

О. С. Калюжная¹, Н. В. Хохленкова¹, М. В. Паненко²

¹ Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України

² Харківський національний медичний університет Міністерства охорони здоров'я України

Аналіз технологій виробництва рекомбінантного інсуліну

Метою дослідження є аналіз сучасних тенденцій у виробництві інсулінів та систем експресії, використовуваних для отримання рекомбінантних білків.

Матеріали та методи. Визначеної мети досягали, використовуючи методи контент-аналізу, порівняльного, логічного, аналітичного та узагальнення інформації. Матеріалами дослідження були публікації в наукових періодичних виданнях, офіційні сайти компаній-виробників.

Результати та їх обговорення. З'ясовано, що для комерційного виробництва рекомбінантних людських інсулінів традиційно використовують такі системи експресії: бактеріальну (*Escherichia coli*) та дріжджову (*Saccharomyces cerevisiae*). Але для задоволення світової потреби в інсуліні необхідна розробка нових ефективних систем експресії. Тому сьогодні досліджують використання інших еукаріотних систем експресії інсуліну, що були б придатні для великомасштабного виробництва. Серед таких систем перспективними для впровадження у виробництво інсулінів є трансгенні рослини, які характеризуються відсутністю потенційних людських патогенів та наявністю механізмів посттрансляційної модифікації білка, схожих на людські. Наразі успішними є дослідження з використанням рослин *Arabidopsis thaliana*, тютюну, салату та полуниці. Також перспективними вважають стовбурові клітини – ембріональні, мезенхімальні та індуковані плюрипотентні. Схарактеризовано методи, застосовувані у великомасштабному виробництві рекомбінантного інсуліну, зокрема на основі синтезу проінсуліну та дволанцюговий метод. Складено технологічні схеми обох технологій, наведено переваги та недоліки кожної.

Висновки. Аналіз даних наукової літератури засвідчив, що основними методами виробництва препаратів інсуліну з 1980-х років залишаються проінсуліновий і дволанцюговий, засновані на технологіях рекомбінантної ДНК. Проінсуліновий метод вважають більш ефективним та рентабельним, якщо порівнювати з дволанцюговим, бо ця технологія складається з роботи з одним рекомбінантним штамом. Вибір між цими двома методами залежить від конкретних потреб виробника: для одних випадків раціональним є швидкий метод із синтезом проінсуліну, для інших – більш точний та контрольований дволанцюговий метод. Системами експресії, що їх використовують у сучасних технологіях великомасштабних виробництв, залишаються бактеріальна (*Escherichia coli*) та дріжджова (*Saccharomyces cerevisiae*). Але за використанням *E. coli* попередники інсуліну виробляються в тільцях вкраплення, а повністю функціональні поліпептиди отримують шляхом стадій солюбілізації та рефолдингу, система ж на основі дріжджів дає розчинний попередник інсуліну, який секретується в культуральну рідину, проте потребує попередньої гуманізації через ризики імунної відповіді в людини. Отже, сучасні технології не можуть задовольнити дедалі більший попит на доступний інсулін через обмеження виробничих потужностей і високу вартість виробництва, тому тривають дослідження з пошуку нових ефективних систем експресії, як-от клітини рослин та ссавців, зокрема *Arabidopsis thaliana*, тютюну, салату, полуниці, стовбурових клітин.

Ключові слова: інсулін; технології рекомбінантних ДНК; система експресії

O. S. Kaliuzhnaia¹, N. V. Khokhlenkova¹, M. V. Panenko²

¹ National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine

² Kharkiv National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine

The analysis of recombinant insulin production technologies

Aim. To analyze current trends in insulin production and expression systems used to obtain recombinant proteins.

Materials and methods. The specified goal was achieved using the methods of content analysis, comparative, logical, analytical and generalization of information. The research materials were publications in scientific periodicals, official websites of manufacturing companies.

Results. It has been found that the following expression systems are traditionally used for the commercial production of recombinant human insulins: bacterial – *Escherichia coli*, and yeast – *Saccharomyces cerevisiae*. But to meet the global need for insulin, it is necessary to develop new effective expression systems. Therefore, the use of other eukaryotic insulin expression systems that would be suitable for large-scale production is currently being studied. Among such systems, transgenic plants, which are characterized by the absence of potential human pathogens and the presence of post-translational protein modification mechanisms similar to human ones, are promising for introduction into insulin production. Currently, studies using *Arabidopsis thaliana*, tobacco, lettuce and strawberry plants are successful. Stem cells – embryonic, mesenchymal and induced pluripotent are also considered promising. The methods used in the large-scale production of recombinant insulin based on the synthesis of proinsulin and the two-chain method have been characterized. The technological flowcharts of both technologies have been drawn up, the advantages and disadvantages of each are given.

Conclusions. The analysis of data from the scientific literature has shown that the main methods of producing insulin preparations since the 1980s remain pro-insulin and two-chain methods, which are based on recombinant DNA technologies. The pro-insulin method is considered more efficient and cost-effective compared to the two-chain method since this technology consists of working with a single recombinant strain. The choice between these two methods depends on the specific needs of the manufacturer: for some cases a fast method with proinsulin synthesis

is rational, for others – a more accurate and controlled two-chain method. The bacteria – *Escherichia coli* and yeast – *Saccharomyces cerevisiae* remain the expression systems used in the existing large-scale production technologies. But using *E. coli*, insulin precursors are produced in inclusion bodies, and fully functional polypeptides are obtained by solubilization and refolding steps. The yeast-based system yields a soluble insulin precursor that is secreted into the culture fluid, but requires prior humanization due to the risks of an immune response in humans. Thus, current production technologies cannot meet the growing demand for available insulin due to limited production capacity and high production costs, so research is being conducted to find new efficient expression systems, such as plant and mammalian cells, including *Arabidopsis thaliana*, tobacco, lettuce, strawberry, stem cells.

Keywords: *insulin; recombinant DNA technology; expression system*

Вступ. За визначенням Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), діабет є глобальною епідемією. Для прискорення дій щодо боротьби з діабетом у всьому світі у квітні 2021 р. ВООЗ запустила Глобальний діабетичний договір [1]. Понад 420 млн людей (6 % населення світу) жили з діабетом до появи COVID-19, і прогнозують, що це число зростатиме до 643 млн до 2030 р. та до 783 млн до 2045 р. [2]. Зростання кількості хворих на цукровий діабет у всьому світі через збільшення впливу малорухомого способу життя своєю чергою призводить до збільшення потреби в інсуліні. Крім того, існує незадоволений попит на доступний інсулін, особливо в країнах із низьким і середнім рівнем доходу. Багато людей із діабетом 1 типу, життя яких повністю залежить від інсуліну, не мають доступу до інсуліну. З-поміж 60 млн людей із діабетом 2 типу, які потребують лікування інсуліном, 1 з 2 не отримує інсулін через його ціну [1, 3].

2018 року світовий ринок людського інсуліну становив 21,26 млрд доларів США, 2022 року – 18,73 млрд доларів США [4]. Але зниження попиту на інсулін за ці роки відбулось не через зниження потреби в ньому, а через зниження показників діагностики під час пандемії COVID-19. За прогнозами, ринок виросте з 18,95 млрд доларів США у 2023 р. до 21,04 млрд доларів США до 2030 р., із цим середньорічний темп приросту складатиме 1,5 % протягом цього періоду [2].

Збільшення хворих на діабет, а отже, і зростання попиту на інсулін, призвело до розвитку технологій його виробництва та появи нових продуктів по всьому світу. Багато років поспіль на ринку людського інсуліну домінують три великі компанії – Sanofi, Novo Nordisk A/S та Elli Lilly and Company, які сукупно володіють понад 90 % ринкового доходу [2]. Виробники зосереджені на розробці нових препаратів людського інсуліну різної тривалості дії, аналогів інсуліну різної тривалості дії, інноваційних засобів введення. Так, у червні 2020 р. FDA схвалила новий інсулін швидкої дії Lyumjev® (insulin lispro-aabc) компанії Elli Lilly and Company [5], а у травні 2022 р. ця ж компанія отримала дозвіл на виробництво Mounjaro® (tirzepatid), який є зручним та ефективним засобом у лікуванні діабету 2 типу й ожиріння [6].

Отже, бачимо, що дослідження, спрямовані на аналіз сучасних технологій виробництва інсулінів з подальшим їх впровадженням на вітчизняних підприємствах, є актуальні.

Метою дослідження є аналіз сучасних тенденцій у виробництві інсулінів та систем експресії, що

їх використовують для отримання рекомбінантних білків.

Матеріали та методи. Матеріалами дослідження були публікації в наукових періодичних виданнях; методи дослідження – порівняльний, логічний, аналітичний, контент-аналіз та узагальнення інформації.

Результати та їх обговорення. Попри значні досягнення науки за останні 10-15 років, цукровий діабет взагалі, й особливо цукровий діабет 1 типу, все ще залишається невиліковним захворюванням, і для збереження життя і працездатності хворий повинен постійно отримувати інсулінотерапію, яка є не патогенетичною, а замісною [7]. Тому інсулінотерапія залишається довічною, що природно створює певні труднощі як для хворого, так і для лікаря через необхідність підтримки стану вуглеводного обміну, близького до того, який є у здорової людини.

Інсулінотерапію призначають усім хворим на цукровий діабет 1 типу, які становлять до 7-10 % популяції хворих на діабет, а також частині хворих на цукровий діабет 2 типу (так званий «вторинно інсулінозалежний діабет»). На частку цієї категорії припадає 25-35 % пацієнтів, хворих на діабет 2 типу [8].

До відкриття інсуліну 1921 року пацієнти з діабетом не жили довго. Найуспішнішою терапією було призначення хворим на цукровий діабет суворої дієти з обмеженням вуглеводів. Це забезпечувало пацієнтам ще кілька років життя, але не могло повністю їх вилікувати. Пацієнти помирали від голоду внаслідок суворої дієти, які склалися лише з 450 калорій на день [9]. 1910 року Е. А. Шарпі-Шафер уперше припустив, що у хворих на діабет у підшлунковій залозі не вистачає одного гормону. Фредерік Бантінг 1921 року розробив спосіб попереднього вилучення інсуліну з підшлункової залози собаки. Відокремлена речовина, яка мала вигляд «густого коричневого мулу», забезпечила збереження життя та дала надію мільйонам діабетиків [10].

Багато років джерелом промислового виробництва інсуліну була підшлункова залоза свиней і великої рогатої худоби. Уперше про інсулін з екстрактів підшлункової залози повідомили 1921 року канадські вчені Фредерік Г. Бантінг і Чарльз Х. Бест [10]. Після відкриття інсуліну Бантінгом і Бестом почалися роботи з отримання очищеного інсуліну з екстракту підшлункової залози, що реалізували шотландський психолог Дж. Дж. Р. Маклеод та канадський хімік Дж. Б. Колліп. Маклеод і Бантінг отримали Нобелівську премію з медицини 1923 року за роботу над інсуліном [11]. 1928 року було з'ясовано, що інсулін є поліпептидом, а його амінокислотну послідовність було виявлено 1952 року [12].

Невдовзі після присудження Нобелівської премії фармацевтична компанія Eli Lilly почала масове виробництво інсуліну. Протягом наступних десятиліть виробники пропонували декілька інсулінів повільної дії, перший з яких презентувала компанія Novo Nordisk 1936 року [10]. Інсулін із корів і свиней використовували для лікування діабету протягом багатьох років, він врятував мільйони життів, хоча й не був оптимальний, бо в багатьох людей на нього розвивалася алергічна реакція [13].

Винахід клонування ДНК Стенлі Коеном і Гербертом Боером ознаменував початок генної інженерії, яка дозволила переносити гени між різними біологічними видами [14]. Їхнє відкриття призвело до створення різноманітних рекомбінантних білків із медичним використанням, зокрема інсуліну та гормону росту. 1978 року для виробництва першого синтетичного «людського» інсуліну, отриманого за допомогою генної інженерії, було використано бактерії кишкової палички. 1982 року компанія Eli Lilly випустила на ринок перший комерційно доступний біосинтетичний людський інсулін під торговою маркою Humulin, дозволений FDA для використання в людей [10].

Сьогодні у світі налічують понад 200 комерційних препаратів інсуліну. Близько 85 % препаратів інсуліну виробляють провідні фармацевтичні компанії світу: Novo Nordisk A/S (Данія), Sanofi (Франція), Eli Lilly and Company (Франція) та Bioton (Польща) [2]. Препарати інсуліну відрізняються між собою клініко-фармакологічними характеристиками, тривалістю дії, ступенем очищення, але всіх їх виробляють на основі технологій рекомбінантних ДНК та використання ефективних систем експресії. Вибір оптимальної системи експресії впливає на вихід, чистоту й біологічну активність продукту [15, 16]. З огляду на складність структури інсуліну та високі стандарти якості до фармацевтичних препаратів, ефективні системи експресії є ключовим фактором у забезпеченні виробництва стабільного та високоякісного рекомбінантного людського інсуліну.

Для комерційного виробництва рекомбінантного людського інсуліну традиційно використовують такі системи експресії: бактеріальну (*Escherichia coli*) та дріжджову (*Saccharomyces cerevisiae*) [16].

E. coli була першою системою експресії, використаною для отримання людського інсуліну в 1978 р. з використанням технології рекомбінантних ДНК дволанцюговим методом [10, 17]. За допомогою *E. coli* отримують тільки вкраплення попередників інсуліну, які потім потрібно розчинити та повторно відділити для створення активного інсуліну [18]. Як зазначено вище, ще 1982 року компанія Eli Lilly випустила на ринок перший комерційно доступний біосинтетичний людський інсулін [15, 19], і до сьогодні кишково паличку активно використовують виробники через легкість проведення генетичних маніпуляцій та вирощування, попри певні недоліки [17].

Серед дріжджових систем експресії інсуліну з 1980-х років комерційно використовують *S. cerevisiae*.

Можливість посттрансляційної модифікації білків та виділення попередника інсуліну в культуральну рідину зумовлює популярність дріжджів у технологіях виробництва інсулінів [20]. Але суттєвою проблемою використання дріжджів є те, що синтезовані ними білки піддаються N-глікозилюванню з високим вмістом манози. Цей процес скорочує період напіврозпаду рекомбінантних білків *in vivo* та активує імунну відповідь у людини, бо білки з такою модифікацією є чужорідними антигенами. Тож перед використанням дріжджі необхідно гуманізувати шляхом модифікації шляхів N-глікозилювання для створення менш імуногенних для людини продуктів [21, 22]. Зараз, окрім людського рекомбінантного інсуліну на основі *S. Cerevisiae*, також виробляють аналоги інсуліну: швидкодійний інсулін для лікування людини та інсулін тривалої дії Detemir (виробник Novo Nordisk) [10].

Іншою перспективною дріжджовою системою експресії є метилотрофні дріжджі *Pichia pastoris*. Як і *S. Cerevisiae*, *P. pastoris* здійснюють N-глікозилювання з високим вмістом манози, але в останніх олігосахаридний ланцюг складається з 8-14 манозних залишків, він значно коротший, ніж ланцюг *S. cerevisiae* з 50-150 манозних залишків [23, 24].

Для задоволення світової потреби в інсуліні в 16 000 кг на рік необхідні нові ефективні системи експресії. Тому сьогодні досліджують використання інших еукаріотних систем експресії інсуліну, що були б придатні для великомасштабного виробництва [25]. Серед таких систем перспективними для впровадження у виробництво є трансгенні рослини, які характеризуються відсутністю потенційних людських патогенів та наявністю механізмів посттрансляційної модифікації білка, схожих на людські [26]. Трансгенні рослини з цільовим геном, що відповідає за синтез людського інсуліну, отримують традиційною агро-бактеріальною трансформацією. Наразі успішними є дослідження з використанням рослин *Arabidopsis thaliana*, тютюну, салату та полуниці [10, 26].

Перспективними є дослідження з використанням стовбурових клітин – ембріональних стовбурових клітин (ЕСК), мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) та індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (іПСК) [10, 27-29].

Аналіз різних систем експресії, використовуваних як у великомасштабному виробництві, так і на стадії лабораторних випробувань, наведено в табл.

У великомасштабному виробництві рекомбінантного інсуліну використовують два методи, які базуються на класичних підходах технології рекомбінантних ДНК. Перший метод виробництва інсуліну передбачає синтез проінсуліну; другий – дволанцюговий метод, забезпечує окремий синтез ланцюгів А та В з подальшим зшиванням ланцюгів (рис. 1) [36]. Типові стадії технологічних процесів виробництва рекомбінантного інсуліну обома методами, складені на основі джерел літератури, наведено на рис. 2 та 3 [10, 16].

Порівняння систем експресії, використовуваних у виробництві інсулінів [10, 15-35]

Система експресії (рік схвалення FDA)	Переваги	Недоліки	Нові підходи для вдосконалення систем експресії
1	2	3	4
Прокаріотична система експресії			
<i>Escherichia coli</i> (1982 p.)	Швидкий ріст на дешевих середовищах; висока швидкість реплікації; здатність швидко ампліфікувати гени. Це зумовлює універсальність і економічність для великомасштабного виробництва	Втрата плазмід; розвиток антибіотичних властивостей; відсутність посттрансляційних модифікацій; накопичення цільового білка у вигляді тілець вкраплень у хаотично-розгорнутій формі, що потребує додаткових технологічних операцій; ризики протеолітичної деградації; висока ймовірність помилок трансляції, що може спричинити несприятливі імунологічні реакції у людини	Підхід на основі ПЛР для клонування людського інсуліну, який дозволяє вилучити кілька етапів, як-от афінні мітки, ренатурація білка, етапи відновлення тілець вкраплення та ферментативне розщеплення С-пептиду інсуліну; розробка нового вектора експресії pIBAINS і створення 20 нових штамів <i>E. coli</i> ; створення протеазо-дефіцитних штамів <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> BL-21) із мутацією, яка усуває продукування протеази; уведення високоекспресійних кодонів (штами BL-21, BL-21 CodonPlus-RIL і Rosetta); додавання шаперонів для запобігання накопиченню тілець вкраплення
Еукаріотичні системи експресії:			
А. Дріжджові			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2001 p.)	Швидкий ріст, легке вирощування; наявність посттрансляційної модифікації білка, що забезпечує правильне згортання білків та утворення дисульфідних зв'язків	Синтезовані білки мають N-глікозилювання з високим вмістом манози, що є ризиком імунної відповіді у людини; деградація плазміди; трудомісткі методи очищення	Створення гуманізованих дріжджових систем; модифікація рекомбінантної послідовності кДНК В-ланцюга для подовження тривалості дії інсуліну (наприклад, видалення треоніну в 30 положенні та приєднання жирної кислоти у 29 положенні ланцюга В)
<i>Pichia pastoris</i> (2009 p.)	Менший ступінь гіперглікозилювання, олігосахаридний ланцюг складається з 8-14 манозних залишків, він значно коротший, ніж ланцюг <i>S. cerevisiae</i> ; належить до метилотрофних дріжджів, а наявність промотора алкогольоксидази-1, що індукується метанолом, збільшує щільність клітин під час культивування	Наявність у структурі манози та гетерогенність глікозилювання можуть спричинити варіації від партії до партії	Конструювання штамів для вищих рівнів секреції, виробництво білка без метанолу, модифікований механізм N-глікозилювання
Б. Трансгенні рослини			
<i>Arabidopsis thaliana</i> (насіння)	Відсутність потенційних людських патогенів; наявність механізмів посттрансляційної модифікації білка, схожих на людські; короткий період генерації (6 тижнів); можливість легкого вирощування в лабораторних умовах з обмеженим сонячним світлом; повністю прочитаний геном, що полегшує генні маніпуляції; накопичення інсуліну в насінні в субклітинних органелах – олійних тільцях, що полегшує технологічні операції з виділення інсуліну	Проблеми зі стабільністю білка; невідповідні стратегії стримування	Пошук тканиноспецифічних промоторів для уникнення токсичності

Продовження таблиці

1	2	3	4
Тютюн (листя)	Високий урожай листя (накопичення інсуліну у хлоропласті), висока виживаність; утворення білка високої чистоти з мінімальними вимогами до посттрансляційної модифікації	Механізм експресії на основі хлоропласту має вплив хлоропластного глюкану; глікозилювання не властиве людині і може вимагати посттрансляційної модифікації	Пошук шляхів трансформації хлоропластів
Салат (листя)	Довготривала стабільність у листі; більший вихід білка з листя, ніж у рослини тютюну	Потенційне забруднення харчового ланцюга; неправильне глікозилювання	Пошук шляхів трансформації хлоропластів
Полуниця (ягода, кореневі волоски)	Пероральне споживання; можливість розмноження пагонами, що збільшує кількість трансгенних нащадків	Необхідне подальше вивчення для впевненості безпечності перорального застосування у хворих на діабет; небажані алергічні реакції за перорального застосування	Вивчення можливості накопичення білка в кореневих волосках для запобігання переміщенню генетичного матеріалу від генноінженерного організму до іншої популяції чи іншого виду
В. Стівурові клітини			
Ембріональні стівурові клітини (ЕСК)	Можливість диференціюватись у різні типи клітин	Етичні проблеми (у більшості випадків клітини ембріона отримують шляхом знищення ембріона), необхідна попередня згода донора; ймовірність імунного відторгнення; генетична нестабільність; ризики утворення пухлини	Розробка підходів до диференціювання ЕСК у ендокринні клітини (попередники підшлункової залози)
Індуковані плюрипотентні стівурові клітини (іПСК)	Можливість диференціюватись у різні типи клітин; відсутність етичних проблем; менша ймовірність імунного відторгнення	Потрібні ретровіруси для створення іПСК, ризики розвитку пухлин	Використання невірусних факторів репрограмування для генерації іПСК
Мезенхімальні стівурові клітини (МСК) кісткового мозку	Легка ізоляція; відсутність етичних проблем	Мінімальний потенціал диференціювання; можливість диференціювання в небажані мезенхімальні лінії	Використання нанотехнологій і регуляції генів посилило здатність МСК до диференціації та проліферації
Мезенхімальні стівурові клітини з жирової тканини	Відсутність етичних проблем; різні джерела ізоляції; висока гістосумісність і низьке імунне відторгнення	Низька мультипотентність і проліферативна здатність; генетична нестабільність; виявлення апоптозу в новоутворених клітинах	Сумісне використання МСК жирового походження та клітин підшлункової залози
Мезенхімальні стівурові клітини пуповинної крові	Висока швидкість проліферації та диференціації, у 10 разів більше стівурових клітин, ніж зібраних з кісткового мозку; протизапальні властивості; антифіброзний потенціал; низький ризик імунного відторгнення	Обмежені клітини можна виділити на один раз з пуповини; менше банків для зберігання пуповини; потрібно більше часу для пересадки	Використання нанотехнологій для сприяння достави ліків і виявлення трансплантованих клітин

Перша технологія передбачає синтез проінсуліну з подальшим очищенням і видаленням С-пептиду шляхом протеолітичного розщеплення (рис. 2). Компанія Eli Lilly використовувала цю технологію для виробництва першого рекомбінантного інсуліну Humulin. Ці рекомбінантні інсуліни першого покоління мають амінокислотну послідовність, ідентичну нативному людському інсуліну, і є кращими проти продуктів інсуліну тваринного походження. Використання технології із синтезом проінсуліну має такі переваги: простота процесу виробництва, можливість високого виходу продукту та менша кількість етапів очищення. Серед недоліків можна назвати необхідність додаткової обробки для отримання активного інсуліну та можливі проблеми з чистотою продукту [10, 13, 15].

Друга технологія побудована на використанні дволанцюгового методу, за якого ланцюги А та В молекули інсуліну синтезуються окремими штамами в різних ферментерах, потім ланцюги спільно інкубують в умовах окислення з утворенням дисульфідних зв'язків (рис. 3). Основа для першого комерційного рекомбінантного інсуліну, розробленого для терапевтичного використання у людини, стала саме технологія з використанням дволанцюгового методу, переваги якої такі: можливість точнішого контролю над процесом виробництва, менше проблем з чистотою продукту, можливість оптимізації кожного етапу синтезу. Водночас ця технологія може вимагати додаткових етапів для з'єднання ланцюгів, що збільшує витрати часу та ресурсів [10, 13, 16].

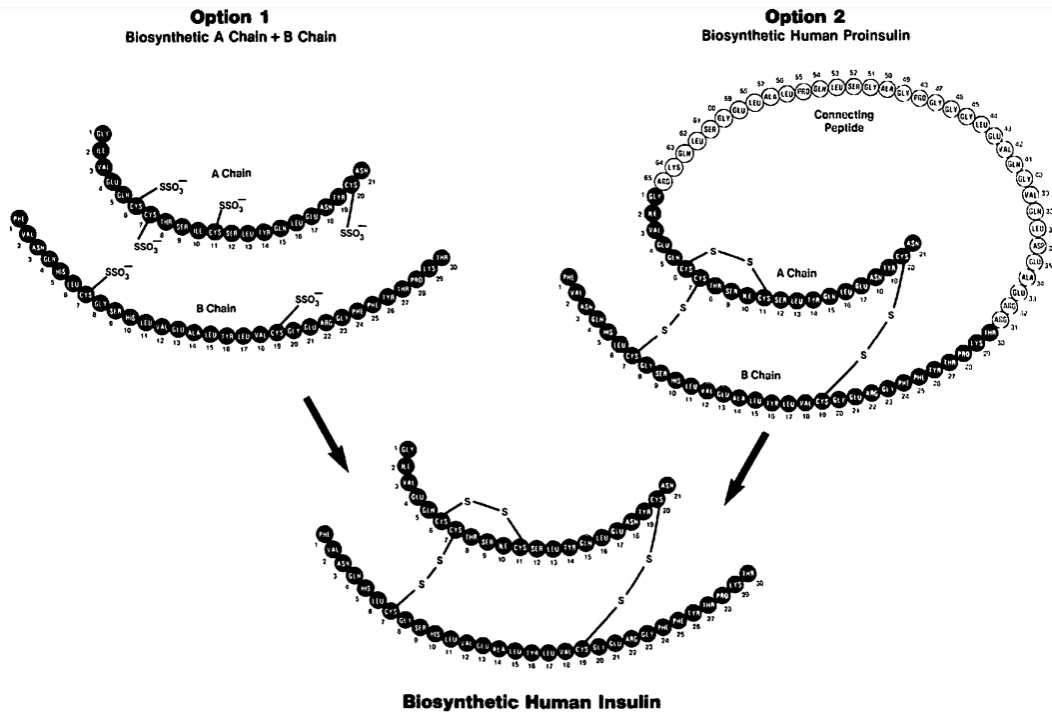


Рис. 1. Підходи до отримання рекомбінантного інсуліну людини: 1 – А-ланцюг + В-ланцюг; 2 – проінсулін; 3 – людський інсулін [36]

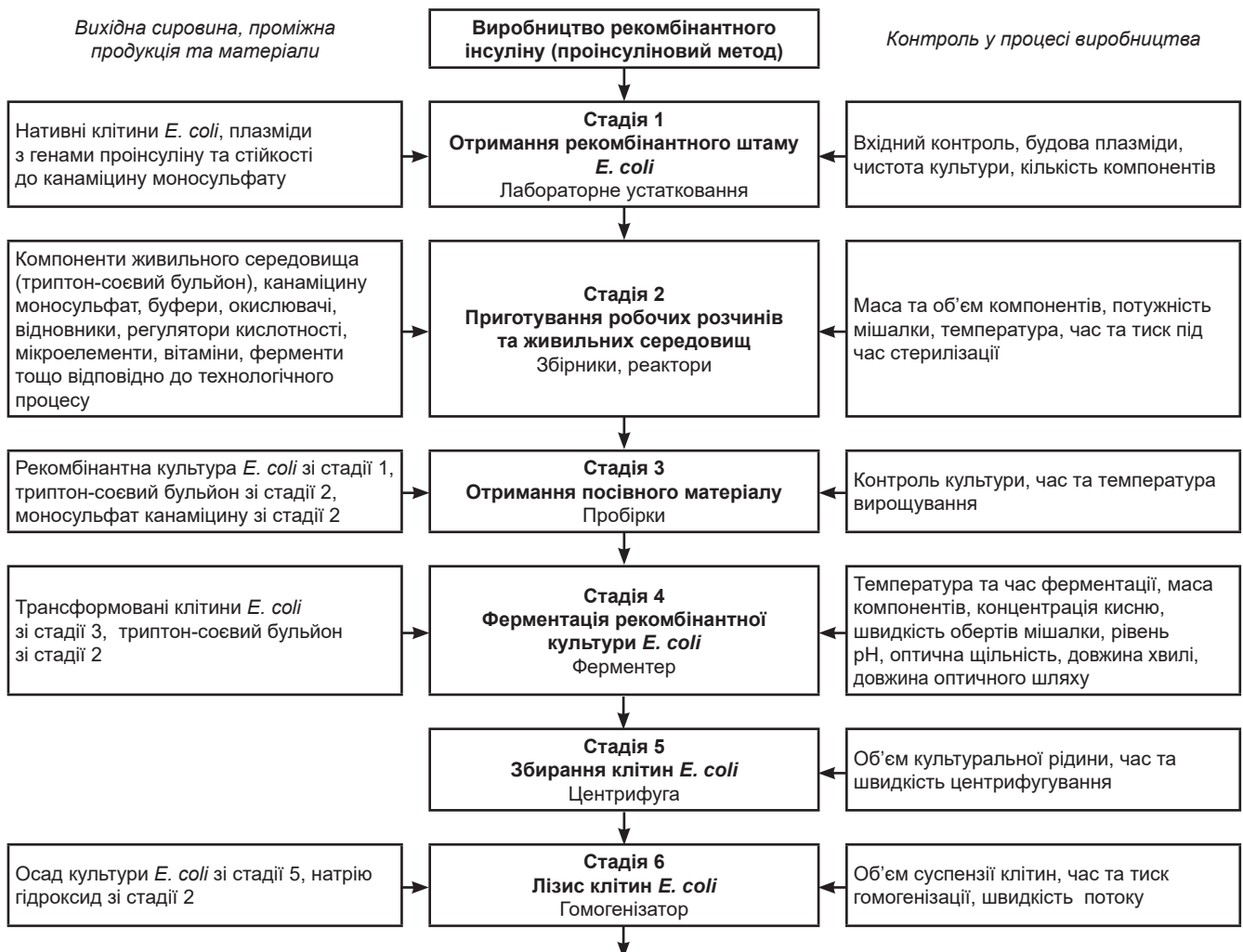


Рис. 2. Технологічна схема виробництва гормону інсуліну (із синтезом проінсуліну) (початок)

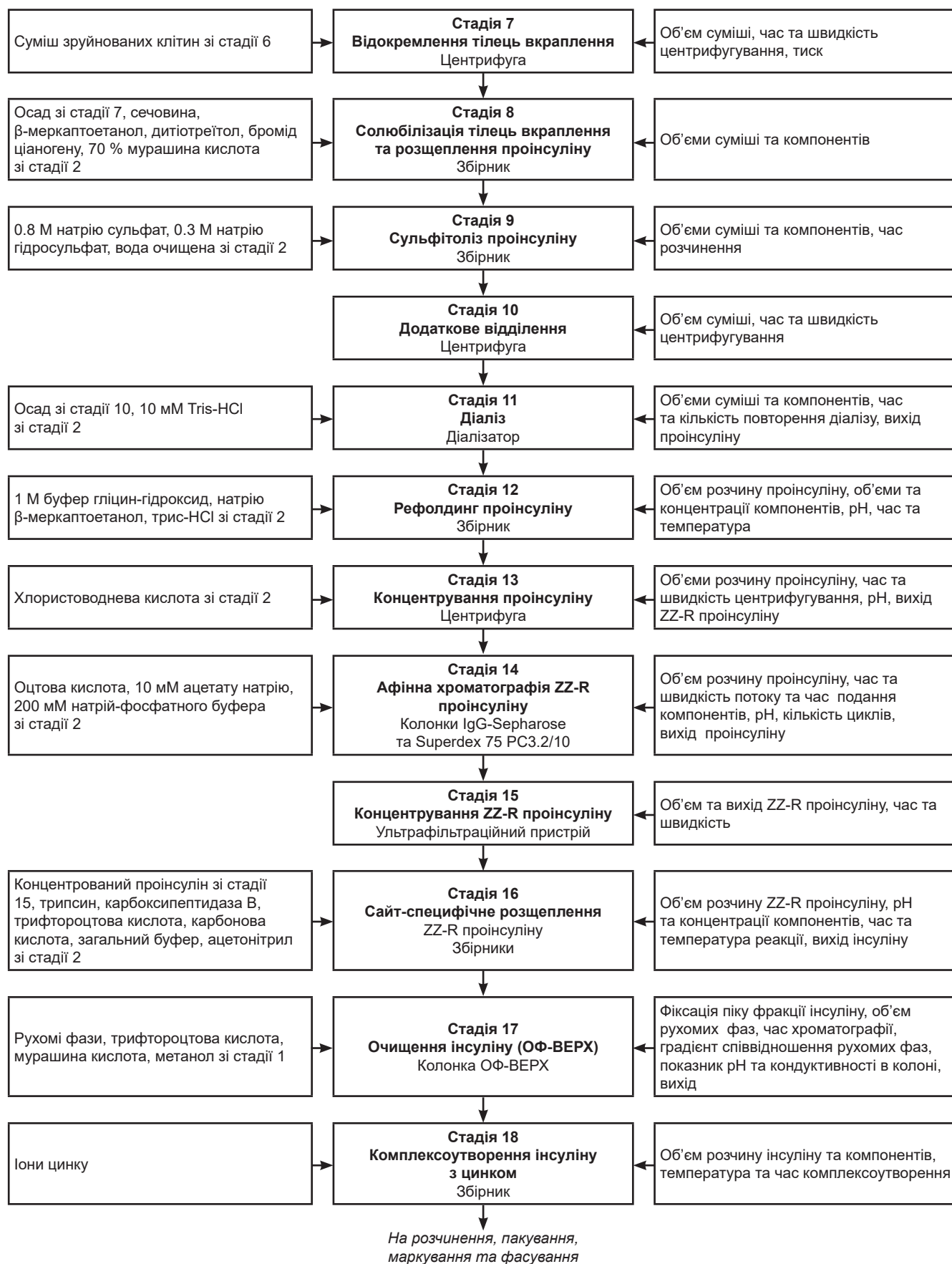


Рис. 2. Технологічна схема виробництва гормону інсуліну (із синтезом проінсуліну) (закінчення)

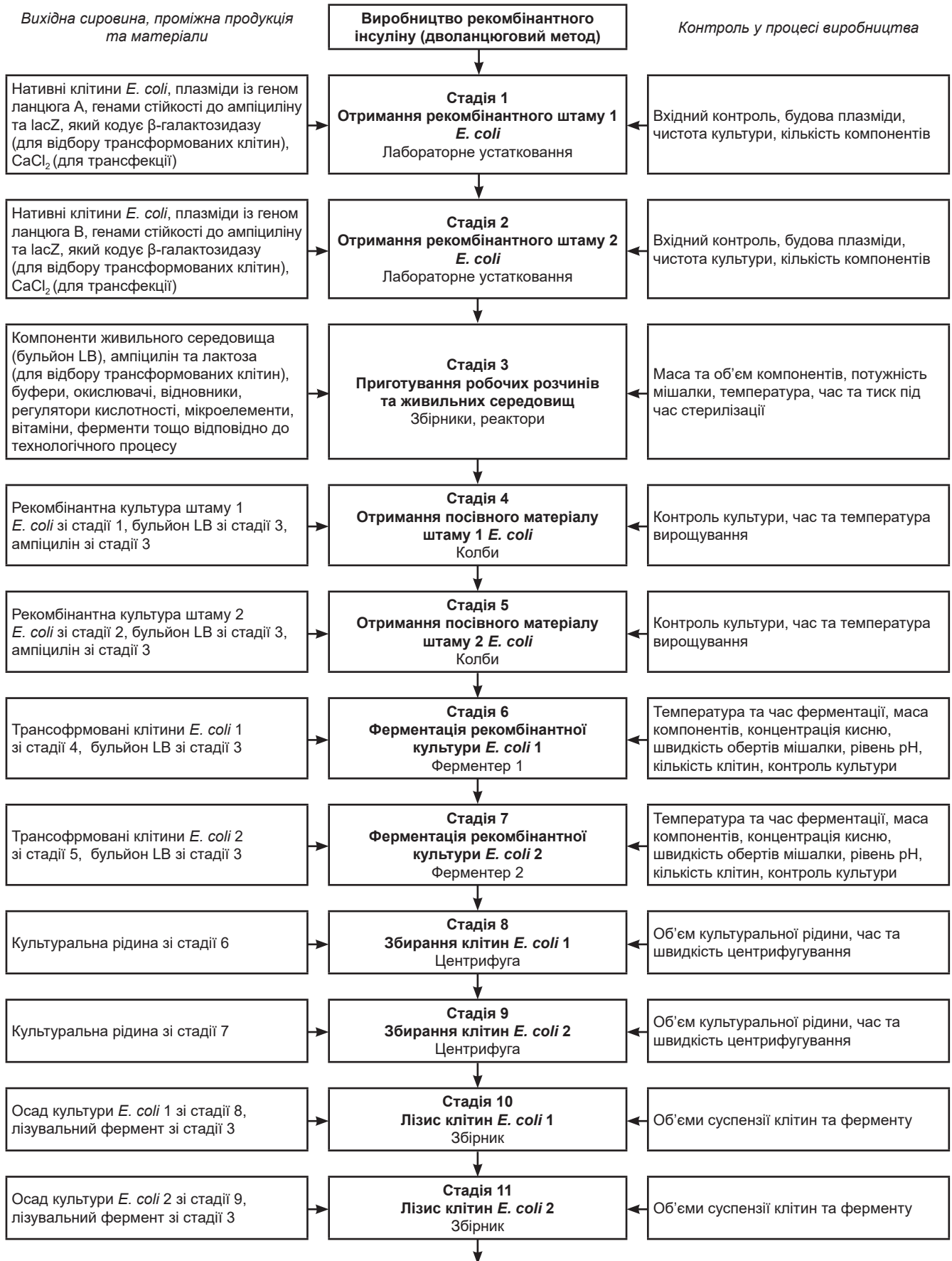


Рис. 3. Технологічна схема виробництва гормону інсуліну (дволанцюговим методом) (початок)

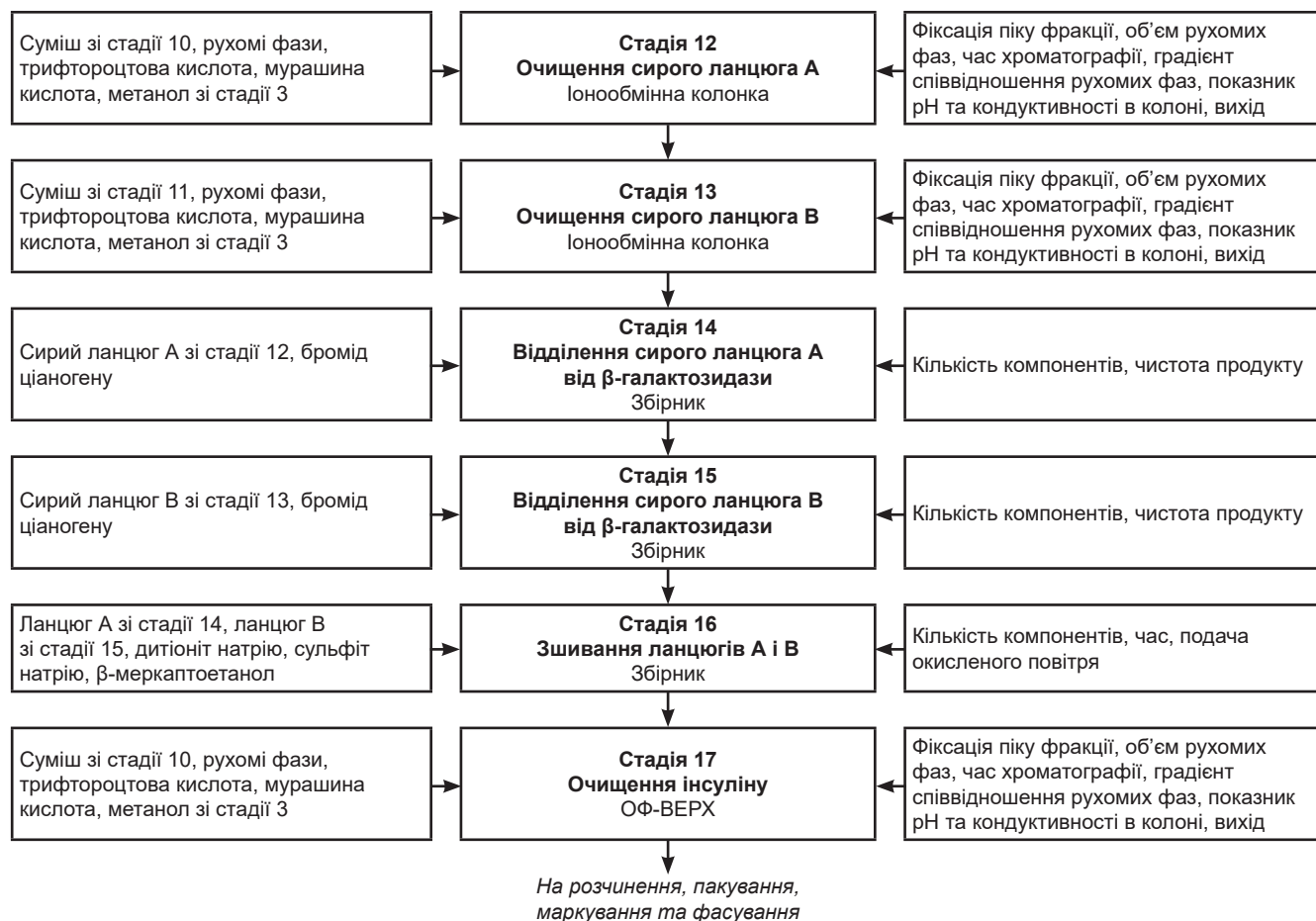


Рис. 3. Технологічна схема виробництва гормону інсуліну (дволанцюговим методом) (закінчення)

Обидва методи виробництва рекомбінантного інсуліну – із синтезом проінсуліну та дволанцюговий метод – мають свої переваги та недоліки, які треба враховувати під час вибору оптимальної схеми. Метод із синтезом проінсуліну відзначається простою процесу виробництва та можливістю високого виходу продукту. Використання цієї технології характеризується меншими витратами на виробництво та часом процесу. Але для отримання активного інсуліну необхідне додаткове оброблення напівпродукту, а також існує можливість виникнення проблем з чистотою продукту. Дволанцюговий метод вимагає більше часу та ресурсів на з'єднання ланцюгів, але його перевагами є точніший контроль над процесом виробництва та менші проблеми з чистотою продукту. Можливість оптимізації кожного етапу біосинтезу дозволяє підвищити ефективність та якість виробництва. Отже, вибір між цими двома методами залежить від конкретних умов, можливостей та потреб виробника.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Аналіз даних наукової літератури засвідчив, що основними методами виробництва препаратів інсуліну з 1980-х років залишаються проінсуліновий і дволанцюговий, засновані на технологіях рекомбінантної ДНК. Проінсуліновий метод вважають більш

ефективним і рентабельним проти дволанцюгового, бо ця технологія складається з роботи з одним рекомбінантним штамом. Вибір між цими двома методами залежить від конкретних потреб виробника: для одних випадків раціональним є швидкий метод із синтезом проінсуліну, для інших – більш точний та контрольований дволанцюговий метод.

Системами експресії, використовуваними в сучасних технологіях великомасштабних виробництв, залишаються бактеріальна (*Escherichia coli*) та дріжджова (*Saccharomyces cerevisiae*). Але за використання *E. coli* попередники інсуліну виробляються в тільцях вкраплення, а повністю функціональні поліпептиди отримують шляхом стадій сольобілізації та рефолдингу; система ж на основі дріжджів дає розчинний попередник інсуліну, який секретується в культуральну рідину, проте потребує попередньої гуманізації через ризики імунної відповіді в людини. Отже, сучасні технології не можуть задовольнити дедалі більший попит на доступний інсулін через обмеження виробничих потужностей і високу вартість виробництва, тому тривають дослідження з пошуку нових ефективних систем експресії, як-от клітини рослин та ссавців, зокрема *Arabidopsis thaliana*, тютюну, салату, полуниці, стовбурових клітин.

Конфлікт інтересів: відсутній.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. The WHO Global Diabetes Compact. World Health Organization, WHO. 2021. URL: <https://www.who.int/initiatives/the-who-global-diabetes-compact> (Date of access: 30.04.2024).
2. U.S. Human insulin market size, share & COVID-19 impact analysis, by type (analogue insulin and traditional human insulin), by diabetes type (diabetes 1 and diabetes type 2), by distribution channel (hospital pharmacy and retail and online pharmacy), and regional forecast, 2023-2030. URL: <https://www.fortunebusinessinsights.com/u-s-human-insulin-market-107469> (Date of access: 30.04.2024).
3. International Diabetes Federation. URL: <https://idf.org/> (Date of access: 30.04.2024).
4. Human insulin market size, share & industry analysis, by type (analogue insulin, traditional human insulin), by diabetes type (type 1, type 2), by distribution channel (retail pharmacy, hospital pharmacy, online pharmacy), and regional forecast, 2019-2026. Fortune Business Insights. 2020. URL: <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/human-insulin-market-100395> (Date of access: 30.04.2024).
5. Lyumjev® (insulin lispro-aabc) Injection Approved by U.S. FDA for Children with Diabetes. URL: <https://www.lilly.com/news/media/media-kits/lyumjev> (Date of access: 30.04.2024).
6. Elli Lilly and Company. URL: <https://www.lilly.com/our-medicines/current-medicines> (Date of access: 30.04.2024).
7. Журавльова Л. В., Кривоносова О. М. Актуальні підходи до лікування хворих на цукровий діабет : навч. посіб. для студентів, лікарів-інтернів терапевтів, ендокринологів та лікарів загальної практики. Харків : ХНМУ, 2019. 124 с.
8. Внутрішня медицина: модуль 1, змістовий модуль 1 «Основи діагностики, лікування та профілактики основних хвороб ендокринної системи» : навч. посіб. для студентів 4 курсу мед. ф-тів в галузі знань 22 «Охорона здоров'я», спец. 222 «Медицина», 228 «Педіатрія» / С. М. Кисельов та ін. Запоріжжя : ЗДМУ, 2021. 137 с.
9. Lewis G. F., Brubaker P. L. The discovery of insulin revisited: lessons for the modern era. *The Journal of Clinical Investigation*. 2021. Vol. 131 (1). P. 142239. DOI: 10.1172/JCI142239.
10. Human Insulin: History, Recent Advances, and Expression Systems for Mass Production / J. Alyas et al. *Biomedical Research and Therapy*. 2021. Vol. 8 (9). P. 4540-4561. DOI: 10.15419/bmrat.v8i9.692.
11. Jorgensen-Earp C. R., Jorgensen D. D. «To Fly Under Borrowed Colours»: Insulin Discovery Accounts, Scientific Credit, and the Nobel Prize. *Rhetoric and Public Affairs*. 2020. Vol. 23 (1). P. 1-45. DOI: 10.14321/rhetpublaffa.23.1.0001.
12. The discovery of insulin: an important milestone in the history of medicine / I. Vecchio et al. *Frontiers in Endocrinology*. 2018. Vol. 9. P. 613. DOI: 10.14321/rhetpublaffa.23.1.0001.
13. Strakosch C. The discovery of Insulin. 2000. Ramsay Health Care. URL: https://web.archive.org/web/20140125100917/http://historic-greenslopes.com/documents/Booklet_The%20Discovery%20of%20Insulin%2006.pdf (Date of access: 30.04.2024).
14. The Nobel Prize in Chemistry 1980. URL: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1980/summary/> (Date of access: 30.04.2024).
15. Riggs A. D. Making, Cloning, and the Expression of Human Insulin Genes in Bacteria: The Path to Humulin. *Endocrine Reviews*. 2021. Vol. 42 (3). P. 374-380. DOI: 10.1210/edrv/bnaa029.
16. Comprehensive Review of the Evolution of Insulin Development and Its Delivery Method / V. Sugumar et al. *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 14. P. 1406. DOI: 10.3390/pharmaceutics14071406.
17. Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: current scenario and future perspectives / M. N. Baeshen et al. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015. Vol. 25 (7). P. 953-962. DOI: 10.4014/jmb.1412.12079.
18. Expression and purification of recombinant human insulin from *E. coli* 20 strain / M. Zielinski et al. *Protein Expression and Purification*. 2019. Vol. 57. P. 63-9. DOI: 10.1016/j.pep.2019.02.002.
19. Hegele R. A., Maltman G. M. Insulin's centenary: the birth of an idea. *The Lancet. Diabetes and Endocrinology*. 2020. Vol. 8 (12). P. 971-977. DOI: 10.1016/S2213-8587(20)30337-5.
20. Yeast expression systems: overview and recent advances / R. Baghban et al. *Molecular Biotechnology*. 2019. Vol. 61 (5). P. 365-384. DOI: 10.1007/s12033-019-00164-8.
21. Wildt S., Gerngross T. U. The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nature Reviews. Microbiology*. 2005. Vol. 3 (2). P. 119-28. DOI: 10.1038/nrmicro1087.
22. Humanizing glycosylation pathways in eukaryotic expression systems / A. H. Khan et al. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017. Vol. 33 (1). P. 4. DOI: 10.1007/s11274-016-2172-7.
23. *Pichia pastoris* expression system: a potential candidate to express protein in industrial and biopharmaceutical domains / I. Safder et al. *Biometrical Letters*. 2018. Vol. 4 (1). P. 1-14.
24. Karbalaee M., Rezaee S. A., Farsiani H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of Cellular Physiology*. 2020. Vol. 235 (9). P. 5867-5881. DOI: 10.1002/jcp.29583.
25. Insulin evolution: A holistic view of recombinant production advancements / A. Sahoo et al. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024. Vol. 277 (1). P. 133951. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.133951.
26. Critical analysis of the commercial potential of plants for the production of recombinant proteins / S. Schillberg et al. *Frontiers in Plant Science*. 2019. Vol. 10. P. 720. DOI: 10.3389/fpls.2019.00720.
27. Efficiency of Stem Cell (SC) Differentiation into Insulin-Producing Cells for Treating Diabetes: a Systematic Review / M. Nemati et al. *Stem cells international*. 2021. Vol. 25. P. 6652915. DOI: 10.1155/2021/6652915.
28. Generation of glucose-responsive, insulin-producing cells from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells / K. R. Prabhakar et al. *Cell Transplantation*. 2012. Vol. 21 (6). P. 1321-1339. DOI: 10.3727/096368911X612530.
29. Negi N., Griffin M. D. Effects of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells: current understanding and clinical relevance. *Stem Cells*. 2020. Vol. 38 (5). P. 596-605. DOI: 10.1002/stem.3151.
30. A novel and more efficient biosynthesis approach for human insulin production in *Escherichia coli* (*E. coli*) / K. Govender et al. *AMB Express*. 2020. Vol. 10 (1). P. 43. DOI: 10.1186/s13568-020-00969-w.

31. Methanol-independent protein expression by AOX1 promoter with trans-acting elements engineering and glucose-glycerol-shift induction in *Pichia pastoris* / J. Wang et al. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7 (1). P. 41850. DOI: 10.1038/srep41850.
32. Dong O. X., Ronald P. C. Genetic engineering for disease resistance in plants: recent progress and future perspectives. *Plant Physiology*. 2019. Vol. 180 (1). P. 26-38. DOI: 10.1104/pp.18.01224.
33. Root and shoot parts of strawberry: factories for production of functional human pro-insulin / A. Tavizi et al. *Molecular Biology Reports*. 2015. Vol. 42 (5). P. 1013-1023. DOI: 10.1007/s11033-014-3837-7.
34. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress / Y. Shi et al. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2017. Vol. 16 (2). P. 115-130. DOI: 10.1038/nrd.2016.245.
35. Induced pluripotent stem cells: hope in the treatment of diseases, including muscular dystrophies / D. G. Beghini et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21 (15). P. 5467. DOI: 10.3390/ijms21155467.
36. Equivalent Recombinant Human Insulin Preparations and their Place in Therapy / J. Sandow et al. *European Journal of Endocrinology*. 2015. Vol. 11 (1). P. 10-16. DOI: 10.17925/EE.2015.11.01.10.

REFERENCES

1. The WHO Global Diabetes Compact. World Health Organization, WHO. 2021. Available at: <https://www.who.int/initiatives/the-who-global-diabetes-compact>.
2. U.S. Human insulin market size, share & COVID-19 impact analysis, by type (analogue insulin and traditional human insulin), by diabetes type (diabetes 1 and diabetes type 2), by distribution channel (hospital pharmacy and retail and online pharmacy), and regional forecast, 2023-2030. Available at: <https://www.fortunebusinessinsights.com/u-s-human-insulin-market-107469>.
3. International Diabetes Federation. Available at: <https://idf.org/>.
4. Human insulin market size, share & industry analysis, by type (analogue insulin, traditional human insulin), by diabetes type (type 1, type 2), by distribution channel (retail pharmacy, hospital pharmacy, online pharmacy), and regional forecast, 2019-2026. Fortune Business Insights. 2020. Available at: <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/human-insulin-market-100395>.
5. Lyumjev® (insulin lispro-aabc) Injection Approved by U.S. FDA for Children with Diabetes. Available at: <https://www.lilly.com/news/media/media-kits/lyumjev>.
6. Elli Lilly and Company. Available at: <https://www.lilly.com/our-medicines/current-medicines>.
7. Zhuravlova, L. V., Kryvonosova, O. M. (2019). *Aktualni pidkhody do likuvannia khvorykh na tsukrovoyi diabet: navch. posib. dlia studentiv, likariv-interniv terapevtiv, endokrynolohiv ta likariv zahalnoi praktyky*. Kharkiv: KhNMU.
8. Kyselov, S. M., Kadzharian, V. H., Soloviyuk, O. O., Hura, E. Yu., Kapshytar, N. I. (2021). *Vnutrishnia medytsyna: modul 1, zmistovyi modul 1 «Osnovy diahnostryky, likuvannia ta profilaktyky osnovnykh khvorob endokrynnoi systemy»: navch. posib. dlia studentiv 4 kursu med. f-tiv v haluzi znan 22 «Okhorona zdorovia», spets. 222 «Medytsyna», 228 «Pediatria»*. Zaporizhzhia: ZDMU.
9. Lewis, G. F., Brubaker, P. L. (2021). The discovery of insulin revisited: lessons for the modern era. *The Journal of Clinical Investigation*, 131(1), 142239. doi: 10.1172/JCI142239.
10. Alyas, J., Rafiq, A., Amir, H., Khan, S. U., Sultana, T., Ali, A. et al. (2021). Human Insulin: History, Recent Advances, and Expression Systems for Mass Production. *Biomedical Research and Therapy*, 8(9), 4540-4561. doi: 10.15419/bmrat.v8i9.692.
11. Jorgensen-Earp, C. R., Jorgensen, D. D. (2020). «To Fly Under Borrowed Colours»: Insulin Discovery Accounts, Scientific Credit, and the Nobel Prize. *Rhetoric and Public Affairs*, 23(1), 1-45. doi: 10.14321/rhetpublaffa.23.1.0001.
12. Vecchio, I., Tornali, C., Bragazzi, N. L., Martini, M. (2018). The discovery of insulin: an important milestone in the history of medicine. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 613. doi: 10.14321/rhetpublaffa.23.1.0001.
13. Strakosch, C. The discovery of Insulin. 2000. Ramsay Health Care. Available at: https://web.archive.org/web/20140125100917/http://historicgreenslopes.com/documents/Booklet_The%20Discovery%20of%20Insulin%2006.pdf.
14. The Nobel Prize in Chemistry 1980. Available at: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1980/summary/>.
15. Riggs, A. D. (2021). Making, Cloning, and the Expression of Human Insulin Genes in Bacteria: The Path to Humulin. *Endocrine Reviews*, 42(3), 374-380. doi: 10.1210/endrev/bnaa029.
16. Sugumar, V., Ang, K. P., Alshanon, A. F., Sethi, G., Chen Yong, P. V., Looi, C. Y., Wong, W. F. (2022). Comprehensive Review of the Evolution of Insulin Development and Its Delivery Method. *Pharmaceutics*, 14, 1406. doi: 10.3390/pharmaceutics14071406.
17. Baeshen, M. N., Al-Hejin, A. M., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A. I., Saini, K. S. et al. (2015). Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: current scenario and future perspectives. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(7), 953-962. doi: 10.4014/jmb.1412.12079.
18. Zielinski, M., Romanik-Chruścielewska, A., Mikiewicz, D., Łukasiewicz, N., Sokołowska, I., Antosik, J. et al. (2019). Expression and purification of recombinant human insulin from *E. coli* 20 strain. *Protein Expression and Purification*, 157, 63-69. doi: 10.1016/j.pep.2019.02.002.
19. Hegele, R. A., Maltman, G. M. (2020). Insulin's centenary: the birth of an idea. *The Lancet. Diabetes and Endocrinology*, 8(12), 971-977. doi: 10.1016/S2213-8587(20)30337-5.
20. Baghban, R., Farajnia, S., Rajabibazl, M., Ghasemi, Y., Mafi, A. Ali., Hoseinpoor, R. et al. (2019). Yeast expression systems: overview and recent advances. *Molecular Biotechnology*, 61(5), 365-384. doi: 10.1007/s12033-019-00164-8.
21. Wildt, S., Gerngross, T. U. (2005). The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(2), 119-28. doi: 10.1038/nrmicro1087.
22. Khan, A. H., Bayat, H., Rajabibazl, M., Sabri, S., Rahimpour, A. (2017). Humanizing glycosylation pathways in eukaryotic expression systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 4. doi: 10.1007/s11274-016-2172-7.
23. Safder, I., Khan, S., Islam, Iram-us, Kazim Ali, M., Bibi, Z., Waqas, M. (2018). *Pichia pastoris* expression system: a potential candidate to express protein in industrial and biopharmaceutical domains. *Biometrical Letters*, 4(1), 1-14.

24. Karbalaee, M., Rezaee, S. A., Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of Cellular Physiology*, 235(9), 5867-5881. doi: 10.1002/jcp.29583.
25. Sahoo, A., Das, P. K., Dasu, V. V., Patra, S. (2024). Insulin evolution: A holistic view of recombinant production advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 277(1), 133951. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.133951
26. Schillberg, S., Raven, N., Spiegel, H., Rasche, S., Buntru, M. (2019). Critical analysis of the commercial potential of plants for the production of recombinant proteins. *Frontiers in Plant Science*, 10, 720. doi: 10.3389/fpls.2019.00720.
27. Nemati, M., Omrani, G. H. R., Ebrahimi, B., Alizadeh, A. (2021). Efficiency of Stem Cell (SC) Differentiation into Insulin-Producing Cells for Treating Diabetes: a Systematic Review. *Stem cells international*, 25, 6652915. doi: 10.1155/2021/6652915.
28. Prabakar, K. R., Domínguez-Bendala, J., Molano, R. D., Pileggi, A., Villate, S., Ricordi, C., Inverardi, L. (2012). Generation of glucose-responsive, insulin-producing cells from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*, 21(6), 1321-1339. doi: 10.3727/096368911X612530.
29. Negi, N., Griffin, M. D. (2020). Effects of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells: current understanding and clinical relevance. *Stem Cells*, 38(5), 596-605. doi: 10.1002/stem.3151.
30. Govender, K., Naicker, T., Lin, J., Baijnath, S., Chuturgoon, A. A., Abdul, N. S. et al. (2020). A novel and more efficient biosynthesis approach for human insulin production in *Escherichia coli* (E. coli). *AMB Express*, 10(1), 43. doi: 10.1186/s13568-020-00969-w.
31. Wang, J., Wang, X., Shi, L., Qi, F., Zhang, P., Zhang, Y. et al. (2017). Methanol-independent protein expression by AOX1 promoter with trans-acting elements engineering and glucose-glycerol-shift induction in *Pichia pastoris*. *Scientific Reports*, 7(1), 41850. doi: 10.1038/srep41850.
32. Dong, O. X., Ronald, P. C. (2019). Genetic engineering for disease resistance in plants: recent progress and future perspectives. *Plant Physiology*, 180(1), 26-38. doi: 10.1104/pp.18.01224.
33. Tavizi, A., Javaran, M. J., Moieni, A., Mohammadi-Dehcheshmeh, M., Mohebodini, M., Ebrahimi, E. (2015). Root and shoot parts of strawberry: factories for production of functional human pro-insulin. *Molecular Biology Reports*, 42(5), 1013-1023. doi: 10.1007/s11033-014-3837-7.
34. Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C., Yamanaka, S. (2017). Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(2), 115-130. doi: 10.1038/nrd.2016.245.
35. Beghini, D. G., Horita, S. I., Cascabulho, C. M., Alves, L. A., Henriques-Pons, A. (2020). Induced pluripotent stem cells: hope in the treatment of diseases, including muscular dystrophies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5467. doi: 10.3390/ijms21155467.
36. Sandow, J., Landgraf, W., Becker, R., Seipke, G. (2015). Equivalent Recombinant Human Insulin Preparations and their Place in Therapy. *European Journal of Endocrinology*, 11(1), 10-16. doi: 10.17925/EE.2015.11.01.10.

Відомості про авторів:

Калюжня О. С., кандидат фармацевтичних наук, доцент кафедри біотехнології, Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України. E-mail: kalyuzhnayao.s@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8187-517X>
Хохленкова Н. В., доктор фармацевтичних наук, професор, завідувачка кафедри біотехнології, Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України. E-mail: hohnatal@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1676-7591>
Паненко М. В., здобувачка вищої освіти, Харківський національний медичний університет Міністерства охорони здоров'я України. E-mail: minionmishel@gmail.com

Information about authors:

Kaliuzhnaia O. S., Candidate of Pharmacy (PhD), associate professor of the Department of Biotechnology, National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine. E-mail: kalyuzhnayao.s@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8187-517X>
Khokhlenkova N. V., Doctor of Pharmacy (Dr. habil.), professor, head of the Department of Biotechnology, National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine. E-mail: hohnatal@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1676-7591>
Panenko M. V., higher education applicant, Kharkiv National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, area of knowledge 22 "Healthcare", specialty 221 "Dentistry". E-mail: minionmishel@gmail.com

Надійшла до редакції 17.10.2024 р.