продемонстрировано, позволяет получать достоверные результаты даже при некотором отклонении от стандартных условий анализа (уменьшение или увеличение температуры или скорости потока; изменении состава соотношения подвижных фаз; замена одной колонки на другую, упакованную той же маркой сорбента). Следовательно, метод является устойчивым к таким вариациям.

Разработка и валидация процесса очистки ГИЧ с помощью ВЭЖХ

Процедура очистки ГИЧ от примесей должна позволять получать продукт с высоким выходом и чистотой. Мы ставили себе целью добиться такой чистоты белка, чтобы содержание родственных примесей было не выше 1,0 %, A21-дезамидоинсулина - не выше 1,0 %, БЭ - не выше 10 Ед/мг, проинсулинподобных полипептидов - не выше 10 нг/мг, ВМП - не выше 1 %. При этом выход основного продукта должен быть не менее 80%. Операционные параметры должны быть совместимы с физико-химическими свойствами молекулы инсулина. Условия должны обеспечивать хорошую растворимость, избегая при этом крайних значений кислотности среды в силу возможной денатурации белка или уменьшения его активности. Процесс очистки должен быть совместим с остальными производственными стадиями. Поскольку A21-дезамидоинсулин наиболее близок по хроматографическим свойствам к инсулину, очистка

инсулина от него наиболее проблематична. Поэтому, при решении поставленных задач, приоритет отдавался очистке от А21-дезамидоинсулина.

Подвижная фаза. Состав подвижной фазы является краеугольным камнем оптимизации процесса хроматографической очистки. Корректно подобранная подвижная фаза может позволить существенно увеличить выход чистого продукта и снизить его себестоимость. Подвижная фаза для ОФ ВЭЖХ состоит из трех основных компонентов: воды, органического модификатора и буферного вещества (или веществ), обеспечивающих необходимый рН раствора. Во всех опытах мы использовали дистиллированную воду, удовлетворяющую требованиям к воде для инъекций (содержание БЭ не превышает 0,005 ЭЕ/мл). В качестве органического модификатора был использован этиловый спирт, как дешевый и наименее токсичный вариант. Дальнейшая оптимизация была связана с необходимостью определения диапазона рН подвижной фазы, в котором разделение между инсулином и родственными примесями максимально. При фиксированных временах удержания степень разделения инсулина и А21-дезамидоинсулина, как оказалось, имеет наибольшие значения в области рН 2,0-3,0 (Рис. 13). При увеличении рН разделение ухудшается. Снижение рН ниже 2,0 отрицательно влияет на неподвижную фазу.

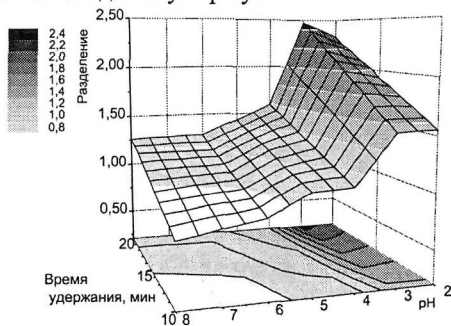


Рис. 13. Зависимость разделения между инсулином и А21-дезамидоинсулином от значения рН подвижной фазы и времени удержания пика инсулина.

Для обеспечения диапазона рН подвижной фазы от 2 до 3 можно применять различные кислоты, как неорганические (наиболее часто используются ортофосфорная, серная, соляная), так и органические (например, лимонная, уксусная, трифторуксусная). При этом наиболее высокие степени разделения наблюдались при использовании серной и ортофосфорной, а также лимонной кислоты (Рис. 14).

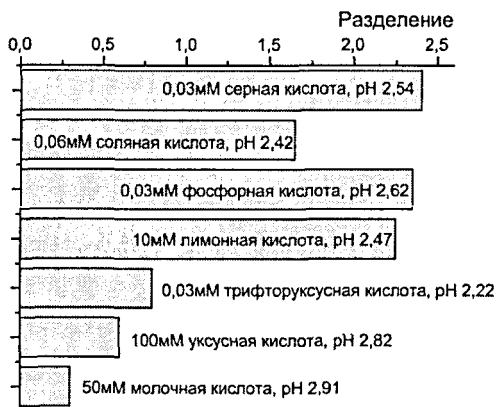


Рис. 14. Влияние различных кислот на разделение между инсулином и А21-дезамидоинсулином.

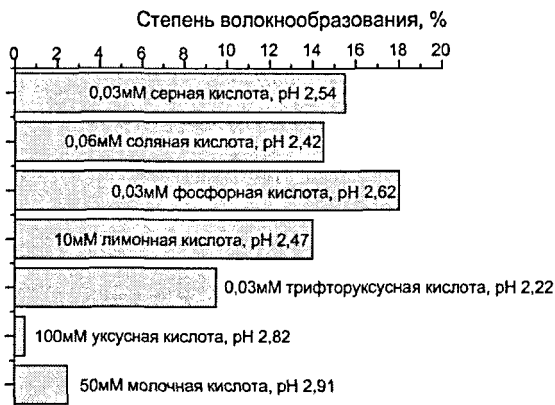


Рис. 15. Степень волокнообразования инсулина в растворах с рН 2,0-3,0.

Однако при использовании подвижных фаз с кислотами с течением времени качество очистки инсулина начинает ухудшаться. Предполагается, что существенный вклад в подобное ухудшение качества работы сорбента вносит процесс образования волокон инсулина. Склонность полипептида к формированию нерастворимых агрегатов может приводить к забиванию пор сорбента и входной фритты колонки, что выражается в первую очередь в ухудшении диффузионных процессов и негативно сказывается на разделении инсулина и примесей, а также в повышении давления, что создает трудности для ведения процесса в целом. Было проведено сравнение различных кислот по их способности влиять на агрегацию инсулина. Данные аналитического ВЭЖХ-

определения падения концентрации инсулина в растворе позволили расположить кислоты в порядке убывания способности вызывать агрегацию: серная \approx фосфорная > соляная \approx лимонная > трифторуксусная > молочная \approx уксусная (Рис. 15).

Наименьшее волокнообразование наблюдается в растворах с уксусной кислотой. Однако при ее использовании не удавалось достичь высоких степеней разделения (Рис. 14). Для улучшения разделения предложено изменить условия хроматографии, применив кроме элюентного режима еще режим «вытеснения». Если молекулы А21-дезамидоинсулина имеют сродство к активным группам сорбента ниже, чем собственно молекулы инсулина, то последние, так как находятся в большей концентрации, могут вытеснять первые из этих активных центров. В результате А21-дезамидоинсулин элюируется из колонны раньше, чем инсулин. Показано, что сложный эфир органической кислоты (например, этилацетат) может проявлять свойства «вытеснителя». Влияние концентрации искусственно добавляемого в подвижную фазу этилацетата было тщательно изучено. Найдено, что максимально высокие степени разделения между инсулином и А21-дезамидоинсулином наблюдаются при содержании этилацетата в подвижной фазе в диапазоне от 1 до 3 % об. (Рис. 16). Ниже 1 % об. концентрации эфира недостаточно для проявления «вытеснительного» эффекта, а выше 3 % во-первых, снижается растворимость эфира в водном растворе, что приводит к образованию эмульсии, а во-вторых, эфир начинает выступать в качестве элюента, причем менее селективного, чем этанол, что негативно отражается на разделении.

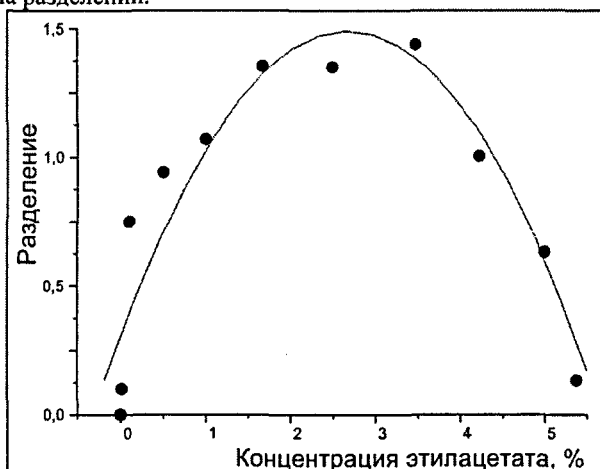


Рис. 16. Влияние концентрации этилацетата на разделение между инсулином и А21-дезамидоинсулином.

Таким образом, подвижная фаза, минимально приводящая к волокнообразованию инсулина и позволяющая максимально разделять инсулин и А21-

дезамидоинсулин, должна состоять из воды для инъекций, этилового спирта, уксусной кислоты (рН 2,0-3,0) и этилацетата (1-3 % об.).

Рабочая нагрузка на сорбент. «Вытеснительный» эффект проявляется, когда колонна существенно перегружена. Тем не менее, слишком высокая перегрузка колонны может привести к тому, что все активные центры сорбента будут заняты. Поэтому мы тщательно изучили влияние нагрузки образца инсулина на разделение. «Вытеснительный» эффект начинает заметно проявляться при нагрузке более 5 мг инсулина на каждый мл сорбента. А при нагрузке выше 20 мг/мл разделение резко ухудшается в связи с недостатком незанятых активных центров сорбента. Оптимальной нагрузкой следует принять 10-15 мг/мл. При этом выход чистой фракции инсулина (с чистотой 98,5 %) превышает 80 %.

Неподвижная фаза. При работе с колоннами одного размера (4,6x250 мм), упакованными сорбентами одного типа (Kromasil), отличными друг от друга только неподвижной фазой, точнее длиной углеводородного радикала (С18, С8 и С4), строилась графическая характеристика «проскока» для определения предельно емкости сорбента. Для этого на каждую колонну наносили опытный раствор инсулина до тех пор, пока не наблюдалась десорбция полипептида из-за отсутствия незанятых активных центров сорбента. Было установлено, что предельная емкость сорбента возрастает с уменьшением длины углеводородной прививки. Так, при использовании сорбента С18 предельная емкость составила 62 мг инсулина/мл сорбента, в случае сорбента С8 - около 82 мг/мл, а в случае С4 - приблизительно 89 мг/мл. Однако разделение, наоборот, уменьшается с уменьшением длины прививки (в ряду С4-С8-С18 разделение R было равно 1,4; 1,8; 2,0, соответственно). Было решено использовать на производственном уровне «золотую середину», т.е. силикагель, модифицированный октилсиланом С8. В целях подбора оптимального хроматографического сорбента был протестирован ряд коммерчески доступных образцов от различных производителей. Наилучшие результаты были получены при тестировании УМС Basic С8-15 мкм-20 нм. В ходе дополнительных теоретических и практических исследований было установлено, что оптимальная высота слоя сорбента в хроматографической колонне должна лежать в диапазоне от 10 до 15 см.

Производственная очистки ГИЧ. Полученные результаты по очистке ГИЧ были масштабированы до производственного уровня: объем сорбента в хроматографической колонне равен 3,5 кг, размеры колонны 700x150 мм, нагрузка образца 55-65 г ГИЧ.

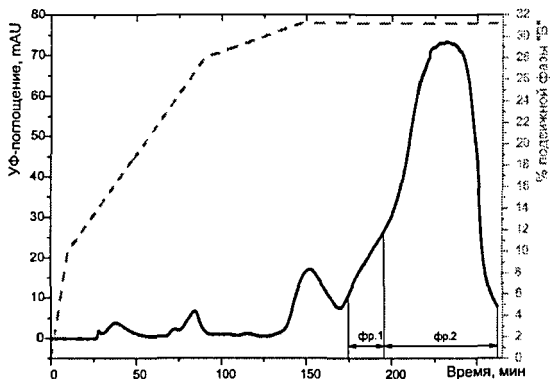


Рис. 17. Препаративная хроматографическая очистка инсулина человека от примесей (профиль элюции - сплошная линия; градиент состава подвижной фазы - штриховая линия). Колонна YMC DAU150-700, упакованная сорбентом YMC Basic C8-15 мкм-20 нм. Подвижная фаза «А»: 10 % этанол, 1 % уксусная кислота, 2 % этилацетат, остальное - вода для инъекций. Подвижная фаза «Б»: 50 % этанол в воде для инъекций.

Материал, элюированный с колонны, фракционировали следующим образом: первая фракция, содержащая 10-15 % продукта, не отвечала требованиям к чистоте инсулина и направлялась на вторичную рехроматографическую очистку; вторая фракция, содержащая 80-90 % продукта, отвечала требованиям к чистоте инсулина и направлялась на финишную очистку (Рис. 17). Параметры аналитического контроля обеих фракций представлены ниже (Таблица 2).

Таблица 2. Аналитический контроль фракций после ВЭЖХ-очистки.

Параметр	Тест	Фр. 1	Фр. 2	Норма
Содержание A21-дезамидоинсулина, %	ВЭЖХ	5,0-7,0	0,2-0,4	< 2
Содержание инсулиноподобных полипептидов, %	ВЭЖХ	0,1-0,5	0,2-0,5	< 2
Содержание БЭ, ЭЭ/мг	ЛАЛ-тест	< 2,5	< 2,5	< 10
Содержание проинсулиноподобных полипептидов, нг/мг	ИФА	20-30	0-7	< 10
Содержание ВМП, %	SEC	0,05-0,1	0,02-0,08	< 1
Выход инсулина, %	ВЭЖХ	10-15	85-90	-

Фракцию 2 осаждали ацетатом цинка, осадок отделяли и растворяли в 0,5 М уксусной кислоте до концентрации инсулина 45-50 мг/мл. Образец наносили на колонну, упакованную сефадексом G-50 (GE Healthcare, Швеция) и подвергали обессоливанью гель-фильтрацией, элюируя 0,5 М уксусной кислотой в качестве подвижной фазы. Основную фракцию (содержание около 90 %) снова осаждали ацетатом цинка и кристаллизовали, кристаллы лиофильно высушивали. Разработанный эффективный способ очистки позволил получать активную фармацевтическую субстанцию инсулина человека с активностью не менее 27,5 МЕ/мг, которая может быть использована в производстве готовых лекарственных форм.

Валидация ВЭЖХ-очистки. Валидация необходима для доказательства того, что процесс хроматографической очистки ГИЧ воспроизводим, предсказуем и способствует получению АФС, отвечающей требованиям к качеству. Разработанная схема очистки ГИЧ была внедрена в технологию серийного выпуска АФС инсулина на Опытном биотехнологическом производстве ИБХ РАН, поэтому было логично предложить проведение сопутствующей валидации. Для корректной оценки результатов производственной хроматографической очистки в качестве *критериев приемлемости* были приняты следующие показатели:

1. Выход ($Y, \%$), или количество инсулина в основной фракции с чистотой, удовлетворяющей критериям приемлемости, отнесенное к суммарно нанесенному на хроматографическую колонну инсулину. Должен быть не ниже 80 %.
2. Чистота основной фракции ($P_{инс}, \%$), или содержание целевого инсулина в основной фракции по данным аналитического определения методом ВЭЖХ. Должна быть не ниже 98,0 %.
3. Содержание А21-дезамидоинсулина ($P_{A21}, \%$) в основной фракции по данным аналитического определения методом ВЭЖХ. Должно быть не выше 0,8 %.
4. Производительность процесса ($Pr, г * (л * ч)^{-1}$), или количество инсулина с чистотой, отвечающей критериям приемлемости, очищаемое на 1 литре объема хроматографической колонны за 1 час. Должна быть не ниже $2 г * (л * ч)^{-1}$.

Валидация процесса была проведена в следующем порядке:

1. Проведено ознакомление с необходимой технической и нормативной документацией.
2. Проведены последовательно 5 циклов хроматографической очистки (в период с 25.06.2008 года по 09.07.2008 года, номера циклов с RPC004 по RPC008) в соответствии с утвержденной стандартной операционной процедурой. Из каждой собранной фракции отобраны образцы для проведения аналитических испытаний методом ВЭЖХ для определения чистоты и содержания А21-дезамидоинсулина, а также концентрации инсулина в основной фракции для последующего расчета значений выхода и производительности. Результаты испытаний занесены в сводный протокол параметров процесса и аналитического контроля.
3. Полученные и рассчитанные данные сопоставлены с выбранными критериями приемлемости.
4. Оформлен отчет о валидации процесса и сделаны необходимые выводы.

Результаты, полученные в течение валидации процесса, представлены ниже (Таблица 3). Все показатели соответствуют принятым критериям приемлемости. Следовательно, разработанный процесс хроматографической очистки ГИЧ воспроизводим, предсказуем и способствует получению АФС, отвечающей требованиям к качеству.

Таблица 3. Показатели процесса хроматографической очистки (по пяти последовательных производственным циклам).

Номер цикла	Дата цикла	$P_{инс}$, %	$P_{А21}$, %	Y , %	Pr , $г*(л*ч)^{-1}$	Соответствие критериям приемлемости
RPC004	25.06.08	99,10	0,43	85,74	2,55	соответствует
RPC005	01.07.08	98,80	0,44	84,93	2,25	соответствует
RPC006	02.07.08	99,25	0,33	83,00	2,06	соответствует
RPC007	08.07.08	98,00	0,34	81,45	2,41	соответствует
RPC008	09.07.08	98,00	0,24	80,26	2,47	соответствует
Среднее значение		98,63	0,34	83,08	2,35	

Технология получения и очистки инсулина-аспарта и инсулина-лизпро.

Получение аналогов проводили, ферментативно расщепляя соответствующие предшественники (в каждом случае молекулярная масса предшественника была приблизительно равна 17 кДа). Условия проведения гидролиза соответствовали условиям, оптимизированным в процессе получения ГИЧ. Очистку от родственных полипептидов, ВМП, БЭ и проинсулинподобных примесей осуществляли с помощью ОФ ВЭЖХ. Поскольку физико-химические свойства молекул аналогов и молекулы инсулина достаточно близки, то мы решили использовать одну и ту же неподвижную фазу, а именно силикагель с привитой октильной группой, пористостью 20 нм, размерностью 15 мкм. Т.к. инсулин-аспарт и инсулин-лизпро, в отличие от ГИЧ, обладают пониженной способностью к самоассоциации, то, очевидно, что процесс волокнообразования практически исключен. Следовательно, в качестве подвижной фазы можно было использовать раствор, содержащий любую кислоту, способствующую высоким показателям разделения (Рис. 14) и этиловый спирт в качестве органического модификатора.

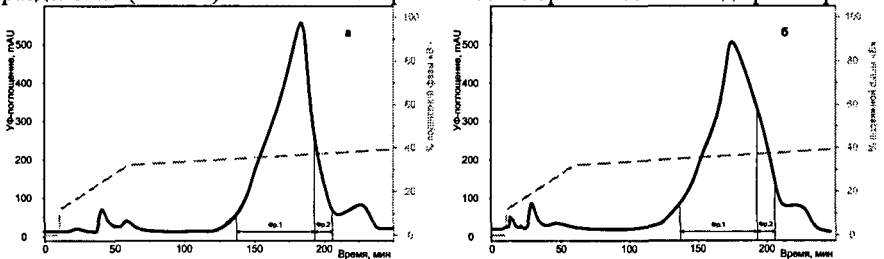


Рис. 18. Хроматографическая препаративная очистка инсулина-аспарта (а) и инсулина-лизпро (б) от примесей (профиль элюции - сплошная линия; градиент состава подвижной фазы - штриховая линия). Колонна VSM100, упакованная сорбентом УМС Basic С8-15 мкм-20 нм (объем колонны 1,8 л). Подвижная фаза «А»: 10 % этанол, 10 мМ лимонная кислота, остальное - вода для инъекций. Подвижная фаза «Б»: 50 % этанол в воде для инъекций. Нагрузка: 30-35 г аналога.

Материал, элюированный с колонны в описанных выше условиях, фракционировали следующим образом: первая фракция, содержащая 70-80 % продукта, отвечала требованиям к чистоте инсулина и направлялась на финишную очистку; вторая фракция, содержащая 10-20 % продукта, не отвечала требованиям к чистоте инсулина и подвергалась вторичной хроматографической очистке (Рис. 18). Параметры аналитического контроля чистых фракций аналогов инсулина представлены ниже (Таблица 4).

Таблица 4. Результаты анализа фракций аналогов, полученных после ВЭЖХ-очистки.

Параметр	Тест	Инсулин-аспарт	Инсулин-лизпро	Норма
Содержание А21-дезамидированной формы, %	ВЭЖХ	0,2-0,4	0,2-0,4	< 2
Содержание инсулиноподобных полипептидов, %	ВЭЖХ	0,1-0,5	0,5-1,0	< 2
Содержание БЭ, ЭЕ/мг	ЛАЛ-тест	< 2,5	< 2,5	< 10
Содержание проинсулиноподобных полипептидов, нг/мг	ИФА	0-3	0-3	< 10
Содержание ВМП, %	SEC	0,02-0,08	0,02-0,08	< 1
Выход инсулина, %	ВЭЖХ	78	75	-

Чистые фракции осаждали ацетатом цинка, осадок отделяли и растворяли в 0,5 М уксусной кислоте до концентрации инсулина 45-50 мг/мл. Образцы поочередно наносили на колонну, упакованную сефадексом G-50 (GE Healthcare, Швеция) и подвергали обессоливанию гель-фильтрацией, элюируя 0,5 М уксусной кислотой в качестве подвижной фазы. Основные фракции (содержание около 90 %) лиофильно высушивали.

Разработанный эффективный способ очистки позволил получить АФС инсулина-аспарт и инсулина-лизпро с активностью не менее 27,5 МЕ/мг, которые были переданы на клинические испытания.

Выводы.

1. Разработан основанный на ион-парной ОФ ВЭЖХ метод внутрипроизводственного контроля содержания дТИ, побочного продукта ФГ, в растворах ГИЧ.
2. Проведена оптимизация ферментативного гидролиза предшественника инсулина по следующим показателям: температура процесса, соотношение ферментов, концентрации реагентов.
3. Предложена схема гидролиза РП с предварительной защитой аминогрупп с тем, чтобы минимизировать образование побочного полипептида дТИ.
4. Исследован процесс фибриллообразования инсулина в растворах с низким рН и определено, какие кислоты способствуют минимизации агрегации полипептида.
5. Разработана эффективная схема очистки инсулина методом ОФ ВЭЖХ с помощью смешанного (элюентного и «вытеснительного») режима хроматографирования. Валидационной процедурой подтверждено, что разработанный процесс воспроизводим, предсказуем и позволяет получать АФС ГИЧ качества, соответствующего фармакопейным требованиям.

6. Разработан внутрипроизводственный метод контроля содержания ГИЧ, более оперативный (длительность анализа 23,5 мин), чем метод, рекомендуемый фармакопейной статьей. Достоверность результатов анализа была доказана валидационной процедурой, в ходе которой оценивались линейность, правильность, точность, предел обнаружения, нижний предел количественной оценки, специфичность, устойчивость к изменению температуры, составу подвижных фаз, смене хроматографических колонок.

7. Разработан эффективный способ получения из предшественников и очистки инсулина-аспарт и инсулина-лизпро, позволяющий получать АФС, удовлетворяющие международным стандартам качества. Нарботанные образцы АФС аналогов инсулина в настоящее время проходят государственную регистрацию.

Разработанная технология выделения и очистки позволила получить соответствующую фармакопейным требованиям АФС с суммарным выходом до 220-240 мг инсулина / м3 культуральной жидкости.

Разработанная технология в настоящее время успешно реализуется на Опытном биотехнологическом производстве Учреждения российской академии наук Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Гусаров Д.А., Востриков В.В., Ручко Е.А., Ласман В.А., Михалев А.В., Баирамашвили Д.И. / Использование ОФ ВЭЖХ для очистки генноинженерного инсулина человека // Биотехнология. 2006. №2. С. 44-49.
2. Gusarov D., Lasman V., Bayramashvili D. / Methods for protecting silica sorbents used in high-performance liquid chromatography from strongly adsorbed impurities during purification of human recombinant insulin // J. Chromatogr. B. 2007. V.853. P.354-359.
3. Gusarova V., Vorobjeva T., Gusarov D., Lasman V., Bayramashvili D. / Size-exclusion Chromatography Based on Silica-diol for the Analysis of the Proinsulin Fusion Protein // J. Chromatogr. A. 2007. V.1176. P.157-162.
4. Гусаров Д.А., Гусарова В.Д., Баирамашвили Д.И., Миронов А.Ф. / Генно-инженерный инсулин и его фармацевтические аналоги // Биомедицинская Химия. 2008. Т.54. №6. С.624-642.
5. Гусаров Д.А., Гусарова В.Д., Михалев А.В., Ласман В.А., Баирамашвили Д.И., Миронов А.Ф., Сенаторова Н.К., Сенаторов А.В. / Валидация метода контроля производства генно-инженерного инсулина человека // Биоорганическая Химия. 2009. Т.35. №1. С.55-61.
6. Гусарова В.Д., Гусаров Д.А., Миронов А.Ф., Баирамашвили Д.И., Мирошников А.И. / Оптимизация промышленного получения рекомбинантного предшественника инсулина человека // Биоорганическая Химия. 2009. Т.35. №4. С.510-518.

7. *Gusarov D., Nekipelova V., Gusarova V., Lasman V., Bayramashvili D.* / Displacement Effect During HPLC Preparative Purification of Human Insulin // *J. Chromatogr. B*. 2009. V.877. P.1216-1220.
8. *Гусаров Д.А., Гусарова В.Д., Миронов А.Ф., Баирамашвили Д.И.* / Инсулины пролонгированного действия: структура и фармакологический эффект // *Биофармацевтический Журнал*. 2009. Т.1. №1. С.3-11.
9. *Гусарова В.Д., Гусаров Д.А., Шепель Е.Н., Михалев А.В., Ласман В.А.* / Аналитическое определение содержания В30-дестреонин-инсулина в растворах генно-инженерного инсулина человека // *Биофармацевтический Журнал*. 2009. Т.1. №1. С.28-33.
10. *Некипелова В.О., Гусаров Д.А., Ласман В.А., Баирамашвили Д.И., Миронов А.Ф., Швец В.И.* / Образование фибрилл генно-инженерного инсулина человека в условиях хроматографической очистки // *Биотехнология*. 2009. №3. С.49-53.
11. *Баирамашвили Д.И., Гусаров Д.А., Давыдов В.И., Зинченко А.А., Косарев С.А., Ласман В.А., Мирошников А.И., Михалев А.В., Шибанова Е.Д.* / Способ получения генно-инженерного инсулина человека // Патент Российской Федерации №2322504 С1, заявка 26.06.2006, опубликован 20.04.2008 Бюл №11.
12. *Гусаров Д.А., Востриков В.В.* / Подбор и сравнительная оценка условий разделения инсулина и А21-дезамидоинсулина на ОФ ВЭЖХ // XVII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления биологии и биотехнологии», тезисы докладов и стендовых сообщений под ред. к.х.н. Т.В.Овчинниковой и Т.И.Соркиной, Москва, 2005.
13. *Гусаров Д.А., Ручко Е.А., Востриков В.В., Михалев А.В., Баирамашвили Д.И.* / Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в производстве генноинженерного инсулина человека // Третий Московский Международный Конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», материалы конференции, Москва, 2005.
14. *Гусаров Д.А., Ласман В.А., Баирамашвили Д.И.* / Сравнение технологий очистки генноинженерного инсулина человека (ГИЧ) с помощью гидрофобной хроматографии и ОФ ВЭЖХ // Московская Международная Конференция «Биотехнология и Медицина», материалы конференции, Москва, 2006.
15. *Гусарова В.Д., Ласман В.А., Гусаров Д.А., Баирамашвили Д.И.* / Оптимизация процесса ферментативного расщепления рекомбинантного белка в производстве субстанции инсулина человека // Московская Международная Конференция «Биотехнология и Медицина», материалы конференции, Москва, 2006.
16. *Михалев А.В., Шепель Е.Н., Ласман В.А., Гусаров Д.А., Баирамашвили Д.И.* / Аналитическое определение содержания В30-дестреонининсулина (дТИ) в растворах генноинженерного инсулина человека (ГИЧ) // Московская Международная Конференция «Биотехнология и Медицина», материалы конференции, Москва, 2006.
17. *Gusarov D., Lasman V., Bobruskin A., Bayramashvili D.* / Pilot Plant Scale Purification of the Human Insulin and Human Growth Hormone by Reversed Phase HPLC and Hydrophobic Interaction Chromatography: Methods comparison and

Qualification //Advancements, Applications and Theory in Downstream Processing, 5th NIC/RPC Bioseparation Conference, abstracts, Switzerland, Interlaken, 2007.

18. *Гусаров Д.А., Ласман В.А., Баирамашвили Д.И.* / ВЭЖХ в производстве терапевтических рекомбинантных белков // Пятый Московский Международный Конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», материалы конференции, Москва, 2009.

19. *Гусарова В.Д., Гусаров Д.А., Воробьева Т.В., Ласман В.А., Баирамашвили Д.И.* / Оптимизация фолдинга и рефолдинга рекомбинантного препроинсулина // Пятый Московский Международный Конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», материалы конференции, Москва, 2009.



Заказ № 296. Объем 1 п.л. Тираж 100 экз.

Отпечатано в ООО «Фолиум».

Москва, Дмитровское ш., 58. Тел. (495) 482-55-44

www.folium.ru