

В связи с изложенным и учитывая накопленный фактический материал, данное направление, на наш взгляд, представляет огромный научный интерес.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бауэр Г. Цветной атлас по кольпоскопии: Пер. с нем. / Под ред. С. И. Роговской. — М., 2006.
2. Бебнева Т. Н., Прилепская В. Н. // Consilium Medicum. Гинекология. — Т. 1, № 3.
3. Берштейн Л. М. Гормональный канцерогенез. — СПб., 2000.
4. Киселев В. И., Ашрафян Л. А., Бударина С. О. и др. // Consilium Medicum. Гинекология. — 2004. — Т. 6, № 4.
5. Кондратьева Е. А. // Consilium Medicum. Гинекология. — 2003. — Т. 5, № 4.
6. Коханевич Е. В., Ганина К. П., Суменко В. В. Кольпоцервикоскопия. Атлас. — Киев, 1997. — С. 49.
7. Межевитинова Е. А. Репродуктивное здоровье и контрацепция у женщин с сахарным диабетом 1-го типа: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 2006.
8. Прилепская В. Н. Заболевания шейки матки. Клинические лекции. — М., 1997.
9. Прилепская В. Н. Заболевания шейки матки, влагалища и вульвы. Клинические лекции. — М., 2000.
10. Прилепская В. Н., Рудакова Е. Б., Кононов А. В. Эктопии и эрозии шейки матки. — М., 2002.
11. Русакевич П. С. Фоновые и предраковые заболевания шейки матки. — Минск, 1998.
12. Савицкий Г. А. // Вопр. онкол. — 1991. — № 2. — С. 164—169.
13. Савицкий Г. А., Савицкий А. Г. Миома матки (проблемы патогенеза и патогенетической терапии). — СПб., 2000.
14. Стрижак А. Н., Давыдов А. И., Белоцерковцева Л. Д. Клиническая кольпоскопия. — М., 2002.
15. Фролова И. И. Клинико-морфологические исследования дискератоза и неопластических изменений эктоцервикса при сопутствующей гинекологической патологии: Дис. ... канд. мед. наук. — М., 2002.
16. Фролова И. И. // Вопр. акуш., гин. и перинатол. — 2003. — Т. 2, № 1. — С. 72—86.
17. Anttila T. et al. // J. A. M. A. — 2001. — Vol. 285, N 1. — P. 47—51.
18. Bernard C., Mougin C., Madoz L. et al. // Int. J. Cancer. — 1992. — Vol. 52. — P. 731—735.
19. Brinton L. A., Herrero R., Reeves W. S. et al. // Gynecol. Oncol. — 1993. — Vol. 51, N 3. — P. 301—306.
20. Castellsague X. et al. // N. Engl. J. Med. — 2002. — Vol. 346, N 15. — P. 1105—1112.
21. Hunter R., Cook B., Peyser K. // Eur. J. Obstet. Gynecol. — 1983. — Vol. 14, N 4. — P. 225—232.
22. Israels L., Israels E. // The Oncologist. — 1999. — Vol. 4, N 4. — P. 332—339.
23. Jeng M.-H., Shupnic M. A., Bender T. P., Santen R. J. // Endocrinology. — 1998. — Vol. 139. — P. 4164—4174.
24. Liehr J. G. // Polycycl. Arom Compounds. — 1994. — Vol. 6. — P. 229—239.
25. Walboomers J. M. M., Jacobs M. V., Manos M. M. et al. // J. Pathol. — 1999. — Vol. 189. — P. 12—19.
26. Zur Hausen H. // Lancet. — 1994. — Vol. 8903. — P. 955—957.

Поступила 12.08.06

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2007

УДК 615.357:577.175.322].012.6

А. Г. Габибов¹, Н. А. Пономаренко¹, И. И. Воробьев¹, Д. И. Баирамашвили¹, В. Д. Кнорре¹,
А. М. Шустер², В. А. Мартыанов², И. К. Крылов⁴, В. А. Бурмистров⁴, И. И. Дедов³,
А. И. Мирошников¹

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ. РАСТАН — ПЕРВЫЙ ОТЕЧЕСТВЕННЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ГОРМОН РОСТА ЧЕЛОВЕКА

¹Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва,
²ЗАО "Мастерклон", ³ГУ Эндокринологический научный центр РАМН, ⁴ООО "Фармстандарт"

Развитие современной фармакологии невозможно представить без использования методов генетической инженерии (технологии рекомбинантных ДНК). Успехи медицины все более базируются на активном применении белковых препаратов, полученных с помощью технологии переноса наследственной информации (генов) из одного организма в другой.

Появление возможности экспрессировать чужеродные гены в клетках различных организмов (как эукариот, так и прокариот) стало одним из революционных событий в науке последних двух десятилетий XX столетия и заложило основы современной биотехнологии. Получение новых лекарств на основе рекомбинантных белков по своей значимости для практического здравоохранения можно сравнить с успехами Дженнера и Пастера в области вакцинации и с открытием в середине XX века эры антибиотиков. Гетерологическая экспрессия белков наряду с расшифровкой генома человека сделала принципиально возможным создание основ для "компенсирующей", или "ингибирующей", терапии белками, закодированными в геноме и произ-

веденными в необходимых количествах другими клетками-хозяевами. Символично, что первые практические успехи, достигнутые с помощью технологий рекомбинантных ДНК, относятся к области молекулярной эндокринологии. В 80-е годы прошлого столетия компании "Genentech" первой удалось получить генно-инженерный инсулин человека в *Escherichia coli* [6]. К концу первой декады XXI века рынок генно-инженерных препаратов может достичь десятков миллиардов долларов США [14]. Инсулин занимает одно из лидирующих положений в этом секторе (около 15% рынка), уступая лишь эритропоэтину (26% рынка). Вместе с тем рекомбинантные цитокины, колониестимулирующие факторы и рекомбинантные антитела становятся также незаменимыми в практике врача, и уровни их продаж достигают миллиардных отметок [14] (табл. 1).

Тем не менее на пути создания рекомбинантных белковых лекарственных средств есть еще много трудностей как фундаментального, так и организационного характера. Общая стратегия развития современной молекулярной биологии, биохимии,

Таблица 1

Рекомбинантные терапевтические белки с объемами продаж более 500 млн \$ в год

Наименование продукта	Объем продаж, млн \$	Начало продаж, г.
Генно-инженерный инсулин человека	5340	1982 (США)
Гормон роста человека	1760	1985 (США)
Интерферон α	2700	1986 (США)
Эритропоэтин	8800	1989 (США)
ГКСФ	2520	1991 (США+ЕС)
Фактор крови VIII	670	1992 (США)
Интерферон β	2200	1993 (США)
Глюкоцереброзидаза	740	1994 (США)
Фолликулостимулирующий гормон	1000	1995 (ЕС)
Фактор крови VIIa	630	1996 (ЕС)

микробиологии обеспечивает создание новых векторов для переноса генетической информации, разработку штаммов усовершенствованных прокариотических клеток, дрожжей, способов поддержания перевиваемых культур клеток млекопитающих, эффективных схем очистки рекомбинантных белков и методов промышленной биотехнологии с использованием крупномасштабных биореакторов. На современном этапе развития медицинской биотехнологии резервы использования прокариотических клеток-хозяев практически исчерпаны. Белки большой молекулярной массы трудно производить в *Escherichia coli* в биотехнологически оправданных количествах. Для обеспечения своей функциональной активности они требуют адекватной посттрансляционной модификации. В этой связи на повестку дня поставлен вопрос использования эукариотических клеток млекопитающих. В частности, это относится к терапевтическим антителам, факторам свертывания крови, молекулам адгезии. Переход от микроорганизмов к культурам животных клеток удорожает производство белковых продуктов на порядки. Однако все промышленно развитые страны мира активно включились в эту биотехнологическую гонку и пошли по пути создания национальных и транснациональных исследовательских и промышленных центров.

Особого внимания в работе с рекомбинантными белками и продвижении их на рынок требуют вопросы биобезопасности и патентной чистоты. Белковая молекула, произведенная в чужеродной клетке-хозяине, может быть выделена с примесями, в том числе с фрагментами ДНК клетки-хозяина, ее белками, полисахаридами и эндотоксинами. Применение препаратов с указанными контаминациями чревато серьезными осложнениями в области иммунопатологии [15].

На фармацевтическом рынке присутствуют как оригинальные препараты, так и дженерики — воспроизведенные копии оригинальных препаратов. Ситуация с химически синтезированными препаратами достаточно понятная: в большинстве стран по истечении срока патентной защиты на оригинальный препарат другие компании могут предлагать дженерик после стандартной демонстрации его биологической эквивалентности и безопасности.

В отношении так называемых биодженериков, т. е. аналогов биосинтетических препаратов, вопрос "оригинальности" и "воспроизводимости" является более сложным. Многие такие лекарства представляют собой точные биосинтетические копии обычных белков человека и поэтому не могут полностью рассматриваться как оригинальные препараты. Как правило, патентная защита биосинтетических препаратов распространяется на способ производства, но при универсальности методик, заложенных в фундаментальные основы молекулярной и клеточной биологии, заранее предусмотренные изменения в схеме получения биодженерика обеспечивают патентную чистоту препарата. В то же время демонстрация биоэквивалентности биодженерика — достаточно сложная задача. В этой связи практическому врачу важно понимать возможные отличия биодженериков от оригинальных препаратов, связанные со способом их получения и реализацией системы контроля качества субстанции и готовой лекарственной формы.

Биотехнологическая промышленность России в "дорекомбинантную эру" находилась на одном из передовых рубежей. Научный потенциал нашей страны позволял сделать эффективный переход к промышленному освоению технологии рекомбинантных ДНК, чего, к сожалению, не случилось по известным политическим и экономическим причинам. Сегодня фармацевтические генно-инженерные белки, являясь весьма дорогостоящей составляющей страховой медицины в развитых странах, практически недоступны для нашего населения из-за высокой стоимости и несовершенства организационных структур национального здравоохранения. В то же время современные тенденции к улучшению лекарственного обеспечения, в том числе рекомбинантными препаратами, обеспечивают возрастающую финансовую нагрузку на бюджет здравоохранения и также ограничивают количество пациентов, которые могут получить терапию такими лекарствами. Создание отечественной платформы производства этих препаратов позволит внести значительный вклад в решение проблемы биобезопасности России, а также заложить основы импортозамещения. Уже предприняты первые попытки сократить отставание в биотехнологии от ведущих промышленно развитых государств, наметившееся в последние годы. Создание и внедрение отечественной технологии производства инсулина явились знаковым событием для нашей страны [1, 4, 5]. Обеспечение "биотехнологической самостоятельности" России является первоочередной составляющей отечественной медицины и биологии. В Институте биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова (ИБХ РАН) в содружестве с научными учреждениями РАН и при участии компаний "Мастерклон" и "Фармстандарт" ведутся активная разработка и внедрение в производство целой линии генно-инженерных белковых препаратов медицинского назначения. В настоящее время на разных стадиях разработки находятся 20 генно-инженерных препаратов, в том числе инсулин человека (инсуран), гормон роста человека (соматотропин), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

(ГКСФ), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМКСФ).

В этом ряду особое место занимает препарат "Растан" — рекомбинантный гормон роста человека, второй после инсулина (Инсуран®) препарат, произведенный в ИБХ РАН. В 2006 г. "Растан" был разрешен к применению в РФ и производится в виде лиофилизата для приготовления раствора для подкожного введения во флаконах по 4 МЕ (1,3 мг). Интерес к нему обусловлен потребностями детской эндокринологии [9], а также наметившимися в последнее время тенденциями применения его и в других областях медицины [12, 13].

Известно, что патология роста занимает третье место в структуре детской эндокринной патологии. Задержка роста — это гетерогенное состояние, сопровождающее многие эндокринные, соматические и генетические заболевания. Наиболее выраженные клинические проявления и тяжелый прогноз заболевания имеют дети, страдающие соматотропной недостаточностью [16].

Определение аминокислотной последовательности соматотропина — гормона роста человека (ГРЧ) и клонирование кодирующего участка его гена позволили в начале 80-х годов XX века произвести первые препараты рекомбинантного гормона роста человека (рГРЧ) для применения в медицинской практике [8, 11]. Осуществляя комплексный подход к проблеме, коллектив авторов задался целью получить патентно-чистый препарат, не отличающийся по качеству и терапевтической эффективности от зарубежных аналогов, производимых ведущими фармацевтическими компаниями, организовать его производство, доклинические и клинические исследования.

Основные этапы исследований, на основе которых создавалась технология производства активной фармацевтической субстанции рГРЧ, включали:

- конструирование плазмиды и создание штамма-продуцента;
- разработку лабораторного метода получения субстанции соматотропина;
- разработку опытно-промышленной технологии выделения и очистки рГРЧ;
- разработку методов контроля и создание стандарта качества на субстанцию рГРЧ;
- доклинические и клинические испытания рГРЧ.

Конструирование плазмиды и создание штамма-продуцента рГРЧ

В данном проекте перед нами стояла задача сконструировать плазмиду, детерминирующую синтез рекомбинантного белка, и создать высокопродуктивный бактериальный штамм-продуцент, позволяющий получать рекомбинантный соматотропин с высоким выходом и по упрощенной технологии [3].

В ходе решения этой задачи нами была сконструирована плазида pES1-6 (рис. 1), кодирующая полипептид с последовательностью рГРЧ и состоящая из: NdeI/XhoI-фрагмента ДНК плазмиды pET22b(+), содержащего промотор и терминатор

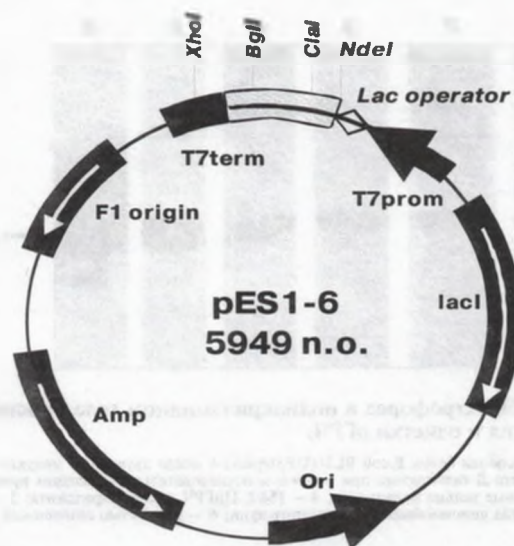


Рис. 1. Физическая карта рекомбинантной плазмиды pES1-6.

Указаны сайты эндонуклеаз рестрикции. Ori — участок инициации репликации плазмиды; F1 origin — участок инициации репликации бактериофага F1; Amp — ген устойчивости к ампициллину; lac I — ген репрессора лактозного оперона; T7prom — промотор транскрипции; T7term — терминатор транскрипции; Lac operator — оператор лактозного оперона E.coli; S1 — ген рекомбинантного соматотропина человека.

транскрипции T7-РНК-полимеразы, усилитель трансляции гена 10 фага T7 и ген β-лактамазы, а также NdeI/XhoI-фрагмента ДНК, содержащего последовательность искусственного гена рГРЧ. Эта плазида несет в качестве генетического маркера ген β-лактамазы, определяющей устойчивость трансформированных плазмидой pES1-6 клеток E. coli к ампициллину. На основе полученной плазмидной конструкции был создан штамм-продуцент E. coli BL21(DE3)/pES1-6, обеспечивающий синтез рГРЧ в количестве 60—70% от суммарного содержания белка клеток. Уровень экспрессии рГРЧ не изменялся в ходе шести последовательных циклов культивирования, таким образом, полученный штамм пригоден для крупномасштабной ферментации.

В ходе выполнения этой части работы удалось, на наш взгляд, обеспечить ряд преимуществ предлагаемой конструкции. Во-первых, в использовании при химико-ферментативном синтезе гена соматотропина максимально широкого набора кодонов, являющихся оптимальными для продукции белка в E. coli, расположение которых в синтетическом гене устраняет возможность образования на синтезируемой мРНК протяженных "шпилек", потенциально ингибирующих трансляцию. Во-вторых, применение для биосинтеза рекомбинантного белка оптимальных регуляторных элементов, контролирующих его экспрессию: T7-lac промотора для предотвращения базальной экспрессии гена до момента начала индукции и высокого уровня транскрипции соответствующей мРНК при индукции, высокоэффективного терминатора транскрипции T7 и блока различных стоп-кодонов, включающих биосинтез удлиненных вариантов рекомбинантного соматотропина. В-третьих, преимущество предлагаемого штамма E. coli заключается в использовании бактерий с фенотипом Lon

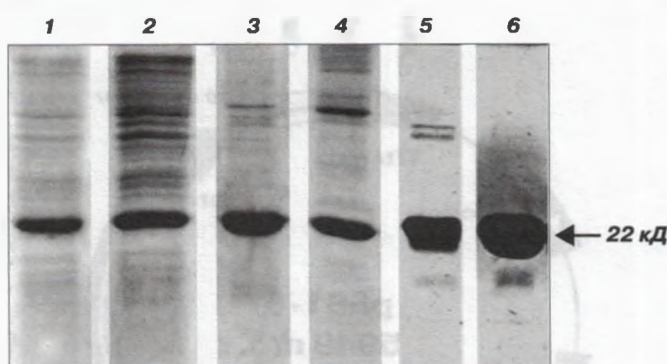


Рис. 2. Электрофорез в полиакриламидном геле биосинтеза, выделения и очистки рГРЧ.

1, 2 — тотальный белок *E. coli* BL21(DE3)/pES1-6 после двух часов индукции 1 мМ изопропил-β-D-галактозидом при 1-м и 6-м последовательных пассажах культуры; 3 — очищенные тела включения; 4 — [Met-1]pГРЧ после рефолдинга; 5 — [Met-1]pГРЧ после анионообменной хроматографии; 6 — полностью очищенный рГРЧ.

ОмрТ, что исключает возможность протеолитического расщепления синтезируемого *de novo* рекомбинантного соматотропина и загрязнения выделяемого белка наиболее активными протеазами *E. coli*.

Полученный штамм-продуцент *Escherichia coli* BL21(DE3)/pES1-6 является суперпродуцентом. При индукции изопропилтио-β-D-галактозидом происходит эффективный биосинтез рекомбинантного соматотропина, который накапливается в клетках в количестве более 60% суммарного белка бактерий.

Разработка лабораторного метода получения субстанции рГРЧ

Важнейшим этапом любого биотехнологического производства является создание лабораторного регламента. Нам необходимо было разработать высокоэффективный метод получения рГРЧ, отвечающего всем требованиям Европейской и Американской фармакопей.

Полученный штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/pES1-6 обладал продуктивностью 300 мг целевого белка в литре культуры при выращивании в колбах. Синтезируемый рГРЧ, содержащий дополнительный остаток метионина на N-конце молекулы — [Met-1]pГРЧ, был практически полностью локализован во фракции нерастворимых белков [2] в составе так называемых "тел включения" (ТВ). Локализация целевого белка в ТВ существенно облегчает его первичную очистку, однако требует проведения процедуры рефолдинга — восстановления набора дисульфидных связей и пространственной структуры белка вне живой клетки.

Для разработки эффективной методики рефолдинга целевого продукта из ТВ был применен многофакторный анализ процесса [7], позволяющий одновременно оценивать влияние многих параметров процесса на выход целевого белка и его основные свойства. Общая схема рефолдинга, использованная нами для рГРЧ, включала растворение ТВ при помощи денатурирующего агента гуанидинхлорида, химическое восстановление дисульфидных связей при помощи дитиотреитола и

последующее формирование дисульфидных связей, характерных для нативного соматотропина человека.

Полученный путем рефолдинга метионин-рГРЧ выделяли солевым осаждением с последующей анионообменной хроматографией, с градиентом концентрации NaCl при pH 9,0 (рис. 2). Полученный полупродукт обладал чистотой > 95% по данным белкового гель-электрофореза.

Поскольку при цитоплазматической экспрессии белков в *E. coli* первым аминокислотным остатком всегда является метионин, получаемый рГРЧ также содержал дополнительный N-концевой остаток метионина. Удаление этого остатка является абсолютно необходимой процедурой, поскольку рГРЧ с N-концевым метионином проявляет иммуногенность [10], что может потенциально привести к появлению у пациентов антител, нейтрализующих вводимый рГРЧ, и потере эффективности заместительной терапии.

Для удаления N-концевого остатка метионина нами была выбрана лейциновая аминопептидаза *Aeromonas proteolytica*, использование которой позволяет практически полностью отделять остаток метионина без детектируемого накопления продуктов расщепления последующих амидных связей.

Процесс отщепления остатков метионина контролировали при помощи изократической обращеннофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ). Было показано, что при проведении гидролиза в соотношении фермент — субстрат 1:1000 при концентрации [Met-1]pГРЧ 4 мг/мл в течение 8 ч пик [Met-1]pГРЧ на хроматограмме не выявлялся, что соответствовало уровню гидролиза более 96%.

Полученный рГРЧ подвергали окончательной очистке при помощи препаративной ОФ ВЭЖХ на носителе с привитыми группами C4 в градиенте концентрации n-пропанола при pH 7,0 и последующей гель-фильтрации.

Разработка опытно-промышленной технологии выделения и очистки рГРЧ

Создание стабильного высокопроизводительного штамма — продуцента соматотропина и разработка технологии его культивирования позволили разработать опытно-промышленную технологию получения фармакопейной субстанции рГРЧ из ТВ. Как уже было отмечено выше, одной из основных задач исследования было максимально полно использовать накопленный опыт по созданию технологии выделения и очистки субстанции генно-инженерного инсулина человека, в том числе и аппаратурного оформления процесса, на тех стадиях, на которых это позволяет коэффициент масштабирования.

Процесс получения субстанции соматотропина состоит из трех основных этапов: получения рекомбинантного белка (РБ) — Met-соматотропина в мономерной форме (включая восстановление и ренатурацию РБ с последующей его очисткой), получения рГРЧ из РБ ферментативным отщеплением N-концевого аминокислотного остатка метионина

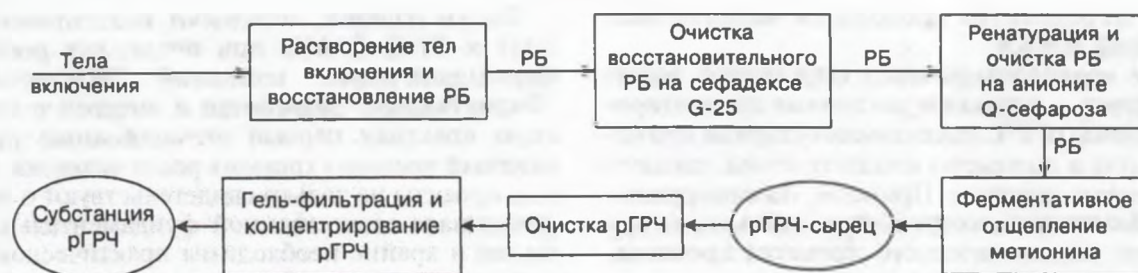


Рис. 3 Технологическая схема получения АФС рГРЧ.

и очистки соматотропина с получением фармакопейной субстанции. Технологическая схема получения субстанции рГРЧ представлена на рис. 3.

Были проведены 20-кратное масштабирование процесса ферментации штамма-производителя и оптимизация процессов рефолдинга и очистки. В ходе рефолдинга применялось аппаратное оформление процесса, ранее разработанное для технологии производства инсулина. Перед этой стадией обессоливали раствор денатурированного рГРЧ на колонке с сефадексом G-25 для удаления денатурирующего агента.

Ферментативное отделение N-концевого аминокислотного остатка метионина производили под действием лейциновой аминопептидазы *Aeromonas proteolytica*, как это было описано выше, но время реакции было значительно уменьшено для снижения уровня образования побочных продуктов. Выход на стадии достигал 82%.

Для последующей очистки рГРЧ был использован декстрановый сорбент с привитыми группами С4, n-пропанол заменили на более экономичный и менее токсичный этанол. В результате получили рГРЧ фармакопейной чистоты по основным показателям нормативной документации. Выход на стадии составил 79%.

На завершающей стадии получения субстанции рГРЧ использовали гель-фильтрацию, отделяя препарат от номинируемых низко- и высокомолекулярных примесей и перевода рГРЧ в фармакопейный раствор. Выход составлял около 96%, содержание номинируемых примесей соответствова-

ло требованиям Фармакопейной статьи предприятия (ФСП).

Разработка методов контроля и создание стандарта качества на субстанцию рГРЧ

В соответствии с отечественными и международными требованиями к производству лекарственных препаратов в ходе наших дальнейших исследований был разработан стандарт качества на субстанцию рГРЧ — ФСП 42-0549-5553-04 — "Соматотропин человеческий", 2004 г.

Характеристики, заложенные в национальный стандарт качества рГРЧ, принципиально отличаются от таковых для субстанции инсулина, поскольку и тот и другой препарат создан на основе методов рекомбинантных ДНК, и характер номинируемых примесей отличается незначительно и определяется в основном физико-химическими свойствами соответствующих белков.

В табл. 2 приведены некоторые показатели качества созданного нами национального стандарта субстанции рГРЧ в сравнении с требованиями Британской фармакопеи.

Из табл. 2 видно, что субстанция соматотропина, так же как и АФС других генно-инженерных белков, должна быть охарактеризована качественно и количественно (показатели "подлинность" и "количественное определение"). Для определения первого показателя дополнительно используется метод ионообменной ВЭЖХ, а биологические методы не применяются. Количе-

Таблица 2

Сравнительные показатели качества фармакопейной субстанции рГРЧ человека за рубежом и в РФ

Показатель качества	ФСП 42-0549-5553-04 "Соматотропин человеческий"	British Pharmacopeia 2004 Somatotropin bulk solution
Иммунореактивные белки штамма-производителя	Твердофазный ИФА. Не более 3 нг/мг соматотропина	—
Остаточная ДНК штамма-производителя	Метод гибридизации. Не более 10 пг/мг соматотропина	—
Бактериальные эндотоксины	ОФС-42-0002-00. Предельное содержание не более 5 ЭЕ/мг соматотропина	Менее 5 ЭЕ/1мг соматотропина
Димеры, полимеры	Номинируемые примеси ВЭЖХ гель-фильтрация. Не более 4%	ВЭЖХ гель-фильтрация. Не более 4%
Родственные белки	ВЭЖХ обращеннофазовая. Не более 6%	ВЭЖХ* обращеннофазовая. Не более 6%
Дезамидированные формы	ВЭЖХ ионообменная. Не более 5%	ВЭЖХ* обращеннофазовая. Не более 6%
Стерильность	ГФ XI. Должен быть стерильным	Должен быть стерильным
Количественное определение	ВЭЖХ гель-фильтрация. От 1,18 до 1,40 мг соматотропина в 1 мл**	ВЭЖХ гель-фильтрация. Не менее 91 и не более 105%

ственное определение проводится методом эксклюзионной ВЭЖХ.

Так же хроматографически определяют родственные белки, в основном различные дезамидированные формы рГРЧ, высокомолекулярные примеси — димеры и полимеры соматотропина, расщепленную форму гормона. Примеси, номинируемые этими показателями, могут образовываться как при нарушении технологического процесса производства субстанции, так и при ее хранении.

Характерными для генно-инженерных фармацевтических белков показателями качества субстанции соматотропина являются содержание иммунореактивных примесей и содержание ДНК клеток штамма-продуцента. Для определения иммунореактивных примесей нами был разработан и внедрен метод твердофазного иммуноферментного анализа. Содержание иммунореактивных примесей не должно превышать 3 нг/мг соматотропина.

Остаточную ДНК штамма-продуцента определяют с помощью метода гибридизации, для чего используют биотинилированную ДНК клеток хозяина и ее реакцию взаимодействия с конъюгатом стрептовицина и щелочной фосфатазы. Содержание остаточной ДНК не должно превышать 10 пг/мг рГРЧ.

Доклинические и клинические испытания рГРЧ

Доклинические испытания включали в себя исследования острой и субхронической токсичности, а также доклинической эффективности, которые показали, что препарат "Растан" не отличается от зарегистрированного в РФ препарата "Генотропин®" (Pharmacia & Upjohn) по активности и безопасности у животных.

Изучение клинической эффективности и безопасности препарата "Растан" проводилось под руководством проф. В. А. Петерковой в Институте детской эндокринологии Эндокринологического научного центра РАМН — ЭНЦ РАМН (дир. — акад. И. И. Дедов). Полученные в ходе исследования данные позволяют судить о высокой эффективности и безопасности препарата "Растан®", не уступающих зарубежным аналогам.

Таким образом, научными коллективами ИБХ РАН и ЭНЦ РАМН при поддержке российских фармацевтических компаний "Мастерклон" и "Фармстандарт" разработан и внедрен в клиническую практику первый отечественный рекомбинантный препарат гормона роста человека. Подобные проекты не только свидетельствуют о высоком потенциале отечественной фундаментальной науки, но и крайне необходимы практическому здравоохранению для обеспечения пациентов современными высокоэффективными лекарственными препаратами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баирамашвили Д. И. // Рос. хим. журн. — 2005. — Т. 49, № 1. — С. 34—45.
2. Воробьев И. И., Пономаренко Н. А., Александрова Е. С. и др. // Биотехнология. — 2005. — № 5. — С. 44—48.
3. Габитов А. Г., Пономаренко Н. А., Воробьев И. И. и др. Рекомбинантная плазмидная ДНК pES1-6, кодирующая полипептид соматотропин, и штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)/pES1-6-продуцент рекомбинантного соматотропина. — Пат. 2233879 РФ, 2004.
4. Гусаров Д. А., Востриков В. В., Ручко Е. А., Баирамашвили Д. И. // Биотехнология. — 2006. — № 2. — С. 44—49.
5. Патрушев Л. И., Баирамашвили Д. И., Мирошников А. И. Штамм бактерий *Escherichia coli* BL-07 — продуцент проинсулина человека. — Пат. 2267534 РФ, 2006.
6. Chen G. Q., Gouaux E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — Vol. 94, N 25. — P. 13431—13436.
7. Clark A. J., Adeniyi-Jones R. O., Knight G. et al. // Lancet. — 1982. — Vol. 2, N 8294. — P. 354—357.
8. Cronin M. J. // J. Pediatr. — 1997. — Vol. 131, N 1, Pt 2. — P. S5—S7.
9. Darendeliler F., Hindmarsh P. C., Brook C. G. // Horm. Res. — 1990. — Vol. 33, N 2—4. — P. 128—136.
10. Kaplan S. L., Underwood L. E., August G. P. et al. // Lancet. — 1986. — Vol. 1, N 8483. — P. 697—700.
11. Le H. V., Trotta P. P. // Bioprocess Technol. — 1991. — Vol. 12. — P. 163—181.
12. Lombardi G., Colao A., Ferone D. et al. // Horm. Res. — 1997. — Vol. 48. — Suppl 4. — P. 38—42.
13. Low J. F., Herndon D. N., Barrow R. E. // Lancet. — 1999. — Vol. 354, N 9192. — P. 1789.
14. Rader R. A. // Biopharmaceutical products in the US European markets. 5-th ed. Rockwell, 2005.
15. Schmetzer O., Moldenhauer G., Riesenberger R. et al. // J. Immunol. — 2005. — Vol. 174, N 2. — P. 942—952.
16. Vimpani G. V., Vimpani A. F., Lidgard G. P. et al. // Br. Med. J. — 1977. — Vol. 2, N 6084. — P. 427—430.

Поступила 17.11.06

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2007

УДК 616.379-008.64:312.6]-053.2(470)

Л. Н. Щербачева, Т. Ю. Ширяева, Ю. И. Сунцов, Т. Л. Кураева

САХАРНЫЙ ДИАБЕТ 1-ГО ТИПА У ДЕТЕЙ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ: РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ, ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ, СМЕРТНОСТЬ

ГУ Эндокринологический научный центр РАМН, Москва

За последнее 10-летие результаты эпидемиологических исследований в разных странах свидетельствуют об увеличении заболеваемости сахарным диабетом (СД) 1-го типа среди детей. По данным IDF, в настоящее время в мире зарегистрировано 430 000 детей, больных СД. Ежегодный прирост составляет 3%. В 2003 г. зарегистрировано 65 000 новых случаев заболевания СД. В Россий-

ской Федерации эпидемиологические исследования начали проводить относительно недавно. В 1996 г. создан Государственный регистр СД (ГРСД). Мониторинг основных эпидемиологических показателей СД 1-го типа в детской популяции РФ — неотъемлемая часть организации лечебно-профилактической помощи детям. ГРСД позволяет объективно оценивать эпидемическую ситуацию в Рос-